

## Influencia de distintos factores en las posibilidades de propagación "in vitro" de Microcycas calocoma (Miq.) A.DC.

Esperanza Peña García

Emma Grillo Mensa

Dalia Pérez Montesino

Jardín Botánico Nacional

Universidad de La Habana.

### RESUMEN:

Se estudia la influencia de distintos factores en el comportamiento *in vitro* de esporangios, fragmentos del macrogametofito y posibles primeras fases en el desarrollo de semillas de **Microcycas calocoma** (Miq.) A.DC. utilizando material colectado en diferentes épocas del año, distintos medios minerales, variaciones en los factores de crecimiento y sus concentraciones, y dos condiciones de iluminación. Se evidenció la relación de cada uno de los factores de variación con el tiempo de formación y características de los callos, la diferenciación y características de las raíces, la especificidad de la acción de factores de crecimiento y la composición mineral de los medios de cultivo en la obtención de callos. Se discuten los resultados.

### ABSTRACT:

The influence of factors related to *in vitro* proliferation of seminal primordia, macrogametophyte portions and possible primer stages of seed development of **Microcycas calocoma** (Miq.) A.DC. were studied. The effect of varying the explant source (by collecting material at different seasons), different mineral media, variation in types and concentration of growth factors, in addition to the application of two illumination conditions were taken into account. Relations between each source of variation with time for callus initiation and its characteristics, differentiation and types of roots, specificity in growth factor action and mineral composition of media for calli obtention were evident. Results are discussed.

Actualmente las técnicas de cultivo *in vitro* de fragmentos de órganos en especies vegetales resulta habitual. En la mayoría de los trabajos se refleja el interés por incrementar el conocimiento acerca de especies y variedades que constituyen fuente de alimentación humana, ornamentales que pueden propagarse de manera acelerada por este tipo de técnicas y de muchas otras a partir de las cuales pueden obtenerse productos de interés medicinal. También existe un elevado número de investigaciones en las que la obtención de callos y la neoformación de órganos tienen interés científico puro sin que formen parte de una secuencia de resultados que contribuyan a la solución de algún problema práctico concreto. Sin embargo, la aplicación del cultivo *in vitro* a la propagación de especies de valor botánico, actualmente raras o amenazadas de extinción, como vía para contribuir a su conservación no es frecuente a pesar de su importancia.

Las técnicas de cultivo *in vitro* han sido utilizadas con distintos objetivos en distintas especies de Cycadaceae. En trabajo precedente (Peña y Grillo, 1982) se resumen los resultados que han sido

publicados en este grupo de plantas dentro de la temática hasta principios de la década del 80, de lo que se evidencia que la obtención de los medios de cultivo empleados no resultaban satisfactorios en la producción acelerada de callos; que la diferenciación de plántulas no ha sido lograda, aunque se han podido diferenciar raíces o "pseudobulbilos" aisladamente en algunos de los medios utilizados; y que la obtención de callos no ha sido posible a partir de órganos vegetativos como fuente de explanto. Todo lo anterior demuestra la importancia de los estudios en que puedan determinarse las condiciones óptimas de cultivo, por lo que resulta necesario establecer los medios minerales, tipos de factores de crecimiento y concentraciones adecuadas según los objetivos a alcanzar, e influencia de los factores externos, entre otros.

*Microcycas calocoma* (Miq.) A.DC. o palma corcho, constituye una valiosa *Cycadaceae* endémica del occidente cubano y ha sido evaluada como especie en peligro de extinción. A pesar de que ha sido objeto de

diversos estudios recientes (Peña y Grillo, 1982; Del Risco, Morel y Samek, 1984; Peña, Grillo y Ruiz, 1985; Peña, Díaz y Grillo, 1986; Peña, Chaves y Pimentel, 1988), la publicación de los resultados en que se ofrezcan los medios minerales idóneos, los suplementos a éstos y sus concentraciones más adecuadas para la obtención de callos, neoformación de órganos y diferenciación de plántulas, no existe.

En el presente trabajo se reportan y discuten los resultados de cultivar primordios seminales, macrogametofitos y primeras fases del desarrollo de semillas de *Microcycas calocoma* *in vitro*, utilizando distintos medios minerales y suplementos en concentraciones variadas así como las respuestas al aplicar dos condiciones de iluminación diferente, con el objetivo de incrementar el conocimiento acerca de las posibilidades de utilizar esta técnica para contribuir a la conservación de esta especie.

## MATERIALES Y METODOS

### Fuentes de explanto.

Como factor importante en los resultados a obtener de los estudios de cultivo en condiciones de esterilidad, las características del explanto a utilizar son esenciales. Se emplearon diferentes fases del desarrollo de estróbilos femeninos de *Microcycas calocoma* colectadas en la naturaleza para la obtención de los explantos.

Los explantos utilizados abarcaron diferentes fases dentro del proceso de formación de semillas, lo cual comprende material muestreado desde el inicio de septiembre, enero, primeros días de febrero, marzo, abril y mediados de mayo, que se relacionan a estados cualitativamente diferentes: primordios seminales (maduros, en la época de polinización natural antes de que ésta ocurra: septiembre); macrogametofitos (en diferentes fases de desarrollo hasta la formación de arquegonios: enero, febrero y marzo); y posibles primeras fases del desarrollo de semillas (etapas posteriores a la fecundación, de haber ocurrido ésta: abril y mayo).

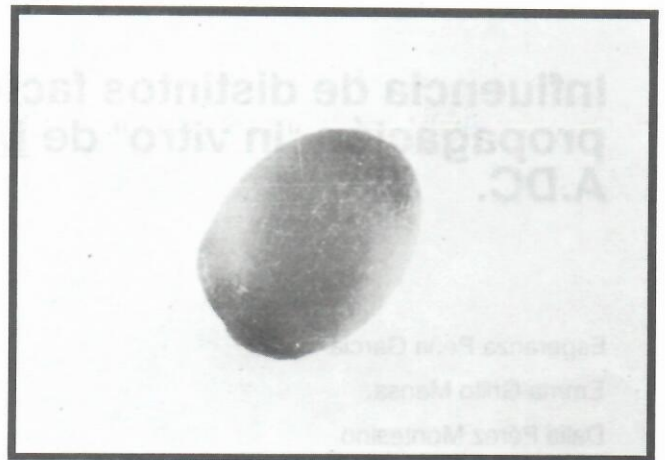
Los distintos explantos utilizados proceden de estróbilos desarrollados en plantas de distintas localidades donde su desarrollo es homogéneo y estable.

Para su procesamiento los estróbilos se transportaron completos y fueron utilizados en tiempos menores a las 48 horas de su cosecha.

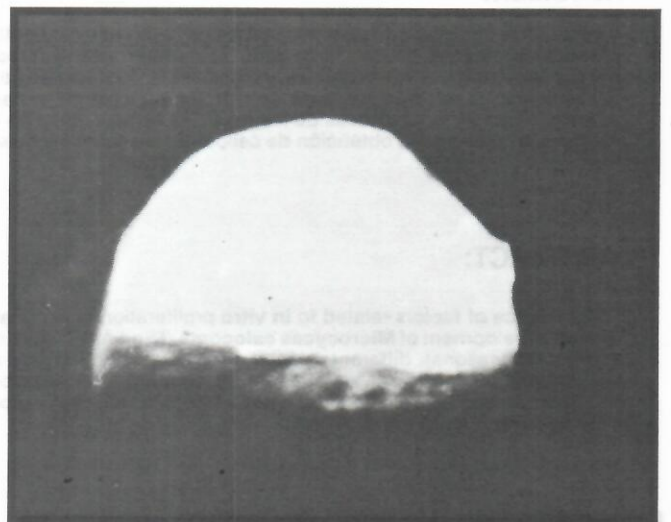
**Tratamiento a primordios seminales (septiembre) y macrogametofitos en etapa inicial de desarrollo (enero).** Antes de su inoculación *in vitro*, se procedió a separar el material de los macrosporofilos sembrando sin fraccionar. En la figura 1 se muestra el aspecto externo de los explantos sembrados descartando o no las cubiertas.

**Macrogametofitos en etapas avanzadas de su desarrollo (febrero y marzo) y posibles primeras fases del desarrollo de semillas (abril y mayo).** Antes de proceder a su siembra *in vitro*, el material se separó de los macrosporofilos inmediatamente antes de su esterilización, se descartaron las cubiertas, y por su tamaño, se fragmentaron en cuatro partes según sus secciones medias (longitudinal y transversal). En la figura 2 se muestra el tipo de explanto inoculado.

La desinfección superficial del material colectado se llevó a cabo lavando con detergente y enjuagando con abundante agua corriente. A continuación se utilizó lejía comercial KINSOL al 50 % durante 5' para la desinfección de los distintos tipos de explanto.



**Fig 1.** Aspecto externo de un macrogametofito de *Microcycas calocoma* en fase inicial de desarrollo después de su separación del macrosporofilo. El aspecto externo es el mismo de un primordio seminal en la época de polinización, solo que su tamaño es ligeramente mayor (7-8mm de largo y 5-6 de diámetro).



**Fig 2 .** Aspectos de los explantos de los macrogametofitos de *Microcycas calocoma* en etapas avanzadas de su desarrollo (febrero y marzo) después de eliminar las cubiertas y de seccionarlo para su siembra *in vitro*. Su aspecto y tamaño son semejantes al de las fases iniciales de desarrollo de las semillas (abril y mayo).

### Medios de cultivo.

Se aplicaron distintos medios de cultivo y se realizaron variaciones en los suplementos así como en sus concentraciones. En la Tabla I se reflejan los tratamientos utilizados en el estudio. Cada uno de los tratamientos estuvo representado por veinticinco explantos.

### Condiciones de cultivo.

Las condiciones de cultivo aplicadas a todos los experimentos montados han sido referidas en trabajo anterior (Peña y Grillo, 1982). A los explantes de enero, cuyo desarrollo *in vitro* no había sido estudiado con

anterioridad, se le aplicaron dos condiciones de iluminación: los tratamientos 1 al 16 se mantuvieron con las condiciones de iluminación continua referidas y los tratamientos 17 al 19 a oscuridad total.

La evaluación del efecto de las condiciones de cultivo se realizó al cabo de los 21 días. La temperatura osciló entre los 23 y 27°C.

## RESULTADOS Y DISCUSION.

### Producción acelerada de callos.

Los resultados de cultivar primordios seminales, gametofitos y posibles fases iniciales del desarrollo de semillas de *Microcycas calocoma* en los tratamientos del 1 al 16 se reflejan en la Tabla II. Puede observarse que la aplicación del medio reportado por Peña y Grillo en 1982, suplementado con distintas concentraciones de ANA y agua de coco (tratamientos del del 1 al 16) bajo iluminación constante resulta marcadamente diferente según el tipo de explanto.

Se evidencia, en primer lugar, que el desarrollo de los callos requiere de la adición de agua de coco y ácido naftalenacético, al medio ya que la producción acelerada de callo no ocurre nunca si ambos factores de crecimiento no están presentes en el medio de cultivo.

Por otra parte, la respuesta sólo es efectiva cuando las fuentes de explanto son macrogametofitos inmediatamente antes de la fecundación (marzo) o muy poco tiempo después de ocurrida ésta (abril).

Los tratamientos aplicados a gametofitos completamente desarrollados (marzo) responden de manera efectiva en la producción acelerada de callo cuando ambos factores de crecimiento están presentes, independientemente de la relación que se aplique (tratamientos 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15 y 16). En el caso de las posibles primeras etapas posteriores a la fecundación, sólo se observa una respuesta efectiva en la etapa inicial (abril) y cuando las concentraciones de ANA son de 5 ó 10 mg/l combinadas con 10 ó 15 % de agua de coco (tratamientos 11, 12, 15 y 16).

Los resultados obtenidos demuestran que los gametofitos colectados en marzo constituyen la mejor fuente de explanto para la obtención acelerada de callo. Esto está seguramente vinculado con la textura del explanto, que a la vez se relaciona al estadio fisiológico del mismo.

En el caso de los primordios seminales, debe señalarse que ninguna de sus partes componentes son estimuladas por los tratamientos aplicados (del 1 al 16).

Los caracteres anatómicos de sus distintos estratos han sido descritos antes (Reynolds, 1924) aunque no de forma completa.

Después de la polinización y a medida que transcurre el desarrollo de los primordios seminales, la región que corresponde al gametofito, inicialmente en fase de núcleos libres, adquiere consistencia cada vez más compacta (gelatinosa) y en sus células se incrementa paulatinamente el contenido de sustancias de reserva. El análisis microscópico preliminar realizado a los gametofitos de marzo reveló la presencia de numerosos arquegonios en distintas partes de su superficie, y el tejido que lo constituye es de color blanco hueso e

hialino, lo que refleja un grado de hidratación elevado. Esta fase puede considerarse la de un gametofito maduro en la etapa previa a ser fecundado y en la cual también ha ocurrido el desarrollo completo del microgametofito.

En la figura 3 se evidencia la presencia de arquegonios agrupados en una zona de un explanto correspondiente al mes de marzo.

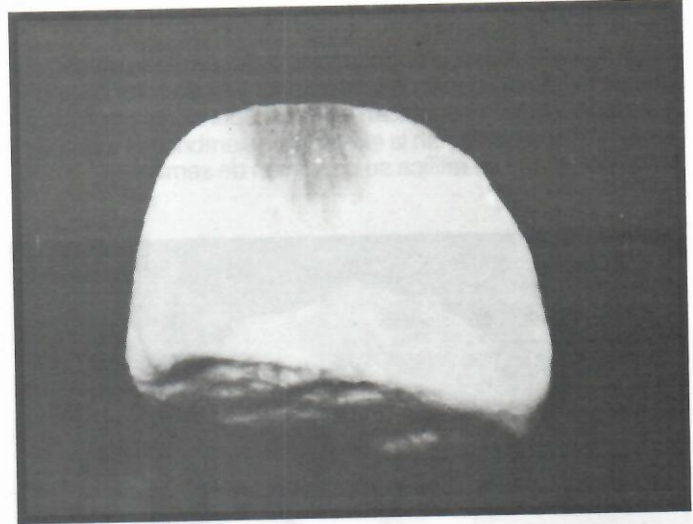


Fig 3. Explanto correspondiente al macrogametofito de *Microcycas calocoma* en una etapa previa a la fecundación. Se observan numerosos arquegonios agrupados en una región del explanto.

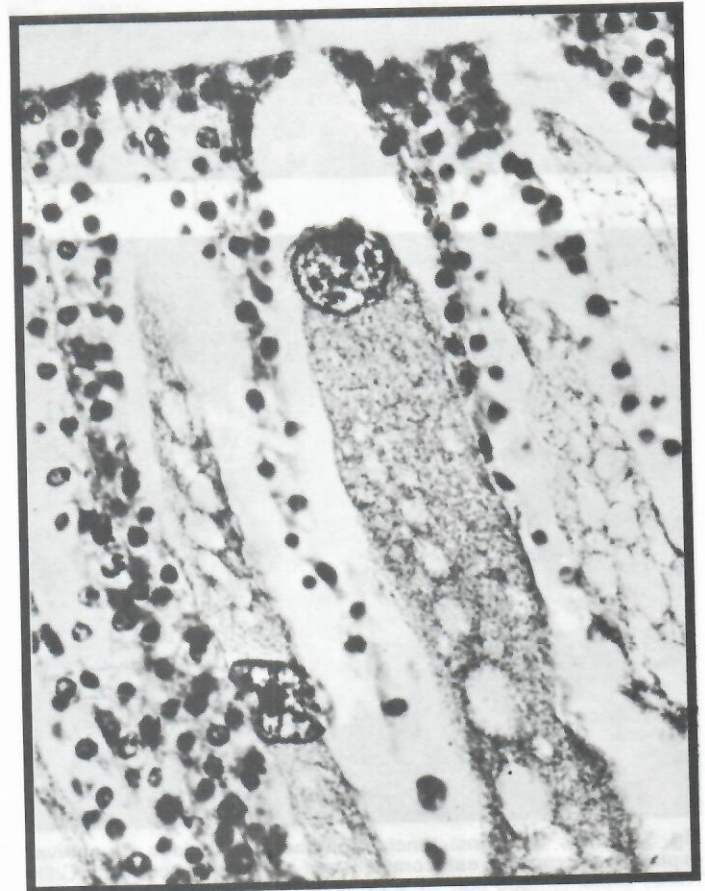
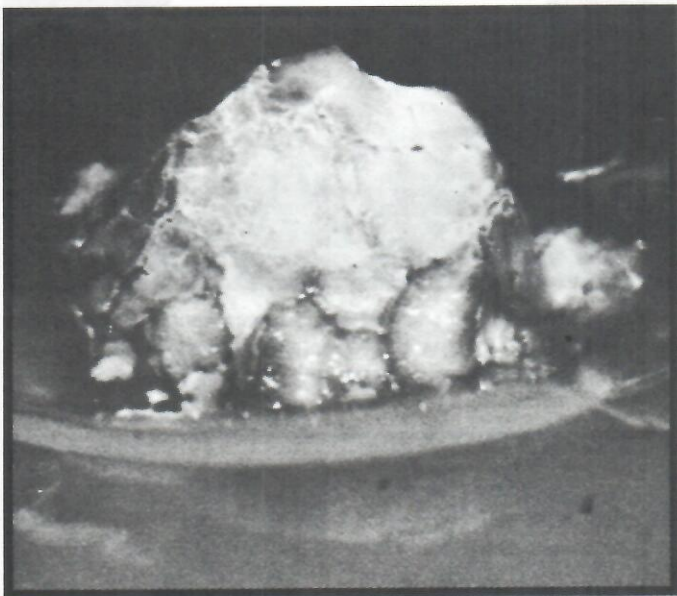


Fig 4. Corte longitudinal a la región de formación de embriones de *Microcycas calocoma*. En el interior de un arquegorio se observa la etapa inmediatamente posterior a la fecundación.

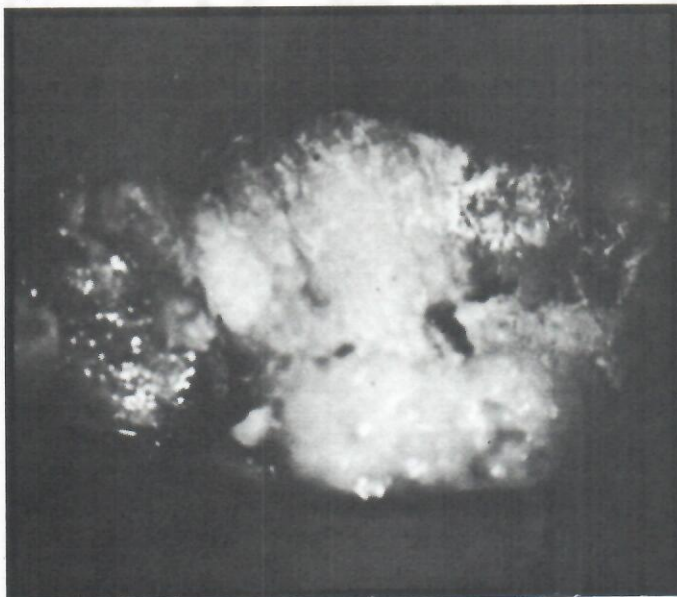
Los explantos de abril, aunque con coloración similar a los de la etapa anterior, constituyen el endospermo primario de las semillas, están mucho menos hidratados y ofrecen mayor resistencia al corte. Estos explantos constituyen una fase posterior a la fecundación donde se inicia la formación del embrión. Evidencia de que ha ocurrido la fecundación se muestra en la figura 4, donde se presenta un corte longitudinal realizado a la zona de los arquegonios en cuyo interior se observa una etapa inmediatamente posterior a la fecundación.

Finalmente en mayo, el endospermo de la semilla se presenta menos hidratado que en la fase anterior y es de color blanco. Asociado a éste, se destacan largos suspensores arrollados en espiral que confirman la existencia de embriones a simple vista, por lo que se ratifica su condición de semilla.

A)



B)



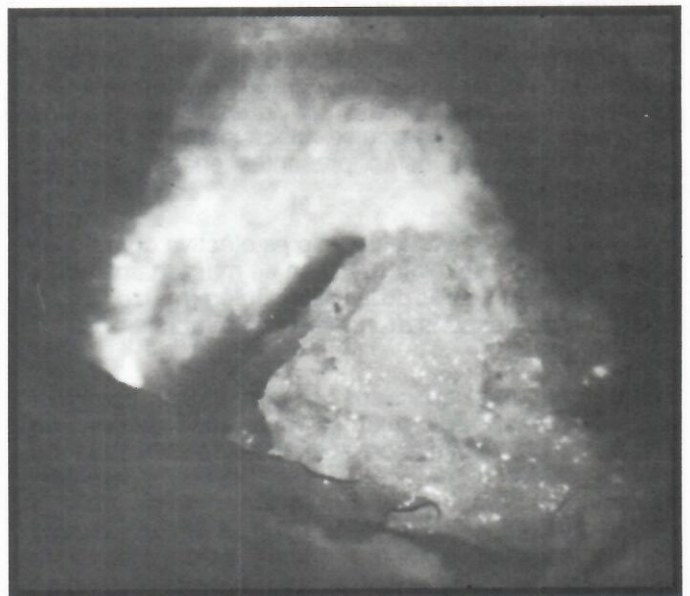
**Fig 5. Callos de consistencia compacta obtenidos al cultivar explantos *Microcyca calocoma* en medio reportado por Peña y Grillo (1982) suplementado con 15 % de agua de coco y 10 mg/l de ANA durante 21 días. a, callo a partir de un macrogametofito (marzo) en que se observa tejido compacto cuyo color corresponde al del tegumento externo que envuelve al macrogametofito en esta etapa (rosa pálido); b, callo correspondiente a una fase inicial en el desarrollo de la semilla (abril) en que se produce proliferación de tejido con coloración variable desde un rosado intenso hacia la izquierda hasta la crema a la derecha.**

Todas las respuestas que se describen son generales para los tratamientos aplicados, o sea que se produjeron en más del 80 % de los tubos inoculados.

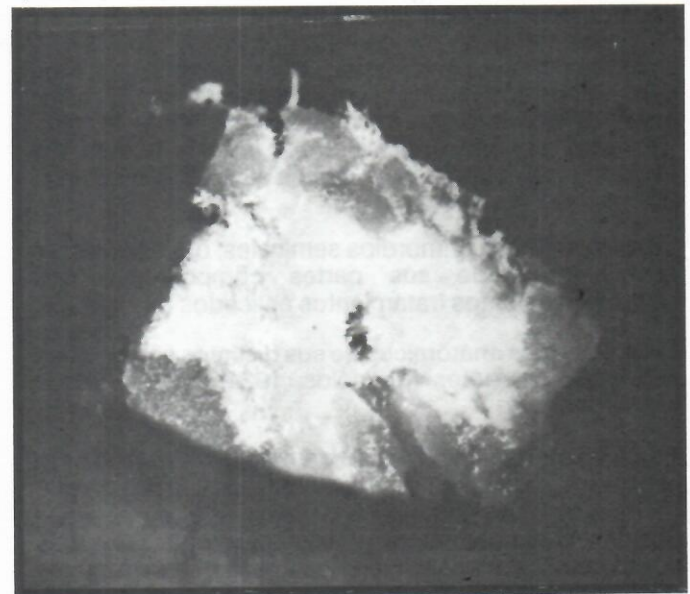
En cuanto al grado de proliferación de tejido neoformado a los 21 días pueden destacarse los resultados obtenidos en el medio suplementado con agua de coco al 15 % y 10 mg/l de ANA. En la figura 5 se evidencian el tamaño y consistencia compacta de los callos que varían entre el color crema y rosado.

En el resto de los casos no existen grandes diferencias en el tamaño de los callos obtenidos pero se presentan grandes variaciones en la textura y coloración del tejido neoformado las cuales no se relacionan a la fuente de explanto ni a las concentraciones de los suplementos aplicados al medio mineral. En la figura 6 se observa un callo compacto y uno friable de crecimiento algo limitado.

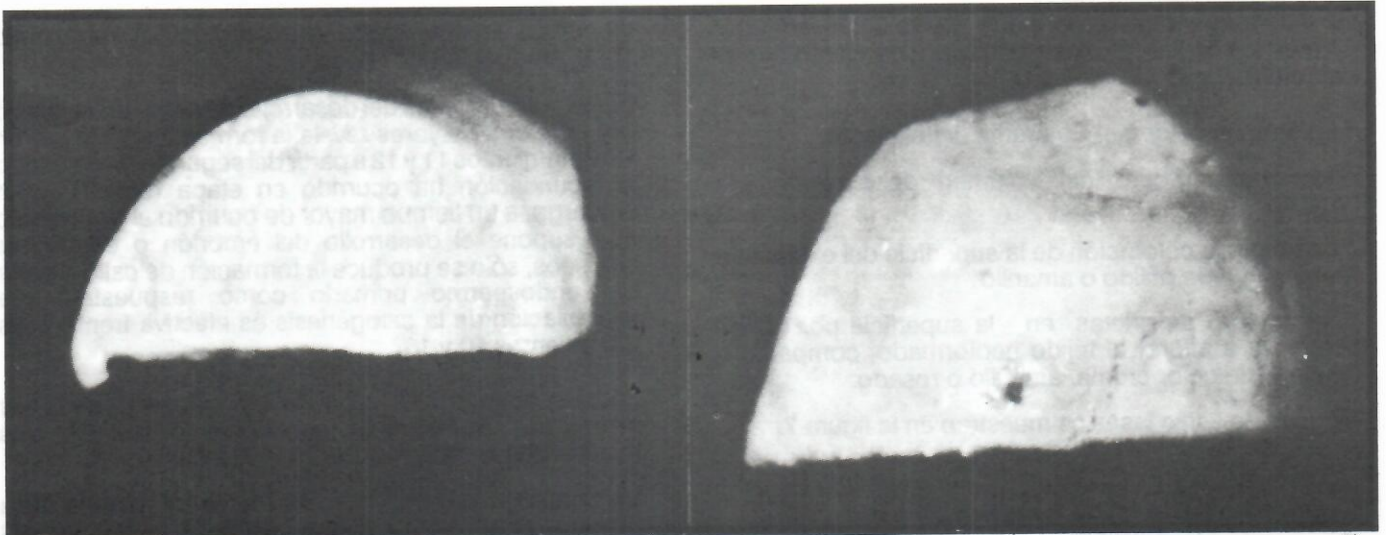
A)



B)

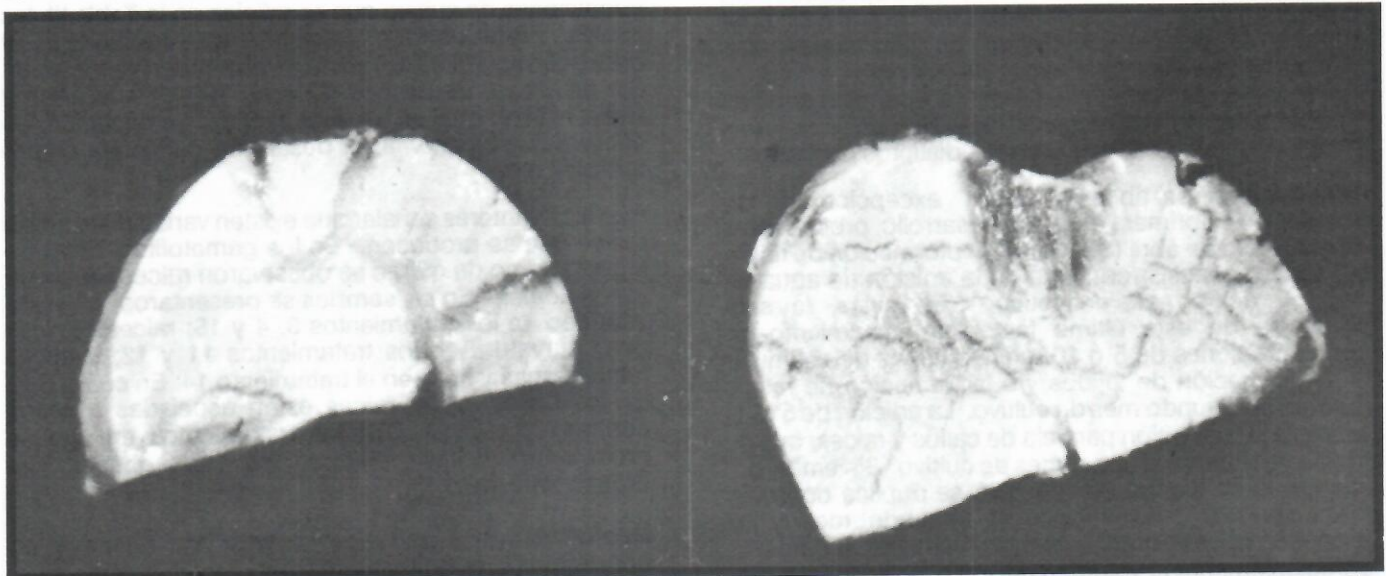


**Fig 6. Variaciones en la textura de los callos de *Microcyca calocoma* obtenidos en el medio reportado por Peña y Grillo (1982) suplementado con 5 mg/l de ANA y 10 % de agua de coco después de 21 días de cultivo. a, callo compacto de color crema; b, callo friable de color blanco a ligeramente amarillo.**



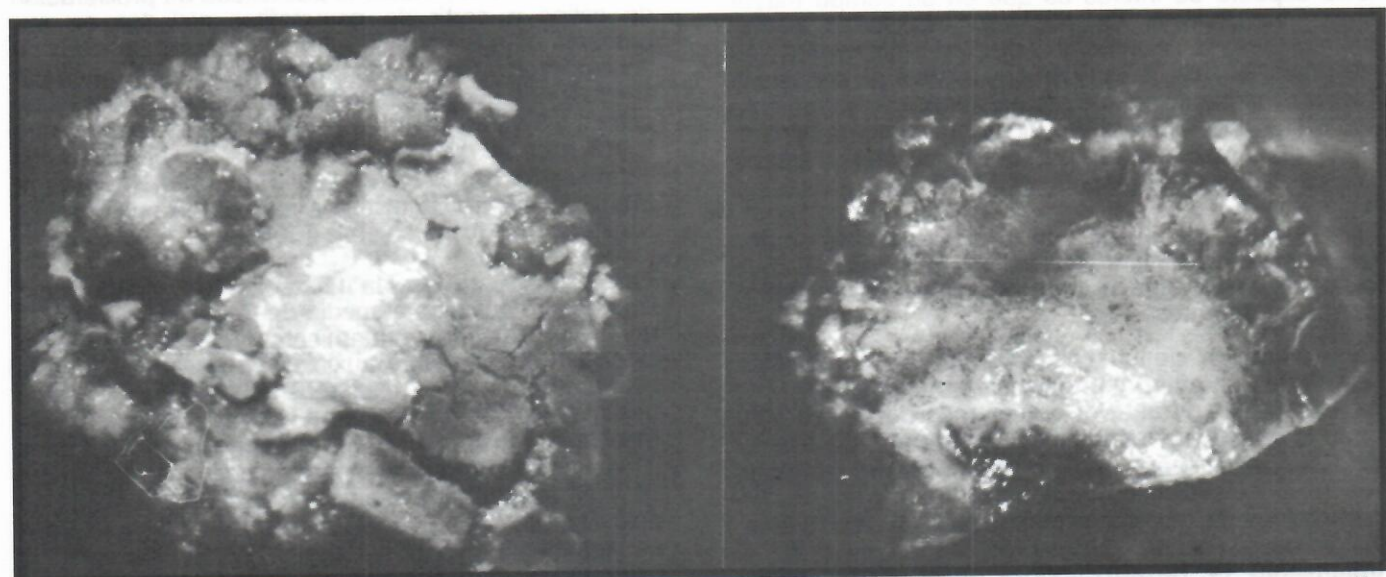
A)

B)



C)

D)



E)

F)

**Fig. 7** Proceso de formación de callos en *Microcycas calocoma*. a, toma de color blanco-crema del explanto del gametofito (incremento ligero de volumen (marzo); b, toma de color blanco-crema del explanto que corresponde a la fase inicial del desarrollo de la semilla (abril) y su crecimiento ligero en volumen; c, formación de grietas en la superficie del explanto de macrogametofito por el inicio de la proliferación; d, formación de grietas en el explanto correspondiente a la fase inicial del desarrollo de una semilla; e, callo visible a partir del macrogametofito; f, callo visible a partir de una fase inicial del desarrollo.

De manera general siempre que ocurre un desarrollo in vitro de los explantos existe un comportamiento que se caracteriza por:

- \* la toma de color blanco-crema del explanto
- \* incremento ligero del volumen del explanto por hinchamiento
- \* cambios de coloración de la superficie del explanto a rosado, verde pálido o amarillo
- \* formación de grietas en la superficie por donde comienza a aflorar el tejido neoformado, compacto o friable y de color crema, amarillo o rosado.

Algunas de estas fases se muestran en la figura 7.

### Neoformación de tejido y organogénesis.

Los estudios, en las mismas condiciones aplicadas para la producción acelerada de callos, se continuaron para conocer la posible efectividad de los tratamientos aplicados a las distintas fuentes de explanto en tiempos mayores. En la Tabla III se presentan los resultados de las evaluaciones realizadas al cabo de uno, dos y tres meses después de inoculados los distintos explantos.

Primeramente se observa, que a excepción de las semillas en su primera etapa de desarrollo, procedentes de la colecta de abril (SEM 1), la neoformación de tejido y/o organogénesis requieren de la adición de agua de coco y ácido naftalenacético. En éstas, la sola presencia de este último factor de crecimiento en concentraciones de 5 ó 10 mg/l es capaz de estimular la neoformación de tejidos y/o la formación de raíces durante el segundo mes de cultivo. La adición de 5 mg/l estimula la formación paralela de callos y raíces, que se mantiene durante el tercer mes de cultivo. Sin embargo, cuando la concentración de ANA se duplica ocurre la formación de callo durante el segundo mes y se producen raíces durante el tercer mes sin que aumente apreciablemente el volumen del callo.

Otro aspecto de interés es que en un tiempo mayor todas las fuentes de explanto inoculadas fueron estimuladas a excepción de los primordios no polinizados. Resulta curioso que a pesar de ser ésta la fuente de explanto en que están sometidas a tratamiento todas sus partes integrantes, no exista respuesta a partir de ninguna de ellas; más aún si se considera el estado fisiológico a que corresponde.

La inducción de tejidos con la aplicación de ambos factores de crecimiento ocurre en tratamientos cuyo balance entre el agua de coco y el ácido naftalenacético son bien diferentes.

La producción de un callo a partir de gametofitos colectados en enero y provistos de cubiertas (GAM 1) es estimulada durante el primer mes de cultivo sólo cuando se aplica el tratamiento 16. Sin embargo, a partir del segundo mes, es posible obtener además, respuestas efectivas en los tratamientos 11, 12 y 15. En gametofitos de febrero, la respuesta es bien diferente. En éstos (GAM 2), sólo se origina un callo en el tratamiento 14, desarrollándose en el mismo, raíces durante el tercer mes de cultivo. Igual respuesta organogenética se produce en el tratamiento 10. Finalmente, la producción de callo en los gametofitos de marzo (GAM 3) continúa desde su origen acelerado (anterior a los 21 días) hasta transcurridos los 3 meses

de cultivo sin que ocurra, a excepción del tratamiento 10, la producción de raíces.

En las fases iniciales del desarrollo de semillas, el cultivo por períodos mayores revela la formación de raíces en los tratamientos 11 y 12 a partir del segundo mes cuando la fecundación ha ocurrido en etapa reciente. Sin embargo, a un tiempo mayor de ocurrido el proceso, lo cual supone el desarrollo del embrión o embriones cigóticos, sólo se produce la formación de callo a partir del endospermo primario como respuesta. La estimulación de la calogénesis es efectiva frente a los tratamientos 10 y 16.

Todo lo anterior revela que la calogénesis puede ser estimulada en tiempos superiores a los 21 días resultando los tratamientos 15 y 16 los mejores.

En cuanto a la formación de raíces, a primera vista pudiera pensarse que ésta se produce al someter las semillas en sus fases iniciales de desarrollo a las condiciones de cultivo que se reflejan en la Tabla III, las cuales promueven o aceleran su crecimiento y desarrollo a partir de la radícula del embrión ya formado. Sin embargo, se conoce (Dorety, 1909; Peña, Díaz y Grillo, 1986) que en el proceso de germinación de *Microcycas calocoma*, el desarrollo de la raíz ocurre tardíamente.

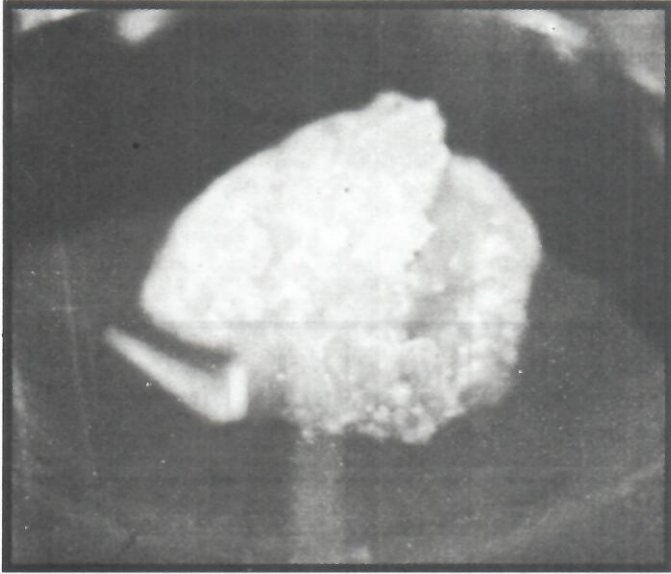
Resulta de interés señalar que existen variaciones en las raíces que se producen. En los gametofitos, tanto de febrero como de marzo se observaron raíces rectas de forma cónica. En las semillas se presentaron raíces de este tipo en los tratamientos 3, 4 y 15; raíces cónicas con curvatura en los tratamientos 11 y 12; y raíces rectas largas y finas en el tratamiento 14. En cualquiera de los casos, estas raíces están asociadas a callos compactos. O sea, en los tratamientos en que se produjeron callos friables no se observó la organogénesis.

### Neoformación a partir de gametofitos aislados en condiciones de cultivo variados.

Primeramente se estudió la posibilidad de proliferación de callos a partir de gametofitos aislados en sus primeras etapas de desarrollo, tres meses después de la polinización (enero) los cuales se caracterizaban por ser de forma ovoide, de color blanco hueso y oscilaban entre 4 y 5 mm de diámetro según su eje mayor y entre 2 y 3 mm de diámetro ecuatorial. Se aplicaron los tratamientos 16, 17, 18, 19, 20 y 21 durante 30 días para evaluar el efecto de distintos medios de cultivo. Los resultados se observan en la Tabla IV.

Resulta evidente que la utilización del 2,4-D como suplemento auxínico al medio de Peña y Grillo (1982), que constituyen los tratamientos 18 y 19, no resulta favorable como fuente auxínica ya que no induce la calogénesis. Los explantos sometidos a estos tratamientos se mantuvieron durante 5 meses sin resultados satisfactorios. Sin embargo, al trasplantarlos a los medios que se corresponden con los tratamientos 16 y 17 reaccionaron como los que originalmente se cultivaron en éstos, lo cual demuestra que los explantos se mantienen vivos y que el ANA favorece la calogénesis, lo que se observa en la figura 8.

En los explantos tratados con 10 mg/l de ANA y 15 % de agua de coco como suplementos al medio reportado por nosotros (Peña y Grillo, 1982) se obtiene un elevado porcentaje de callos compactos. La aplicación de carbón activo redujo la oxidación que se produce



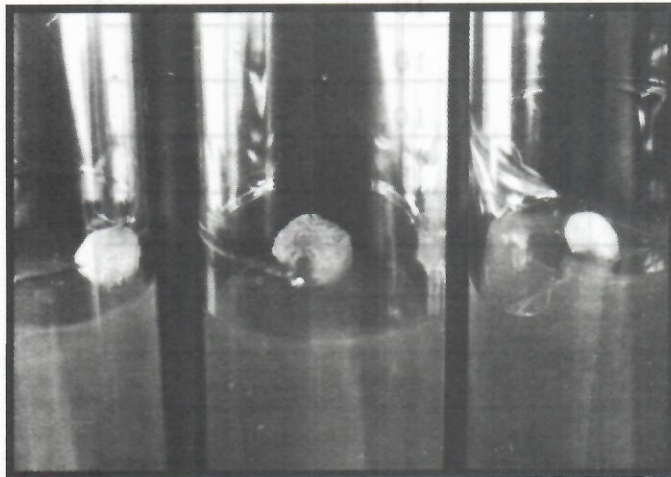
**Fig 8.** Callo obtenido 21 días después de trasplantar un gametofito aislado del medio 19 al medio 17. Se demuestra la efectividad del ANA en la proliferación del tejido en los gametofitos que se mantuvieron durante 5 meses en el mismo medio pero con 2,4-D como fuente auxínica.

elevado y que tienen el mismo ritmo de crecimiento y textura semejante. Estos resultados se muestran en la figura 10. Sin embargo, al cultivar los explantos en el medio 21 reportado por Norstog y Rhamstine en el cultivo in vitro de otra Cycadaceae (Norstog y Rhamstine, 1967) sólo se obtiene un 12 % de explantos en que se originan callos friables de crecimiento muy limitado. Debe destacarse que este medio contiene adenina y no tiene incorporada ninguna fuente auxínica.

Finalmente se probó el efecto de cultivar los macrogamefitos que no habían desarrollado callos después de 5 meses de cultivo en los medios utilizados en presencia y ausencia de luz. Los explantos, mantenidos en sus medios originales, se sembraron en todos los casos con y sin carbón activado. Los resultados fueron variados y demuestran que en ausencia de luz, la producción de callos se favorece en algunos medios marcadamente, tanto como en sus características.

El medio reportado por Peña y Grillo (1982) resultó el mejor cuando los explantos fueron transferidos a oscuridad total. En general, la ausencia de luz favorece el ritmo de crecimiento y disminuye la oxidación de los tejidos neoformados, los que además, son más friables. También se manifestaron efectos inhibitorios, total o parcial, como resultado de la adición de carbón activado en algunos medios de cultivo, mientras que resultó en la estimulación para la producción de callos en otros.

Aunque lejos aún de considerar posible la obtención masiva de plántulas de *Microcycas* a partir de estas técnicas, los resultados alcanzados son de valor en los intentos de conservar esta valiosa especie.



**Fig 9.** Aspecto de la neoformación de tejido obtenida en el medio reportado por Peña y Grillo (1982) suplementado con 10 mg/l de ANA y 15% de agua de coco utilizando carbón activo, después de 1 mes en el cultivo. Se muestra variaciones en la coloración y proliferación.

inicialmente en los explantos y parece favorecer el desarrollo que se alcanza en los callos pasado un mes en las condiciones de cultivo, lo que se observa en la figura 9. La gran proliferación obtenida en el tratamiento 17 al cabo del mes refleja que estos callos se originan de manera acelerada.

Resultados semejantes se obtuvieron de cultivar estos gametofitos en el medio reportado por Nitsch para la obtención de plantas haploides o a partir de granos de polen de tabaco (Nitsch y Nitsch, 1969) al que suplementa con 1 mg/l de ácido indol-3 acético (Tratamiento 21). Se logran callos en un porcentaje

**Tabla I.** Tratamientos utilizados para la evaluación del comportamiento de *Microcycas calocoma* "in vitro". ANA, ácido naftalenacético; 2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético; AIA, ácido indol-3 acético.

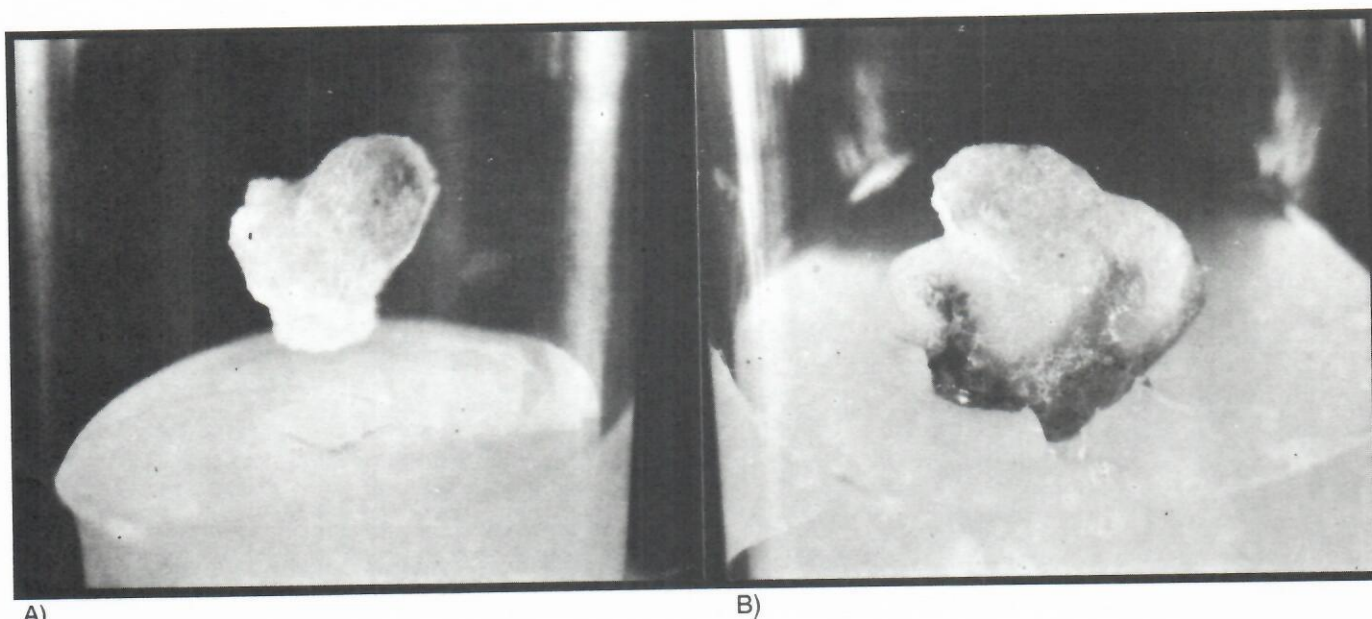
MEDIO NUTRITIVO	SUPLEMENTO		Carbón activo (en gr)	ANA (mg/l)	Agua de Coco (%)	2,4-D (mg/l)	AIA (mg/l)
	TRATAMIENTO						
Peña y Grillo (1982)	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	1	-	-	-
	3	-	-	5	-	-	-
	4	-	-	10	-	-	-
	5	-	-	-	5	-	-
	6	-	-	1	5	-	-
	7	-	-	5	5	-	-
	8	-	-	10	5	-	-
	9	-	-	-	10	-	-
	10	-	-	1	10	-	-
	11	-	-	5	10	-	-
	12	-	-	10	10	-	-
	13	-	-	-	15	-	-
	14	-	-	1	15	-	-
	15	-	-	5	15	-	-
	16	-	-	10	15	-	-
	17	1	-	10	15	-	-
	18	-	-	-	15	10	-
	19	1	-	-	15	10	-
Medio 21 Norstog y Rhamstine (1967)	20	-	-	-	-	-	-
Medio 1 Nitsch y Nitsch (1969)	21	-	-	-	-	-	1

Tabla II. Producción acelerada de callos (21 días) a partir de diferentes fuentes de explante en el medio reportado por Peña y Grillo (1982) suplemento con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético y agua de coco bajo condiciones de iluminación constante. (Tratamientos del 1 al 16).

AGUA DE COCO (%)	FUENTE DE EXPLANTE	ANA (mg/l)				
		0	1	5	10	
0	PRIMORDIOS SEMINALES	sep.	-	-	-	-
	GAMETOFITOS	ene.	-	-	-	-
		feb.	-	-	-	-
		mar.	-	-	-	-
		abr.	-	-	-	-
	FASES INICIALES DE SEMILLA	may.	-	-	-	-
5	PRIMORDIOS SEMINALES	sep.	-	-	-	-
	GAMETOFITOS	ene.	-	-	-	-
		feb.	-	-	-	-
		mar.	-	callo	callo	callo
		abr.	-	-	-	-
	FASES INICIALES DE SEMILLA	may.	-	-	-	-
10	PRIMORDIOS SEMINALES	sep.	-	-	-	-
	GAMETOFITOS	ene.	-	-	-	-
		feb.	-	-	-	-
		mar.	-	callo	callo	callo
		abr.	-	-	callo	callo
	FASES INICIALES DE SEMILLA	may.	-	-	-	-
15	PRIMORDIOS SEMINALES	sep.	-	-	-	-
	GAMETOFITOS	ene.	-	-	-	-
		feb.	-	-	-	-
		mar.	-	callo	callo	callo
		abr.	-	-	callo	callo
	FASES INICIALES DE SEMILLA	may.	-	-	-	-

**Tabla III.** Neoformación de tejidos y organogénesis "in vitro" de *Microcycas calocoma* en el medio de Peña y Grillo (1982). A, meses en que se evalúa la respuesta a los tratamientos; B, tipo de explante utilizado; GAM 1, gametofitos colectados en enero; GAM 2, gametofitos colectados en febrero; GAM 3, gametofitos colectados en marzo; SEM 1, fase inicial de semilla (abril); SEM 2, fase inicial de semilla (mayo).

A COCO	ANA MG/L	0			1			5			10			
		B	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	OVULOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GAM 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GAM 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GAM 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SEM 1	-	-	-	-	-	-	-	-	CALLO RAICES	CALLO RAICES	-	CALLO	RAICES
	SEM 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	OVULOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GAM 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GAM 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GAM 3	-	-	-	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO
	SEM 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SEM 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	OVULOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GAM 1	-	-	-	-	-	-	-	CALLO	CALLO	-	CALLO	CALLO	
	GAM 2	-	-	-	-	RAICES	RAICES	-	-	-	-	-	-	
	GAM 3	-	-	-	CALLO	CALLO	RAICES	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	
	SEM 1	-	-	-	-	-	-	CALLO	CALLO RAICES	CALLO RAICES	CALLO	CALLO RAICES	CALLO RAICES	
	SEM 2	-	-	-	-	CALLO	CALLO	-	-	-	-	-	-	
15	OVULOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GAM 1	-	-	-	-	-	-	-	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	
	GAM 2	-	-	-	-	CALLO	CALLO RAICES	-	-	-	-	-	-	
	GAM 3	-	-	-	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	CALLO	
	SEM 1	-	-	-	-	CALLO	RAICES	CALLO	CALLO	CALLO RAICES	CALLO	CALLO	CALLO	
	SEM 2	-	-	-	-	-	-	-	CALLO	CALLO	-	CALLO	CALLO	



**Fig 10** Aspecto de la neoformación de tejido obtenida al cabo de 30 días en el medio de Nitsch (1969). a, proliferación de tejido localizada hacia un polo del explanto. b, proliferación del tejido en todas direcciones.

**Tabla IV.** Proliferación de tejido de gametofitos aislados de *Microcycas calocoma* en distintos medios de cultivo al cabo de un mes bajo iluminación blanca artificial de poca intensidad. Ausencia de proliferación (-); proliferación muy limitada en zonas dispersas de la superficie (+); crecimiento medio (++); buen crecimiento a partir de una o más zonas, (+++).

TRATAMIENTO	% CALOGENESIS	TIPO DE CALLO	DESARROLLO
16	80	COMPACTO	++
17	84	COMPACTO	+++
18	0	-	-
19	0	-	-
20	12	FRIABLE	+
21	88	COMPACTO	+++

#### BIBLIOGRAFIA

- Del Risco, E; J. Morell y V. Samek (1984). Algunos apuntes sobre *Microcycas calocoma* (Miq.) A.D.C. Revista del Jardín Botánico Nacional, Vol. V, No.1, p. 111-131.
- Dorety, H.A. (1909). Vascular anatomy of the seedling of *Microcycas calocoma*. Bot. Gazette. Vol. 47, p. 139-147.
- Nitsch, J.P. and C. Nitsch (1969). Haploid plants from pollen grains. Science, Vol. 163 p. 85-87.
- Norstog, K. and E. Rhamstine (1967). Isolation and culture of haploid and diploid Cycad tissues. Phytomorphology, march-dec. Vol. 17, p.374-381.
- Peña, E. y E. Grillo (1982). Proliferación de *Microcycas calocoma* (Miq.) A.D.C. *in vitro*. Revista del Jardín Botánico Nacional Vol. III, No. 2, p. 177-196.
- Peña, E.; E. Grillo y M. Ruíz (1985). Metabolitos secundarios en Cycadaceae. I: Estudio de los tipos de metabolitos secundarios en especies de los géneros *Microcycas*, *Dioon*, *Cycas*, *Zamia* y *Ceratozamia*. Revista del Jardín Botánico Nacional, Vol. VI, No. 1, p. 125-133.
- Peña, E. ; L. Díaz y E. Grillo (1986). *Microcycas calocoma*: Caracteres de la semilla y su germinación. Revista del Jardín Botánico Nacional, Vol. VIII, No. 3, p. 55-70.
- Peña, E.; R. Chaves y O. Pimentel (1988). *Microcycas calocoma*: hallazgos interesantes con vistas a sus posibilidades de conservación. Revista del Jardín Botánico Nacional, Vol. IX, No. 2 p. 84-99.
- Reynolds, L.G. (1924). Female gametophyte of *Microcycas*. Bot. Gazette, Vol. 77 p. 391-403.

**Recibido:** 26 de noviembre de 1991