

Estudio morfogénico de *Zamia skinneri* Warszewicz, empleando megagametófitos y embriones zigóticos

Fecha de recepción: 30/10/06

Fecha de aceptación: 20/11/06

Tomás Palma Zúñiga¹

Se realizó un estudio de brotes y embriones adventicios a partir de secciones de megagametófito y embriones zigóticos de Zamia skinneri, que empleó como medio primario para la obtención del callo los macroelementos del medio B5 (Gamborg) y los microelementos del medio de Murashige y Skoog, suplementado con 6 dosis de 2,4-D, desde 0 a 2,5 mg/l.

Palabras claves

Zamia skinneri, organogénesis, embriogénesis, micropropagación.

Key words

Zamiacea-gymnosperm - organogenesis-somatic embryogenesis micropropagation.

Resumen

Se realizó un estudio de brotes y embriones adventicios a partir de secciones de megagametófito y embriones zigóticos de *Zamia skinneri*, que empleó como medio primario para la obtención del callo los macroelementos del medio B5 (Gamborg) y los microelementos del medio de Murashige y Skoog, suplementado con 6 dosis de 2,4-D, desde 0 a 2,5 mg/l. Los callos derivados de megagametofitos se subcultivaron a un medio de cultivo que contenía los macroelementos y microelementos de Murashige y Skoog, y se estudió su respuesta a 6 dosis de kinetina (desde 0 a 2,5 mg/l).

La iniciación y crecimiento del callo en megagametófitos de *Zamia* fue evidente a partir de las 4 semanas en todos los medios de cultivo estudiados, excepto en el medio carente de 2,4-D.

Los callos subcultivados en el medio de cultivo que contenía los macroelementos Gamborg y los microelementos MS, enriquecido con glutamina, asparagina y caseína hidrolizada, suplementado con 2 mg/l de kinetina, permitió la regeneración de estructuras a las 5 semanas después del subcultivo. Una semana después de esta evaluación, se formaron tres estructuras más en el medio del cultivo suplementado con 1 mg/l de kinetina y una estructura en el medio de cultivo carente de reguladores del crecimiento.

Las dosis de 5 mg/l de kinetina tienden a disminuir el número de estructuras organizadas, en comparación con la dosis de 3 mg/l de kinetina, esto en la 3^a, 4^a y 5^a semana de evaluación.

El medio basal MS sin reguladores de crecimiento permitió el desarrollo de estructuras organizadas a partir de

1. Investigador, Laboratorio Biotecnología de plantas tropicales. Escuela Ingeniería en Agronomía, Instituto Tecnológico de Costa Rica

la octava semana de evaluación (174 estructuras). Esta condición se presentó hasta la doceava semana de evaluación cuando se contabilizaron 321 estructuras organizadas.

Abstract

Organogenesis and somatic embryogenesis were induced from megagametophyte and zygotic embryo explants of *Zamia skinneri* on modified B5 medium containing 2, 4-D kinetin (0–2,5 mg. l⁻¹) and kinetin (0–5 mg. L⁻¹).

Callogenesis was obtained in all media supplemented with auxin.

Explants differentiated somatic embryos when cultured on Murashige and Skoog medium (MS) with 400 mg/l glutamine, 100 mg/l, asparagin and 100 mg/l hidrolized casein, 3 % sucrose and six concentrations of kinetin (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 and 2,5 mgL⁻¹).

The embryos matured and germinated on MS medium without growth regulators. The somatic embryos developed into normal plants.

Introducción

La *Zamia skinneri* Warszewicz pertenece a la familia Zamiaceae, anteriormente Cycadaceae. Es una planta prehistórica y es conocida en el mercado internacional como “planta de plástico” por la textura de sus hojas (foliolos). Es una planta de crecimiento lento, de larga vida y, además, es dioica.

La zamia es un recurso no maderable del bosque utilizado como planta ornamental. En la década de los años ochentas, la extracción ilegal de *Zamia* en Costa Rica se realizó con miras a exportarla como producto ornamental. A partir de los años noventas se incrementó su extracción debido a los siguientes factores:

- Necesidad de nuevos productos para un mercado internacional más competitivo.

- Interés del mercado japonés en curiosidades tropicales.
- El auge de la industria ornamental en el país.
- La difusión que han tenido los productos no maderables del bosque por parte de proyectos e instituciones en lo que a recursos ornamentales nativos se refiere.

Esta situación provocó la extracción de semillas, trozos de tallo y plantas adultas de los bosques.

La micropropagación en condiciones controladas de laboratorio es una herramienta que permite la obtención masiva de plantas bajo el concepto de desarrollo sostenible, que proporcionan plantas para una explotación con fines comerciales. Además, se estaría resolviendo el problema de la carencia de semilla ya que es producida por la plantas cada 6 años.

A pesar de que, hasta el momento, no hay experiencias de propagación por medio de cultivo de tejidos en *Zamia skinneri*, sí se han podido micropropagar otras especies como la *Zamia integrifolia* (Norstog, 1965); *Zamia pumilla* (Webbs, et ál. 1983; Chavez et ál., 1992), *Zamia fisheri*, *Zamia furfuracea* (Chavez et ál., 1992) y *Ceratozamia hildae* (Litz et ál., 1995).

Los primeros intentos de micropropagar la *Zamia* en la especie *integrifolia* y *pumilla* fueron realizados por Norstog, (1965), empleando tejidos del megagametofito a través de la ruta de organogénesis o embriogénesis somática. Posteriormente, Webbs et ál., (1983) realizaron estudios de micropropagación en *Zamia pumilla* empleando diferentes partes de embriones maduros de esta especie.

Otros intentos de micropropagar *Zamia*, pero en las especies *fisheri* y *furfuracea*, además de *pumilla*, fueron realizados por Chávez et ál. 1992. El medio de cultivo empleado en estas especies consistió de las sales macroelementos B5 (Gambor

et al, 1968); microelementos y compuestos orgánicos propuestos por Murashige y Skoog (1962); enriquecidos con 400 mg l⁻¹ de glutamina, 100 mg l⁻¹ de ácido ascórbico, 100 mg l⁻¹ de caseína hidrolizada, 100 mg l⁻¹ de arginina, 100 mg l⁻¹ de aspargina, 60 g de sacarosa y 6,5 g de difco Bacto-agar, suplementado con diferentes dosis de kinetina y ácido dicloro fenoxiacético (2,4-D). Posteriormente Litz (1995) regeneró embriones somáticos a partir de hojas maduras de *Ceratozamia hildae*.

El objetivo general de este trabajo fue realizar un estudio morfogénico de *Zamia skinneri*, empleando secciones de megagametófitos y embriones zigóticos, que brinde información para desarrollar una metodología que permita su propagación masiva.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional de San Carlos.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional de San Carlos.

Los conos inmaduros o estróbilos de plantas de *Zamia* se seleccionaron del bosque secundario ubicado en el asentamiento campesino de la Gloria, Aguas Zarcas. La selección de plantas se hizo considerando el vigor y el estado fitosanitario: estas características se consideraron también para la inflorescencia femenina o estróbilo

Las semillas conteniendo el integumento se separaron del estróbilo y se desinfectaron con una solución de Benomyl + agrymicin 100 (1 g de cada uno en 1000 ml de agua) + 1 gota de tween 20 por cada 100 ml de agua, durante 20 minutos. Posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 20 minutos, y se trasladaron a la cámara de flujo laminar en donde se le practicaron tres lavados con agua destilada estéril. Seguidamente se le removió el integumento, exponiendo el megagametófito que se desinfectó

nuevamente en una solución de hipoclorito de sodio al 0,75%, y después de tres lavados con agua destilada y estéril, el megagametófito se disectó en dos partes. Cada sección de megagametófito, que contenía la mitad longitudinal del embrión, se empleó como explante.

Como medio primario para la obtención del callo se utilizaron los macroelementos del medio B5 (Gamborg, 1968) y los microelementos del medio de Murashige y Skoog (1962) suplementado con los siguientes compuestos orgánicos, vitaminas MS, 100 mg/l de mio-inositol, 400 mg/l de glutamina, 100 mg/l de ácido ascórbico., 100 mg/l de caseína hidrolizada, 100 mg/l de arginina, 100 mg/l de aspargina, 0,50 mg/l de ácido nicotínico; 0,50 mg/l de piridoxina-HCL; 0,10 mg/l de Tiamina-HCL, 60 g de sacarosa y se gelificó con 2,0 g de phytigel. Se dispensaron 15 ml de medio de cultivo en tubos de ensayo de 15 cm de longitud x 2,5 cm de diámetro. Los megagametófitos sembrados en el medio del cultivo se colocaron en un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo 0, a una temperatura de 27 °C y una humedad relativa de 80 %. Cuando las estructuras organizadas (embriones o brotes) desarrollaron una longitud de 2 cm, se trasladaron a un fotoperíodo de 16 horas y a una intensidad lumínica de 1000 lux inicialmente que luego se fue incrementando hasta llegar a 3000 lux.

Los callos derivados de megagametófitos se subcultivaron a un medio de cultivo que contenía los macroelementos y microelementos de Murashige y Skoog suplementado con 36.7 mg l⁻¹ de Fe EDTA, 100 mg l⁻¹ de mio-inositol, 0,4 mg l⁻¹ de tiamina-HCl, 3 % de sacarosa y 2 g l⁻¹ de phytigel como gelificante.

Desarrollo del callo

Para el desarrollo del callo, las secciones de megagametófito se cultivaron en un

medio de cultivo primario suplementado con diferentes dosis de 2,4-D (cuadro 1).

Desarrollo de estructuras organizadas

Para determinar el medio de cultivo que permitiera la organización de estructuras a partir del callo, se estudió su respuesta en un medio de cultivo secundario suplementado con 6 dosis de kinetina, tal y como se indica en el cuadro 2.

Cuadro 1. Dosis de 2,4-D aplicada a megagametófitos de *Zamia skinneri* para el desarrollo del callo

Tratamiento	Dosis de 2 4-D (mg/l)
1	0
2	0,5
3	1,0
4	1,5
5	2,0
6	2,5

Cuadro 2. Dosis de kinetina que suplementaron los medios de cultivo secundario para el desarrollo de estructuras organizadas a partir de un callo derivado de un megagametófito de *Zamia skinneri*

Tratamiento	Dosis de Kinetina (mg/L)
1	0
2	0,5
3	1,0
4	1,5
5	2,0
6	2,5

Histología

Para determinar el proceso morfogénico que originó las estructuras organizadas, una vez que el callo muestre estructuras globulares se fijaron en una mezcla de FAA y se procesaron mediante la técnica de infiltración de parafina según metodología descrita por Berlyn y Mikshe, 1976.

VARIABLES EVALUADAS

Para evaluar la respuesta de megagametófitos de *Zamia* en un medio de cultivo primario y secundario se evaluaron las siguientes variables.

1. Porcentaje de contaminación.
2. Porcentaje de respuesta de megagametófitos de *Zamia* que producen callo en un medio primario.
3. Características físicas del callo (compactación, color, forma)
4. Número de estructuras organizadas.

Análisis estadístico

Para estudiar el medio de cultivo suplementado con 2,4-D en que se promovió el desarrollo del callo, así como el medio de cultivo estudiado para el desarrollo de estructuras regeneradas de callo, los tratamientos se ordenaron en un diseño completamente aleatorio con 6 tratamientos y cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por 10 tubos de ensayo. El modelo estadístico para evaluar las respuestas del megagametofito a los medios de cultivo fue el siguiente:

$$Y_{ij} = M + T_{ij} + E_{ij}, \text{ en donde}$$

Y_{ij} = Variable de respuesta

T_{ij} = Efecto de los reguladores del crecimiento

E_{ij} = Error experimental

Las plantas regeneradas *in vitro*, que desarrollaron una longitud de 15 cm, se trasladaron al invernadero en donde se reguló la sombra y se aplicó riego nebulizado.

Resultados y discusión

Establecimiento aséptico de los megagametófitos inmaduros de *Zamia*

El megagametófito empleado como explante en este estudio se encuentra encerrado dentro de un integumento y este, a su vez, dentro del estróbilo, lo que asegura una total asepsia de esta estructura, esto aunado al proceso de desinfección garantizó un 100% de explantes asépticamente sembrados. Las secciones de megagametófito manifestaron un exudado similar a bacterias. Dos días después de la siembra, fue descartada la contaminación ya que al subcultivar a un medio fresco dicho exudado desapareció y el explante desarrolló el callo (figura 1 y figura 2).

La presencia de kinetina en el medio de cultivo no tuvo efecto sobre el crecimiento del callo según los resultados obtenidos del análisis de varianza practicado durante las 8 semanas de evaluación

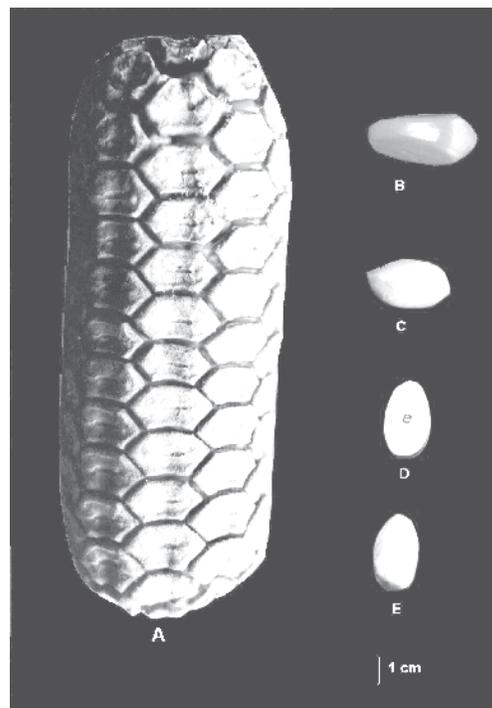


Figura 1. Cono inmaduro de *Zamia skinneri* (A), megagametófito con la sarcotesta (B), megagametófito con la esclerotesta (C), megagametófito que muestra el embrión disectado (D y E)

Respuesta del megagametófito de *Zamia skinneri* a diferentes dosis de 2,4-D

La iniciación y crecimiento del callo en megagametófitos de *Zamia*, fue evidente a partir de las 4 semanas en todos los medios de cultivo estudiados, excepto en el medio carente de 2,4-D (cuadro 3). Después de la séptima semana todos los explantes habían formado callo. Este callo se formó sobre la superficie expuesta del megagametófito, así como en la cara interna en donde se efectuó el corte de este. El callo formado fue friable, de color blanco cremoso y luego cambió a rosado pálido. Resultados similares fueron obtenidos por Chavez *et ál.*, 1992, cuando se emplearon secciones de megagametófito de tres especies de *Zamia*, a saber: *furfuracea*, *fisheri* y *pumilla*. La iniciación y crecimiento del callo en estas especies ocurrió 2 a 4 semanas después de la siembra y la mayor frecuencia de formación de callo se cuantificó en los medios conteniendo concentraciones de 2,4-D desde 1,0 hasta 2,0 mg/l.

Efecto de la kinetina en la morfogénesis del callo de *Zamia* obtenidos a partir de megagametófitos

La presencia de kinetina en el medio de cultivo no tuvo efecto sobre el crecimiento del callo según los resultados obtenidos del análisis de varianza practicado durante las 8 semanas de evaluación (cuadro 4). Durante este periodo no se observaron estructuras organizadas a partir del callo. La figura 4 muestra la curva de crecimiento observada para el incremento del callo durante ese periodo.

Para la organización de un callo hacia la embriogénesis u organogénesis, se requiere de un medio de cultivo sin auxinas y con dosis bajas de citocininas (Bhowani *et ál.*, 1983). En este estudio el callo se hizo crecer en un medio con bajas dosis de kinetina así como en un medio carente de él y no se observó la organización para la formación de estructuras, lo que

hace suponer que la presencia de las altas dosis de nitrógeno reducido es lo que inhibe la capacidad de organización de un callo. Estudios realizados con callos de ceratozamia derivados a partir de hojas de

plantas maduras, cuyos medios de cultivo también fueron enriquecidos con fuentes de nitrógeno reducidos, y suplementados con kinetina, mostraron inhibición a la morfogénesis (Litz *et ál.* 1995).

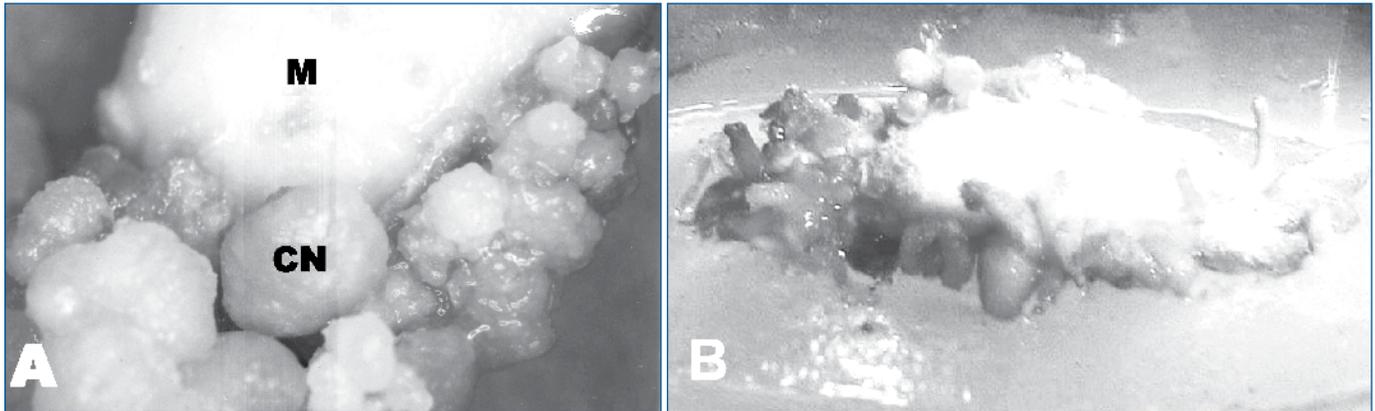


Figura 2. (A) Callo compacto nodular (CN) desarrollado a partir de una sección de megagametófito de *Zamia (Zamia skinneri)* a los 40 días después de la siembra y organogénesis directa (B), en un medio MS suplementado con 0,5 mg/l de 2,4D, 45 días después de la siembra

Cuadro 3. Porcentaje de megagametófitos de *Zamia skinneri* que formaron callo como respuesta a diferentes dosis de 2,4-D/1

2,4 -D mg/l	4ª semana	5ª semana	6ª semana	7ª semana	8 semana
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,5	75	80	90,0	100	100
1,0	75	75	80,0	100	100
1,5	75	75	80,0	100	100
2,0	80	80	87,5	100	100
2,5	80	80	87,5	100	100

/1 Promedio de 40 tubos de ensayo.

Después de la sexta semana, se observó un decrecimiento en el área del callo, posiblemente debido al agotamiento del tejido regenerativo y al necrosamiento, que se presentó en los callos que crecieron en el medio de cultivo suplementado con

las dosis más elevadas de de kinetina (4 y 5 mg/l). En los medios de cultivo suplementados con estas dosis de kinetina se obtuvieron valores de 5 a 30% de callos necrosados (cuadro 9).

Cuadro 4. Cuadrados medios, fuente de variación y significancia para el área de callo en *Zamia skinnerii*, como diferentes dosis de kinetina en diferentes edades después de la siembra.

Evaluaciones mensuales											
Fuente de variación	GL	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª
Error	15	0,002	0,002	0,003	0,003	0,051	0,116	0,112	0,111	0,013	0,016
Área de callo	5	0,003	0,003	0,009	0,026	0,074	0,117	0,116	0,106	0,007	0,005
C.V		10,75	10,75	9,47	24,28	26,41	36,47	35,06	34,51	20,55	20,57

La representación de las fases de crecimiento se representan en la figura 4. La fase de iniciación del callo transcurre en las dos primeras semanas de crecimiento y se caracteriza por la formación de un callo friable. La fase exponencial (o fase logarítmica) se manifestó a partir de la tercera semana, se prolongó hasta la sexta semana, y se caracterizó por un aumento de biomasa, constante y cuantificada a través de su área. Después de la fase exponencial, la tasa de crecimiento declina uniformemente con el tiempo y se caracteriza por una desaceleración progresiva del crecimiento para alcanzar,

finalmente, la fase estacionaria, en la cual no hay aumento neto en la síntesis de biomasa o área de callo (figura 4). Estas respuestas indican un agotamiento del tejido regenerativo del callo que estuvo acompañado de necrosamiento de los mismos causado, probablemente por las altas dosis de kinetina lo que también afectó su desarrollo y nivel de organización de estructuras.

Este comportamiento del crecimiento del callo nos indica que el callo debe ser trasladado a un medio basal secundario sin reguladores de crecimiento, a partir de la sexta semana. Este subcultivo, es recomendado por otros investigadores para obtener un desarrollo organizado de *Zamia pumilla* (Webb et ál., 1982).

Efecto de la kinetina en la organización de estructuras *in vitro*

Los callos subcultivados al medio de cultivo conteniendo los macroelementos Gambor y los microelementos MS y enriquecido con glutamina, aspargina y caseína hidrolizada y suplementado con 2 mg/l de kinetina permitió la regeneración de estructuras, a las 5 semanas después del subcultivo. Una semana después de esta evaluación, se formaron tres estructuras más en el medio de cultivo suplementado con 1 mg/l de kinetina y una estructura en

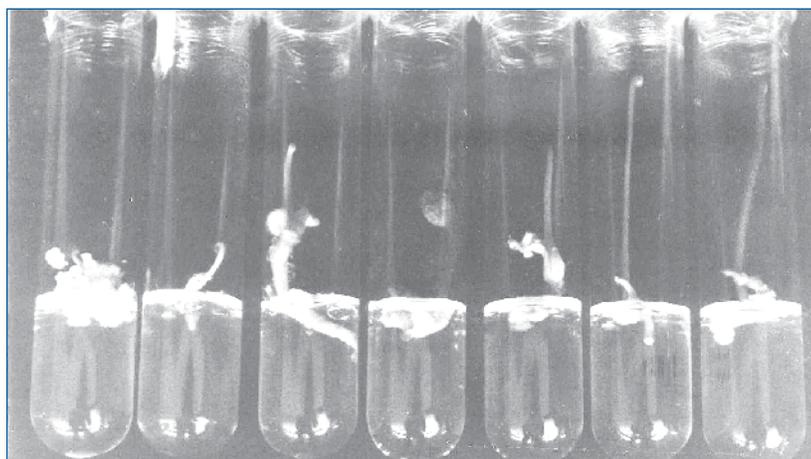


Figura 3. Eventos morfogénicos originados a partir de un callo en un megagametófito de *Zamia skinnerii* hasta el desarrollo de plántula

el medio de cultivo carente de reguladores del crecimiento. Cabe mencionar que el máximo desarrollo que pudo alcanzar cualquier embrión fue de 3mm de longitud; luego, detuvieron su crecimiento y, otros, fueron reabsorbidos por la misma masa de callo. También, se vieron afectados por el necrosamiento que hubo en los callos

a partir de la sexta semana, atribuible a las altas dosis de kinetina (cuadro 5). Se ha determinado que las altas dosis de citoquininas, inhiben la embriogénesis somática. Se reporta que en el caso de la kinetina, las bajas dosis se comportan igual que un testigo sin kinetina (Loiseau, 1995).

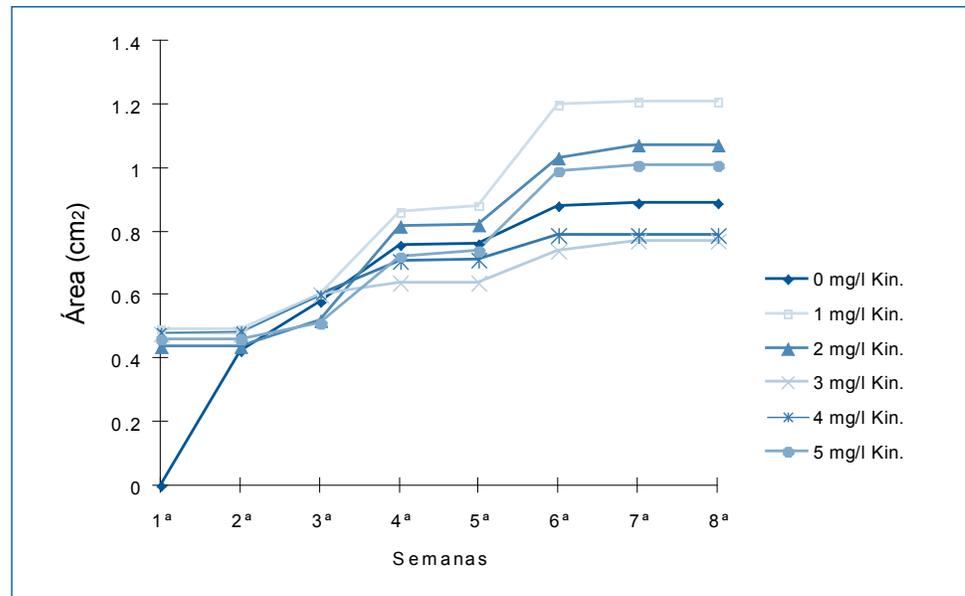


Figura 4. Incremento del área de los callos de *Zamia (Zamia skinnerii)*, como respuesta a diferentes dosis de kinetina

Cuadro 5. Incremento del área (cm²) de callo de *Zamia (Zamia skinnerii)* como respuesta a diferentes dosis de kinetina, evaluados semanalmente. /1

Dosis de kinetina (mg/l)	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
0	0,425±0,01	0,425±0,02	0,578±0,02	0,578±0,02	0,805±0,20	0,875±0,23	0,890±0,26	0,610±0,13
1	0,493±0,06	0,493±0,06	0,623±0,02	0,623±0,02	1,095±0,31	1,200±0,34	1,208±0,32	1,035±0,58
2	0,440±0,06	0,440±0,06	0,520±0,05	0,520±0,47	0,898±0,51	1,025±0,72	1,065±0,70	0,528±0,07
3	0,480±0,08	0,480±0,08	0,598±0,11	0,598±0,11	0,738±0,12	0,738±0,08	0,768±0,09	0,620±0,15
4	0,485±0,04	0,485±0,04	0,603±0,01	0,603±0,01	0,728±0,05	0,788±0,08	0,793±0,07	0,570±0,07
5	0,458±0,02	0,458±0,02	0,510±0,04	0,510±0,43	0,855±0,07	0,990±0,18	1,007±0,18	0,528±0,13

/1. Valores promedios ± desviación estándar.

Cuadro 6. Porcentaje de callos de *Zamia* (*Zamia skinnerii*) necrosados y cuantificados en un medio de cultivo, suplementado con diferentes dosis de kinetina, evaluado a partir de la quinta semana después de la siembra

Dosis de kinetina mg/l	5ª semana	6ª semana	7ª semana	8ª semana
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	0	0	5	5
3	0	0	5	15
4	0	5	15	20
5	0	10	20	30

Al evaluar el número de estructuras de *Zamia*, formadas a partir de callos provenientes de medios de cultivo suplementados con diferentes dosis de kinetina y subcultivados en un medio secundario, se determinaron diferencias altamente significativas, situación que se manifestó a partir de la segunda semana de evaluación hasta la quinta semana en todos los tratamientos (cuadro 7). Dicha tendencia se ajustó a una curva de regresión cuadrática (figura 5).

Las dosis de 5 mg/l de kinetina tienden a disminuir el número de estructuras organizadas en comparación con la dosis de 3 mg/l de kinetina, esto en la 3ª, 4ª y 5ª semana de evaluación.

En cuanto a la longitud de las estructuras, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas cuando se evaluó su respuesta a diferentes dosis de kinetina (cuadro 3A).

En esta etapa, donde fueron evaluados los callos provenientes de las diferentes dosis de kinetina, se pudo observar una mayor formación y organización de estructuras, a partir de los callos provenientes del medio suplementado con 3mg/l de kinetina (cuadro 9). En este medio secundario sin reguladores del crecimiento, la necrosis

del callo se detuvo, pero los callos que fueron suplementados con 4 y 5 mg/l de kinetina llegaron a presentar hasta un 50% de necrosis, y los callos restantes presentaron un color rosado-anaranjado, más compactos y un mayor grado de organización y formación de estructuras, lo cual coincide con las características de un callo altamente embriogénico (Thomas, 1985).

Al subcultivarse masas de callos de *Zamia pumilla* sobre un medio basal libre de reguladores, aumenta su diferenciación y su capacidad para organizarse y formar un mayor número de estructuras (Webb *et al.*, 1983).

Crecimiento de estructuras formadas a partir de callos de *Zamia*. Formación de estructuras

Las estructuras organizadas y regeneradas a partir de callos de *Zamia* y provenientes de diferentes dosis de kinetina, fueron subcultivados a un medio MS sin reguladores del crecimiento. En la figura 5, se muestra una secuencia del crecimiento y las etapas por las que pasan las estructuras obtenidas a partir de callos de *Zamia*, hasta su diferenciación en un medio carente de reguladores.

Cuadro 7. Cuadrados medios, fuente de variación y significancia para el número de estructuras formadas a partir de callos de *Zamia (Zamia skinneri)*, provenientes de un medio primario suplementado con diferentes dosis de kinetina

Fuente de variación	GL	1ª Evaluación	2ª Evaluación	3ª Evaluación	4ª Evaluación	5ª Evaluación
Error	15	0,11	0,11**	0,24**	0,07**	0,92**
Nº estruct	5	0,40	1,00**	4,00**	14,86**	21,56**
C.V		133,33	44,44	16,48	4,77	12,26

** Diferencias altamente significativas al 0,01%.

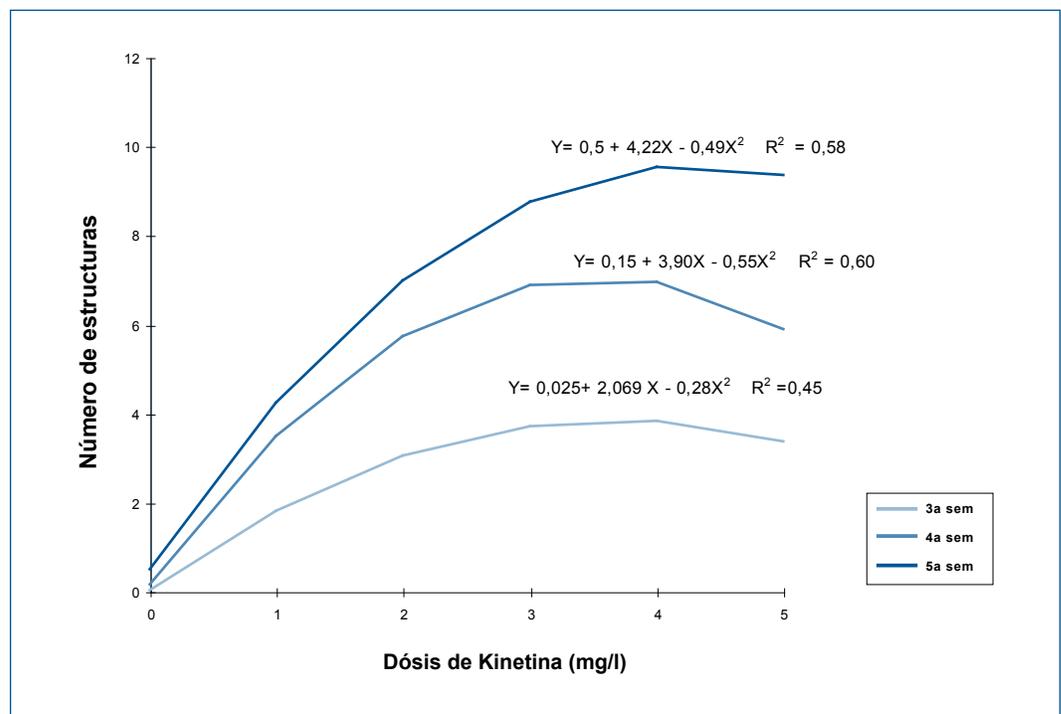


Figura 5. Número de estructuras de *Zamia skinneri*, regeneradas a partir de callo proveniente de medios de cultivo suplementados con diferentes dosis de kinetina, durante 5 semanas de evaluación

Los callos provenientes de un medio suplementado con 3 mg/l de kinetina, presentaron el mayor número de estructuras organizadas, con una longitud promedio de 0.3 cm. El medio de cultivo suplementado con 1mg/l de kinetina permitió el crecimiento

de estructuras con una longitud promedio de 0.1cm (cuadro 9).

Aparentemente la kinetina ejerció un efecto positivo ya que permitió la regeneración de una mayor cantidad de estructuras; sin embargo, las dosis de 4 y 5 mg/l de kinetina

tienden a producir un necrosamiento del callo lo que disminuye la organización de estructuras.

El medio basal MS sin reguladores de crecimiento permitió el desarrollo de estructuras organizadas a partir de la octava semana de evaluación (174 estructuras). Esta condición se presentó hasta la doceava semana de evaluación cuando se contabilizaron 321 estructuras organizadas; sin embargo, hay que notar que la longitud de las estructuras aumentó durante todas las doce semanas de evaluación, de 0,46cm hasta 1,50 cm promedio.

Las masas de callos y las estructuras de *Zamia pumilla*, *Z. ficheri*, y *Z. furfuracea*, que crecieron sobre un

medio basal sin reguladores de crecimiento, tienen un mayor desarrollo y una mayor organización, que al estar sobre un medio conteniendo macroelementos Gabor (1968), microelementos MS (1962) y enriquecidos con fuentes de nitrógeno reducido como glutamina, aspargina y caseína hidrolizada (Webb *et ál.*, 1983: Chavez *et ál.*, 1992).

En este mismo medio basal MS sin reguladores del crecimiento, se formó un mayor número de raíces después de la décima semana y, en cuanto a la longitud de la raíz, no hubo aumento de la segunda semana hasta la onceava y doceava semana de evaluación, de donde pasó de 0,16cm hasta 0,20 y 0,24cm de longitud respectivamente (cuadro 9).

Cuadro 8. Cuadrados medios, fuente de variación y significancia para la longitud de estructuras formadas a partir de callos de *Zamia* (*Zamia skinnerii*), provenientes de un medio primario suplementado con diferentes dosis de kinetina

Fuente de variación	GL	1 ^a Evaluación	2 ^a Evaluación	3 ^a Evaluación	4 ^a Evaluación	5 ^a Evaluación
Error	15	0,014	0,033	0,129	0,031	0,035
Nº estruct	5	0,024	0,032	0,020	0,036	0,057
C.V.		219,95	145,57	64,87	66,20	52,46

Cuadro 9. Número y longitud de estructuras organizadas de *Zamia* (*Zamia skinnerii*), provenientes de un medio de cultivo suplementado con diferentes dosis de kinetina, evaluado semanalmente

Dosis de kinetina (mg/l)	1 ^a		2 ^a		3 ^a		4 ^a		5 ^a	
	Número	Longitud cm								
0'	0	0	4	0,01	9	0,03	15	0,04	19	0,1
1	2	0,04	2	0,05	8	0,06	17	0,1	16	0,1
2	3	0,03	6	0,06	14	0,11	22	0,2	30	0,3
3	0	0	1	0,02	19	0,12	47	0,2	70	0,3
4	1	0,02	4	0,05	12	0,09	27	0,2	51	0,3
5	0	0	1	0,02	9	0,13	15	0,2	42	0,3

Cuadro 10. Número y longitud de estructuras organizadas de *Zamia*(*Zamia skinnerii*), sobre un medio MS, sin reguladores y evaluados semanalmente

Semana de evaluación	Número	Longitud cm	Nº de raíz	Longitud cm
1	128	0,46	11	0,14
2	137	0,56	11	0,16
3	137	0,65	11	0,16
4	137	0,70	11	0,16
5	137	0,78	11	0,16
6	137	0,81	11	0,16
7	137	0,84	11	0,16
8	174	1,1	11	0,16
9	200	1,1	11	0,16
10	233	1,2	11	0,16
11	265	1,38	14	0,20
12	321	1,50	14	0,24

Análisis histológico de estructuras diferenciadas a partir de megagametófitos inmaduros de *Zamia*

Los callos de *Zamia* que se subcultivaron a un medio secundario se fijaron en FAA y, posteriormente, se procesaron mediante la técnica de infiltración en parafina. El

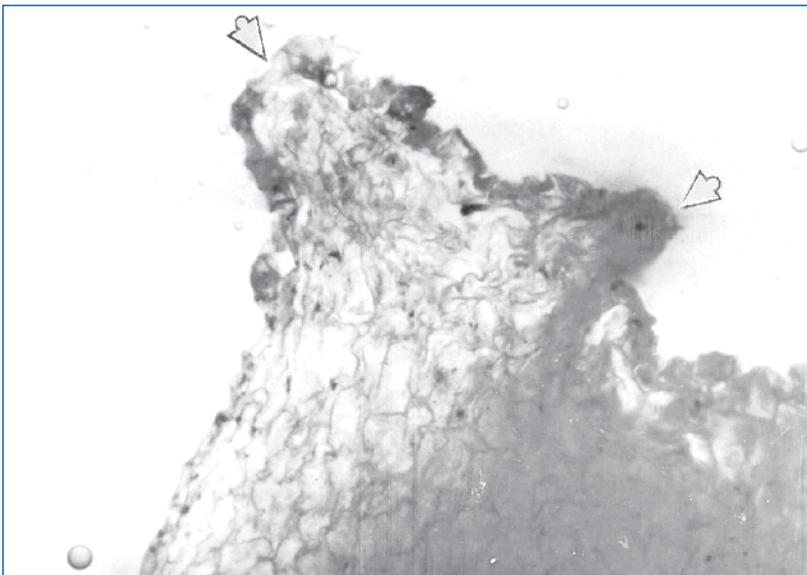


Figura 6. Sección longitudinal de un callo organogénico organizado, originado de un megagametófito de *Zamia skinnerii* que muestra la formación de brotes

análisis microscópico de estas estructuras nos muestran cierto grado de organización (fig. 6). Sin embargo en dichas estructuras no fue posible determinar si las estructuras organizadas respondían a un proceso de órgano énesis o embriogénesis somática, a pesar de que las estructuras observadas *in vitro* muestran estructuras polares como estructuras monopolares lo que evidencia, procesos de organogénesis y embriogénesis.

Las figura 6 muestran células con un citoplasma denso, un núcleo relativamente grande y un nucleolo visible que caracterizan al callo embriogénico.

Bibliografía

- Agenda 21. 1993. Agenda 21: The Earth summit strategy to save our planet. D. y Daniel Silarz. Earth Press. Colorado, USA. pp 31
- Berlyn, G.; Mikshe, J. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. The Iowa State university. Ames. Iowa. 130 p.
- Chávez V., R.E. Litz, K. Nortog 192. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Zamia fisheri*, *Z. furfuracea* and *Z. Pumilla*. Plant Cell, Tissue and organ culture. (Holanda) 30: 99-105.

- Gamborg O. L. Miller R. A. & Ojima K. 1968. Nutrient requeriment of suspension culture of soybean root cell. *Exp, Cell Res (USA)*. 50:151-158
- Litz R. E., P. A. Moon, V. M., Chávez. 1995. Somatic embryogenesis from leaf callus derived from matures trees of the cycad *Ceratozamia hildae* (Gymnospermae). *PlantCell, tissue and organ culture (Holanda)* 40: 25-31.
- Muller, E. W. Vargas W. R. Quesada. 1990. Situación actual y espectativas, posibilidades y limitantes para el manejo del bosque natural de la Región Huetar Norte. Resultados de dos Talleres. Santa Clara, ITCR. 50 p.
- Murashige, T.; Skoog, A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)*. 15: 473-497.
- Nortog K. 1965. Induction of apogamy in megagametophytes of *Zamia integrifolia*. *American journal of Botany (USA)* 52: 993-999.
- Ocampo, R. G. Robles. 1994. Procedimiento para el manejo sostenible de una planta ornamental, *Zamia skinneri* bajo la Categoría de CITES. Proyecto Conservación para el desarrollo sostenible en América Central OLAFO). Programa manejo integrado de Recursos Naturales. 4 p.
- Ocampo, R. 1994. Situación actual de los productos no maderables en Costa Rica. Separata proyecto conservación para el desarrollo sostenible en América
- Solís M., 1991. Inventario Forestal. Unidad de producción Forestal-Raicilla, CoopeSanJuan. Documento No 20 Proyecto Cooseforma. 43p.
- Webb D. T.; M. E. Rivera; E. Starszak; J. Matos. 1983. Callus initiation and organized development from *Zamia pumilla* embryo explants. *Annals of Botany. (USA)* 51: 711-717.