



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

Germinación *in vivo* e *in vitro*, crecimiento y descripción morfo-anatómica de *Dioon merolae* De Luca, Sabato y Vázquez-Torres

VIANEY CHAMÉ GARCÍA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

Montecillo, Texcoco, Edo. De México

2015

La presente tesis titulada “**Germinación *in vivo* e *in vitro*, crecimiento y descripción morfo-anatómica de *Dioon merolae* De Luca, Sabato y Vázquez-Torres**” realizada por la alumna: **Vianey Chamé García**” bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo, y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
BOTÁNICA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



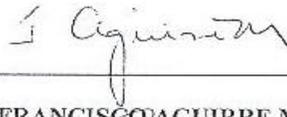
DRA. LUCERO DEL MAR RUIZ POSADAS

ASESORA



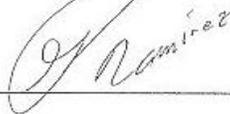
DRA. MA. CRISTINA GPE. LÓPEZ PERLTA

ASESOR



DR. JUAN FRANCISCO AGUIRRE MEDINA

ASESOR



DR. GUSTAVO RAMÍREZ VALVERDE

ASESOR



DR. EDUARDO GARCÍA VILLANUEVA

Montecillo, Texcoco, Estado De México, Abril de 2015

Germinación *in vivo* e *in vitro*, crecimiento y descripción morfo-anatómica de *Dioon merolae* De Luca, Sabato y Vázquez-Torres

**Vianey Chamé García, MC
Colegio de Postgraduados, 2015**

RESUMEN

Dioon merolae pertenece al grupo de las cícadas, especie endémica de Chiapas y Oaxaca, México, es comúnmente conocida como Espadaña y se encuentra en peligro de extinción. Es importante conocer esta especie para promover su propagación y conservación. Se requieren métodos eficientes de propagación y estudios para estimular un crecimiento más rápido que el que tienen de manera natural.

En este trabajo se evaluaron dos métodos para la germinación de *Dioon merolae*, por el método *in vivo* o el tradicional y haciendo uso de la biotecnología por el método *in vitro*. Por el método tradicional se probaron diferentes métodos de escarificación de la semilla y se evaluó el efecto de la fitohormona brasinoesteroide CIDEF-4, se determinó que para elevar la tasa de germinación es esencial fracturar la esclerotesta de la semilla y mantenerla en remojo 48 horas. La dosis de 100 mg L⁻¹ de CIDEF-4 no mostró diferencias significativas en la germinación de *Dioon merolae*.

Por el método *in vitro* se evaluaron tres edades fisiológicas de la semilla según su grado de madurez en combinación con tres medios de cultivo que resultó de la modificación de la concentración de las sales inorgánicas (macronutrientes, micronutrientes y hierro).

Se realizó también una descripción morfo-anatómica de la semilla y la plántulas de la especie de *Dioon merolae* para contribuir al conocimiento de la especie.

Palabras clave: Cícada, escarificación, brasinoesteroide, *in vitro*, morfo-anatómico.

ABSTRACT

Germination *in vivo* and *in vitro* growth and morfo-anatomical description of *Dioon merolae* De Luca, Sabato and Vázquez-Torres

**Vianey Chamé García, MC
Colegio de Postgraduados, 2015**

Dioon merolae belongs to cycads, endemic to Chiapas and Oaxaca, Mexico, is commonly known as “Espadaña” and is in danger of extinction. It is important to know this species to promote their propagation and conservation. Efficient propagation methods and studies are needed to stimulate faster than naturally have growth.

In this paper two methods for germination of *Dioon merolae* were evaluated by *in vivo* or the traditional method and making use of biotechnology by the *in vitro* method. The traditional method different methods seed scarification tested and the effect of the phytohormone CIDEF- 4 brassinosteroid was evaluated, was determined that to increase the germination rate is essential sclerotesta fracture the seed soak and hold 48 hours. The dose of 100 mg L⁻¹ of CIDEF-4 did not show significant differences in germination *Dioon merolae*.

For the *in vitro* method of three physiological ages of seed were evaluated according to their degree of maturity in combination with three culture media resulted from the modification of the concentration of inorganic salts (macronutrients, micronutrients and iron).

Morpho-anatomical description of the seed and seedlings of the species of *Dioon merolae* was also performed to contribute to the knowledge of the species.

Keywords: cycad, scarification, brassinosteroid, *in vitro*, morfo-anatomical

DEDICATORIA

A MI ESPOSO M.C. RUBÉN GÓMEZ PEREGRINA YA QUE SIN TU APOYO TODO ESTO NO HUBIERA SIDO POSIBLE, GRACIAS POR TUS CONSEJOS, PACIENCIA Y TU AMOR HACIA MI. TE AMO

A MI PEQUEÑA VIANCA PAOLA QUE LLEGASTE EN ESTA ETAPA DE MI VIDA SIENDO UNA MOTIVACIÓN MÁS PARA SEGUIR ADELANTE, GRACIAS POR DARLE A MI VIDA LA FELICIDAD MAS GRANDE DEL MUNDO.

A MI MADRE: POR ESTAR CONMIGO EN LOS MOMENTOS DIFÍCILES A PESAR DE LA DISTANCIA, POR TUS CONSEJOS Y SER UN EJEMPLO A SEGUIR.

A MIS HERMANOS, JORGE, LETY Y SANDRA POR TENER SIEMPRE SU APOYO INCONDICIONAL, POR SU AMOR Y CARIÑO. GRACIAS LOS AMO.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la vida, salud y la oportunidad de superarme.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgado durante mis estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados** que a través del postgrado en **Botánica** me dio la oportunidad de obtener el grado de maestría.

A la **Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas** por todo su apoyo y colaboración en esta investigación.

A la **Dra. Cristina López Peralta** por su dedicación, sus consejos y orientación en este trabajo.

Al **Dr. Juan Francisco Aguirre** por toda su colaboración y orientación dentro de la investigación.

Al **Dr. Eduardo García Villanueva** por su invaluable apoyo y aportación en los estudios anatómicos realizados en la investigación.

Al **Dr. Gustavo Ramírez Valverde** por su gran colaboración y apoyo en esta investigación.

Al **M.C. Jorge Valdez** por su incondicional apoyo en la obtención y edición de fotografías, ya que aun cuando tiene una agenda saturada, siempre tiene un espacio para los estudiantes.

Al **Sr. Adrian Santos Sarmiento** por todo su tiempo, apoyo y aportaciones a este trabajo.

Al **Sr. Álvaro Meras** por su colaboración para la realización de este trabajo.

A mis amigos que fueron parte esencial durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados, quienes siempre me apoyaron incondicionalmente: **Carlos Gerardo J. Celia Selene Romero, Hortencia Razo, Mayte Jiménez, Marielena Monroy, Eleodoro Hdez. Meneses, Laura I. Tovar, Victoria Cessa.** Y para aquellos que aun estando lejos siempre están conmigo **Nallely Rivera, Candy Hernández, Ana Lilia Espinosa, Jessi Arellano y Marilyn Elizondo.**

A TODOS GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁG
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos generales	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. HIPÓTESIS.....	4
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
4.1 Aspectos generales de la semilla	5
4.1.1 Concepto de semilla.....	5
4.1.2 Tipos de semillas	5
4.1.3 Latencia	5
4.1.4 Tipos de latencia.....	5
4.1.5 Escarificación	6
4.1.6 Métodos de escarificación.....	6
4.1.6.1 Físico	6
4.1.6.2 Químico	7
4.1.6.3 Biológico.....	8
4.1.6.4 Uso del fuego	9
4.1.7 Germinación	9
4.2 Aspectos generales de las cícadas	9
4.2.1 Tallo	10
4.2.2 Hoja.....	11
4.2.3 Raíces.....	12
4.2.4 Estructuras reproductivas	13
4.2.5 Gametofito masculino	16
4.2.6 Gametofito femenino	17
4.2.7 Fertilización.....	19
4.2.8 Plántula.....	23

4.2.9	Semilla	25
4.2.10	Polinización	25
4.2.11	Toxicidad.....	27
4.3	Sistemática y distribución de las cícadas	28
4.4	Género <i>Dioon</i>	29
4.5	<i>Dioon merolae</i>	29
4.6	Propagación y cultivo de cícadas	33
4.7	Germinación de cícadas	35
4.8	Crecimiento de cícadas	37
4.9	Cultivo <i>in vitro</i> de cícadas	37
4.10	Hormonas vegetales o fitohormonas	39
4.10.1	Auxinas	40
4.10.2	Giberelina	41
4.10.3	Citocininas.....	42
4.10.4	Ácido abscísico.....	43
4.10.5	Etileno	44
4.10.6	Brasinoesteroides	46
4.11	Biofertilizantes	47
4.11.1	Micorrizas	48
4.11.2	Bacterias	48
5	LITERATURA CITADA	49
	CAPÍTULO I	54
	CAPÍTULO I. GERMINACIÓN <i>in vivo</i> DE <i>Dioon merolae</i> DE LUCA, SABATO Y VÁZQUEZ-TORRES	55
1.	INTRODUCCIÓN.....	55
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	56
2.1	Descripción del sitio de colecta de material biológico	56
2.2	Colecta de semillas	58
2.3	Limpieza de las semillas	58
2.4	Pruebas de viabilidad	59
2.5	Inducción de germinación <i>in vivo</i> Etapa I	60
2.5.1	Escarificación de la semilla	61
2.5.2	Preparación del sustrato y contenedores.....	61
2.5.3	Siembra de la semilla de <i>Dioon merolae</i>	62

2.5.4	Diseño experimental del Experimento de la Etapa I	63
2.6	Inducción de germinación <i>in vivo</i> Etapa II	65
2.6.1	Escarificación	66
2.6.2	Preparación del sustrato y contenedores	67
2.6.3	Siembra	67
2.6.4	Diseño experimental Etapa II	68
2.7	Efecto de la hormona brasinoesteroide CIDEF-4 en la germinación de <i>Dioon merolae</i> Etapa III	68
2.7.1	Escarificación	69
2.7.2	Sustrato y contenedores	69
2.7.3	Siembra y sus condiciones dentro de la cámara de crecimiento	69
2.7.4	Diseño experimental	69
2.8	Fabricación de rizotrones caseros	70
3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	72
3.1	Inducción de germinación <i>in vivo</i> Etapa I	73
3.2	Resultados Inducción de germinación <i>in vivo</i> Etapa II	74
3.3	Efecto de la hormona brasinoesteroide CIDEF-4 en la germinación de <i>Dioon merolae</i> 78	
3.4	Crecimiento de raíz en rizotrones caseros	83
4.	CONCLUSIONES	84
5.	LITERATURA CITADA	84
CAPÍTULO II		87
CAPÍTULO II. GERMINACIÓN <i>in vitro</i> DE <i>Dioon merolae</i> DE LUCA, SABATO Y VÁZQUEZ-TORRES		88
1.	INTRODUCCIÓN	88
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	90
2.1	Material vegetal	90
2.2	ETAPA I. Desinfección y siembra en el medio Murashige y Skoog (1962) de semilla de <i>Dioon merolae</i> con esclerotesta, con media y sin esclerotesta	90
2.2.1	Medio de cultivo	90
2.2.2	Desinfección superficial de las semillas y tratamientos de escarificación	91
2.2.3	Siembra de las semillas y condiciones de incubación	92
2.3	ETAPA II. Desinfección y siembra en el medio Schenk & Hildebrandt (SH, 1972) de semillas sin esclerotesta (gametofitos)	92
2.3.1	Obtención de gametofitos	93

2.3.2	Medio de cultivo.....	93
2.3.3	Desinfección superficial de los gametofitos.....	94
2.3.4	Siembra de los gametofitos y condiciones de incubación.....	94
2.3.5	Subcultivo	95
2.4	ETAPA III. Efecto de las concentraciones de sales minerales del medio Schenk & Hildebrandt (SH, 1972) en la germinación de gametofitos en tres edades fisiológicas de la semillas de <i>Dioon merolae</i>	95
2.4.1	Material vegetal	95
2.4.2	Medio de cultivo.....	95
2.4.3	Desinfección superficial de gametofitos	96
2.4.4	Siembra de gametofitos y condiciones de incubación.....	96
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
3.1	ETAPA I. Desinfección y siembra en el medio Murashige y Skoog (1962) de semilla de <i>Dioon merolae</i> con esclerotesta, con media y sin esclerotesta.....	97
3.2	ETAPA II. Desinfección y siembra en el medio Schenk & Hildebrandt (SH, 1972) de semillas sin esclerotesta (gametofitos).....	100
3.3	ETAPA III. Efecto de las concentraciones de sales minerales del medio Schenk & Hildebrandt (SH, 1972) en la germinación de gametofitos en tres edades fisiológicas de semillas de <i>Dioon merolae</i>	105
4	CONCLUSIONES.....	118
5	LITERATURA CITADA	119
	CAPÍTULO III	122
	CAPÍTULO III. DESCRIPCIÓN MORFO- ANATÓMICA DE SEMILLA Y PLÁNTULA DE <i>Dioon merolae</i> DE LUCA, SABATO Y VÁZQUEZ-TORRES.....	123
1.	INTRODUCCIÓN.....	123
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	124
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	126
3.1	Semilla madura	126
3.1.1	Morfología externa	127
3.1.2	Anatomía de la sarcotesta.....	127
3.1.3	Esclerotesta.....	130
3.1.4	Anatomía del gametofito femenino	134
3.1.5	Estructura del embrión	137
3.1.6	Primordios foliares.....	141
3.2	Plántula.....	142

Germinación *in vivo* e *in vitro*, crecimiento y descripción morfo-anatómica de *Dioon merolae*
De Luca, Sabato y Vázquez-Torres

3.2.1 Estructura de las raíces secundarias.....	143
3.2.2 Estructura de la raíz primaria	146
3.2.3 Tallo de la plántula (Hipocótilo)	148
3.2.4 Estructura de la hoja	150
4 CONCLUSIONES	155
5 LITERATURA CITADA	156
CONCLUSIONES GENERALES.....	158

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos a utilizar en la Etapa I de germinación.	60
Cuadro 2. Factores a evaluar en la etapa I de germinación	64
Cuadro 3. Asignación de colores de los tratamientos con la hormona brasinoesteroide CIDEF- 4 y la micorriza	64
Cuadro 4. Descripción de los tratamientos de la Etapa II.	65
Cuadro 5. Descripción de los tratamientos de la etapa III.....	69
Cuadro 6. Longitud de la raíz de los ejemplares antes del trasplante a rizotrones	71
Cuadro 7. Crecimiento de la raíz de semillas trasplantadas a rizotrones	83
Cuadro 8. Concentración de sales minerales del medio de cultivo SH (1972).....	95
Cuadro 9. Edad fisiológica del gametofito y concentraciones de las sales minerales del medio evaluados en la germinación <i>in vitro</i> de <i>Dioon merolae</i>	96
Cuadro 10. Germinación y crecimiento después de seis meses <i>in vitro</i>	115

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Sección transversal de un tallo A) Sección transversal del tallo de *Cycas circinalis* mostrando la condición polixilemática, armadura de las bases de las hojas y una medula y córtex grandes; B) Sección transversal del tallo de *Zamia sp.* Mostrando las zonas de las trazas foliares y la madera manoxilemática. En ambas se observan el córtex y la médula con abundantes canales de mucilago. Bp, base del peciolo; cm, canal de mucilago; co, cortex, me, médula; tf, trazas foliares (Tomada de Yáñez, 2006)11
- Figura 2. Megasporófilos de cícadas. A) Megasporófilo de *Dioon edule* con la punta de la lamina expandida y dos óvulos; B, megasporófilo de *Zamia Fischeri*. (A, Tomada de Foster y Gifford, 1974 y B, Sporne, 1982)15
- Figura 3. Óvulo maduro de *Bowenia spectabilis* (Tomada de Sporne, 1982)15
- Figura 4. Diagrama de un óvulo A) Diagrama de una sección longitudinal del óvulo de *Dioon edule* mostrando la etapa temprana del tubo polínico en desarrollo y la etapa celular del gametofito femenino. B) Diagrama de una sección longitudinal del óvulo de *Dioon edule* mostrando el tubo polínico colgando hacia abajo en la cámara arquegonial y la posición de los arquegonios en el gametofito femenino (Tomada de Foster y Gifford, 1974).....18
- Figura 5. Sección longitudinal media de una semilla mostrando el embrión en desarrollo con la zona de alargamiento o suspensor (Tomada de Yáñez, 2006; Giddy, 1974)22
- Figura 6. Sección longitudinal media de una semilla recién dispersada (Tomada de Yáñez, 2006; Bold *et al.* 1989)23
- Figura 7. Plántula en desarrollo de *Dioon edule*. A y B, muestran etapas tempranas en la germinación de la semilla, mostrando la emergencia de la punta de la raíz desde la coleorriza; C, plántula joven con varias hojas primarias encerradas en las vainas de los dos cotiledones (Tomada de Foster y Gifford, 1974).24
- Figura 8. Distribución de las poblaciones de *Dioon merolae* en Chiapas y Oaxaca, México (Tomada de Lázaro-Zermeño *et al.* 2012)32
- Figura 9. Ubicación del municipio de Jiquipilas en el estado de Chiapas. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mapa_jiquipilas.jpg56
- Figura 10. Vista general de la zona de distribución de *Dioon merolae* en el ejido Andrés Quintana Roo en el municipio de Jiquipilas, Chiapas, México57

Figura 11. Ejemplar adulto de <i>D. merolae</i> con el tallo inclinado	57
Figura 12. Ejemplares femeninos de <i>Dioon merolae</i> con conos A) Cono inmaduro B) Cono maduro	58
Figura 13. Proceso de extracción y limpieza de semillas de <i>Dioon merolae</i> A) Cono maduro B) Semillas completas C) Retiro de la sarcotesta D) Semillas sin sarcotesta	59
Figura 14. Germinación de <i>Dioon merolae</i> . A) Sustrato B) Bolsa tipo forestal C) Charola plástica	62
Figura 15. Arreglo del experimento dentro de la cámara de crecimiento	63
Figura 16. Distribución de las charolas conteniendo las bolsas dentro de la cámara de crecimiento	65
Figura 17. Uso del tornillo de banco para fracturar la esclerotesta de la semilla de <i>Dioon merolae</i> A) Tornillo de banco B) Semilla fracturada en el tornillo de banco	66
Figura 18. Macetas negras de 7.5X7.5X11 cm	67
Figura 19. Siembra de <i>Dioon merolae</i> A) Siembra de semilla 2/3 sumergido en el sustrato. B) Colocación de las macetas en la cámara de crecimiento	68
Figura 20. Fabricación de rizotrones caseros A) Contenedor con sustrato, B) Semilla germinada, C) Siembra de semilla entre el contenedor y el sustrato, D) Vista final del rizotrón	72
Figura 21. Experimento No. 1 sin germinación	73
Figura 23. Porcentaje de germinación de <i>Dioon merolae</i> en la etapa II	75
Figura 22. Emergencia de la radícula en tres tratamientos diferentes A) Semilla fracturada remojada en agua destilada 48 horas (T1); B) semilla fracturada remojada 24 horas con CIDEF-4 (T2) y C) semilla fracturada remojada 24 horas en agua destilada (T3).	75
Figura 24. Efecto de la hormona brasinoesteroide CIDEF-4 en la germinación de <i>Dioon merolae</i>	79
Figura 25. Emergencia de la radícula de <i>Dioon merolae</i> en dos tratamientos diferentes	80

Figura 26. Limpieza y lavado de las semillas. A) Semillas libres de sarcotesta, B) Lavado de semillas.	91
Figura 27. Desinfección superficial de semillas	92
Figura 28. Obtención de gametofitos A) ruptura de la esclerotesta B) gametofito femenino	93
Figura 29. Siembra de gametofitos de <i>Dioon merolae</i> en campana de flujo laminar A) siembra de gametofitos; B) tratamientos de la etapa II.	94
Figura 30. Porcentaje de contaminación por bacterias en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Dioon merolae</i> en el establecimiento de cultivo aséptico.	97
Figura 31. Respuesta obtenida en el primer experimento de establecimiento de cultivo aséptico de <i>Dioon merolae</i> . A) semilla completa contaminada por bacterias B) semilla con la mitad de esclerotesta contaminada por bacterias C) y D) semilla sin esclerotesta contaminada por bacterias.	98
Figura 32. Porcentaje de contaminación en el establecimiento de cultivo aséptico de gametofitos de <i>Dioon merolae</i>	101
Figura 33. Establecimiento de cultivo aséptico de <i>D. merolae</i> . A) tratamiento con peróxido de hidrogeno B) tratamiento sin peróxido de hidrógeno.....	101
Figura 34. Porcentaje de germinación de gametofitos de <i>Dioon merolae</i> en medio Schenk & Hildebrandt (SH, 1972)	102
Figura 35. Germinación de <i>Dioon merolae</i> . A) inicio de germinación a los 5 días B) crecimiento de la radícula C) semilla germinada antes del subcultivo D) cambio de coloración en la radícula después del subcultivo	103
Figura 36. Tasa de contaminación en la germinación de <i>Dioon merolae</i>	105
Figura 37. Agentes contaminantes en la germinación <i>in vitro</i> de <i>Dioon merolae</i>	106
Figura 38. Contaminación por tratamientos en la germinación <i>in vitro</i> de <i>Dioon merolae</i> según el agente contaminante en los primeros 30 días después de la siembra.....	107
Figura 39. Contaminación por tratamientos en la germinación <i>in vitro</i> de <i>Dioon merolae</i> según el agente contaminante durante todo el experimento.....	108
Figura 40. Porcentaje de contaminación por bacterias y hongos según los factores evaluados.....	109

Figura 41. Proceso de germinación <i>in vitro</i> de <i>Dioon merolae</i> . A) inicio de la emergencia B) alargamiento de la raíz. C) cambio de coloración de la radícula. D y E) Engrosamiento y alargamiento de la raíz. D y F) crecimiento de las hojas primarias.....	110
Figura 42. Porcentaje de germinación total en los primeros 30 días después de la siembra por tratamiento	111
Figura 43. Semilla de la edad fisiológica 1 (EF1) con un ligero oscurecimiento en la superficie.....	112
Figura 44. Tasa de germinación de <i>Dioon merolae</i> por concentración de sales del medio de cultivo (M1,M2, M3) y por edad fisiológica de la semilla (F1, F2, F3).....	113
Figura 45. Plántulas de <i>Dioon merolae</i> germinadas <i>in vitro</i> . A) plántula con dos hojas con los folíolos enroscados B) plántula con muchas raíces secundarias y hoja expandida.	114
Figura 46. Formación de callo en la raíz.A) raíz corta y gruesa B) masa callosa en la base de la raíz	116
Figura 47. Morfología externa de la semilla. A) Vista lateral de la semilla madura y seca B) Vista externa de la sarcotesta lisa y brillante. C) Vista del hilio. Rm: región del micrópilo, Rh: Región del hilio	127
Figura 48. Sarcotesta anatomía general. A) Vista de región media: Epidermis con mucilago seco (Ms) y parénquima de reserva (Pr).B) Acercamiento hacia la epidermis.....	128
Figura 49.Sarcotesta: acercamiento hacia la epidermis (E). Epidermis (E) de la sarcotesta con dos a tres estratos y parénquima con grandes espacios intercelulares (Ei), cristales estrellados (Cr) y sustancias de reserva (Sr).....	129
Figura 50. Haz vascular en la sarcotesta hacia la región de la esclerotesta; X: Xilema primario mostrando principalmente los elementos traqueales con pared lignificada (rojo). F: Floema primario rodeando al haz vascular. (Pv): Parénquima perivascular conformando la vaina del haz vascular. Pr: parénquima de reserva.	129
Figura 51.Morfología general de la semilla en los estratos que conforman la testaA) Semilla con (Izquierda) y sin (derecha) sarcotesta. B) Vista de un corte paradermal de la sarcotesta. C) Estructura de la esclerotesta fracturada a presión. E: Epidermis, Ed: Endotesta, Es: Esclerotesta, Gf: Gametofito	

femenino de reserva, Pr: Parénquima de reserva, Rh: región del hilio, Rm: Región del micrópilo	130
Figura 52. Principales componentes celulares de la esclerotesta disociada con reactivo de Jeffrey. A) Fibroesclereida con algunas ramificaciones	132
Figura 53. Diversidad celular en la esclerotesta. Eca: Esclereida alargada, Eci: esclereida isodiamétrica, Fe: Fibroesclereida, Fr: Fibra	133
Figura 54. Esclereidas ramificadas con punteaduras y canales de punteaduras. Eca: Esclereida alargada, Lc: Región del lumen celular	133
Figura 55. Tipos de Esclereidas, unas alargadas y ramificadas (Eca) y otras pequeñas isodiamétricas (Eci) y astroesclereidas (Ae)	134
Figura 56. Gametofito y embrión. A) Vista general del gametofito femenino en corte longitudinal. B) Esquema general del embrión C: Cotiledón, Gf: Gametofito femenino de reserva, Em: Embrión, Ee: Eje embrionario, H: Región del hipocótilo, Mp: Meristemo apical de la plúmula, Rd: Radícula	135
Figura 57. Gametofito femenino de reserva. A) Desde la esclerotesta hacia el interior. Ei: Espacio intercelular, Eg: Tejido epidermal del gametofito, Gp: Gránulos de reserva posiblemente proteínicos, Gr: Gránulos de reserva posiblemente almidón, Ps: parénquima de reserva del gametofito	136
Figura 58. Canal de mucílago en el gametofito femenino de <i>D. merolae</i> . Se observan canales de mucílago que lo rodea un endotelio. Et: Endotelio, Ps: parénquima de reserva del gametofito	137
Figura 59. Embrión A) región de la caliptra y meristemo apical de la radícula. Ca: Caliptra, T: células con taninos	138
Figura 60. Meristemo apical plúmula. Ee: Eje embrionario, H: Región del hipocótilo, Mp: Meristemo apical de la plúmula Pf: Primordio foliar, Rd: Radícula	139
Figura 61. Anatomía del embrión hacia la región de los cotiledones. C: Cotiledón, Cm: Canal de mucílago, E: Epidermis, Hv: Haz vascular, L: Laticíferos	140
Figura 62. Acercamiento de un canal de mucílago. Cm: canal de mucílago, Cp; cristal proteico, Crm: cromosoma en metafase, Et: endotelio, Gr: Gránulos de reserva probablemente almidón, L: Laticífero, Ni: Núcleo en interfase	141
Figura 63. Primordios Foliares (región de tricomas) en el embrión. Mp: meristemo apical de la plúmula, Pf: Primordio foliar, Tr: Tricomas, T: Células con taninos	142

- Figura 64. Plántula de *Dioon merolae* con restos de la semilla. Es: Esclerotesta, H: región del Hipocótilo, Nc: Nudo coltiledonar, Pf: Primordio foliar, Rp: Región de la plúmula, Rr: Raíz primaria, Rs: Raíz secundaria..... 143
- Figura 65. Sección transversal de raíz secundaria. Cm: Canal de mucílago, Hv: Haz vascular, End: Endodermis, F: Floema, Pc: Parénquima cortical en la raíz, Rd: Rizodermis, T: Células con taninos, X: Xilema primario 144
- Figura 66. Región de la caliptra y del meristemo apical en una raíz secundaria. Ca: Caliptra, Mr: meristemo apical de la radícula, T: Células con taninos 145
- Figura 67. Región de diferenciación en una raíz secundaria. F: Floema Pc: Parénquima cortical, Rd: Rizodermis, X: Xilema primario 146
- Figura 68. Sección longitudinal de raíz primaria con corteza secundaria. Cm: canal de mucílago, Fg: Felógeno, Fl: Felodermis, Pc: parénquima cortical, Su: Suber 147
- Figura 69. Tejido vascular central de raíz primaria de *Dioon merolae*. Cm: canal de mucílago F: Floema primario, Pr: parénquima de reserva, X: Xilema primario 148
- Figura 70. Tejido vascular hacia las hojas en el hipocótilo. H: Región hacia el hipocótilo. Tv: Tejido Vascular 149
- Figura 71 Esquema de una hoja joven de *Dioon merolae* (Por J. M. Chamé G.) Fo: Foliolo, La: Lamina, P: Pecíolo, Rya: Región de la yema axilar 150
- Figura 72. Hoja joven de *Dioon merolae* (un año de edad), región apical. Fo: Foliolo, La: Lamina, P: Pecíolo, R: Raquis. 151
- Figura 73. Corte transversal de foliolo joven. Cl: clorénquima, Ec: Esclerénquima, Eh: Epidermis de la haz, Ev: Epidermis del envés, Mf: Mesófilo de la hoja..... 152
- Figura 74. Acercamiento de foliolo joven. Cl: clorénquima, Ec: Esclerénquima, Eh: Epidermis de la haz, Ev: Epidermis del envés, Hv: Haz vascular, Mf: Mesófilo de la hoja 153
- Figura 75. Tejido vascular de un foliolo de *Dioon merolae*. Floema hacia la haz. Cm: Canal de mucílago, Et: endotelio, Ehe; Epidermis de haz esclerificada, F: Floema primario, H: Haz vascular, Mf: Mesófilo de la hoja, X: Xilema primario..... 153
- Figura 76. Epidermis de la has esclerificada, Parénquima en empalizada y parénquima esponjoso de foliolo maduro. Ehe; Epidermis de haz esclerificada, H: Haz vascular, Mf: Mesófilo de la hoja Pp: parénquima en empalizada, Ps: Parénquima esponjoso 154

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las cícadas son un grupo de gimnospermas que se encuentran clasificadas dentro del orden Cycadales. Las primeras plantas aparecieron en el triásico superior y es el único grupo que ha sobrevivido hasta la actualidad, por consiguiente, son extremadamente antiguas y exhiben rasgos muy primitivos, tanto en su morfología como en su ciclo de vida (Sporne, 1982). Mientras que en la era mesozoica se distribuyeron ampliamente, en la actualidad este grupo de plantas está restringido a las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se encuentran en Australia, Este de Asia, Centro y Sur de África, México, Centroamérica, Sudamérica y las Antillas Mayores y Japón (Lázaro-Zermeño *et al.*, 2012).

Actualmente el orden Cycadales se representa únicamente por dos familias: Cicadaceae con un sólo género, *Cycas*, y la familia Zamiaceae con nueve géneros *Bowenia*, *Ceratozamia*, *Dioon*, *Encephalartos*, *Lepidozamia*, *Macrozamia*, *Microcycas*, *StangeriayZamia* (Christenhusz, *et al.*, 2011). Hasta la fecha se han registrado 331 especies de cícadas incluidos en 10 taxones infra-específicos. En México se reporta de un total de 53 especies los géneros *Ceratozamia* con 26, *Zamia* con 14 y *Dioon* con 13 especies, (Haynes, 2012), que colocan a México en un segundo lugar mundial en diversidad de cícadas después de Australia.

Biológicamente, las cícadas son valiosas dado que representan una etapa importante en la evolución de las plantas con semilla (Vovides, 2000). También tienen una gran importancia ecológica, ya que muchas especies crecen en suelos pobres, rocosos y poco profundos; donde actúan como formadoras y retenedoras de suelo, así también, aportan apreciables cantidades de nitratos a sus ecosistemas.

Muchas especies de cícadas son muy apreciadas por los grupos indígenas, quienes usan sus hojas en ceremonias y ritos religiosos. En Chiapas las hojas de *Dioon merolae* son utilizadas en las festividades de la Santa Cruz y las de *Ceratozamia robusta* en la celebración de la Virgen de la Candelaria, respectivamente (Pérez y Vovides 1997).

También tienen gran importancia comercial como plantas ornamentales debido a su belleza y similitud con palmeras; sus hábitos de crecimiento lento las hacen cotizarse en altos precios cuando los ejemplares son grandes y es la razón por la que son perseguidas por coleccionistas privados o instituciones privadas para jardines botánicos o parques.

Las cícadas se consideran en el ámbito internacional como especies amenazadas y en peligro de extinción y gozan de protección por medio de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) y en México están enlistadas en la Norma Oficial (NOM-059-ECOL-1994). Las principales amenazas hacia las cícadas son la sobreexplotación de sus poblaciones naturales, la reducción de su hábitat principalmente por el cambio de uso de suelo, los incendios forestales y sin embargo, el factor más importante para las cícadas es su difícil y lenta propagación.

Aunque para algunas especies se conocen diferentes métodos de propagación eficaces, para otras son insuficientes haciéndolas más vulnerables. *Dioon merolae*, una especie endémica de los estados de Chiapas y Oaxaca, México. Fue descrita recientemente y los estudios sobre ella son aun escasos. Su estatus dentro de la NOM 059 desde 1994 (INE, 1994) y del apéndice II del CITES es que es una especie en peligro de extinción. Presenta una baja tasa de germinación y muy lento desarrollo, se estima que en los primeros diez años de vida el incremento en la longitud del tallo es menor de 1.0 cm por año y pueden alcanzar su edad reproductiva entre los 80 y 100 años de vida. (Lázaro-Zermeño *et al.*, 2012)

Por estos antecedentes es de gran importancia realizar estudios de germinación que ayuden a la propagación de la especie y contribuyan a las estrategias de restauración y conservación de las poblaciones naturales, y su aprovechamiento eventual con fines comerciales. Para lograrlo es necesario hacer uso de nuevas tecnologías y avances científicos como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* o fitohormonas con el fin de encontrar un método óptimo que permita aumentar su tasa de germinación y el crecimiento de esta especie.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

1. Determinar la tasa de germinación *in vivo* de *Dioon merolae* usando la fitohormona brasinoesteroide CIDEF-4
2. Establecer un protocolo para la germinación *in vitro* de *Dioon merolae*

2.2. Objetivos específicos

- Precisar un método de escarificación de semillas eficaz que mejore la germinación de *Dioon merolae*
- Evaluar el efecto de la aplicación de la fitohormona esteroideal CIDEF-4 en la germinación de *Dioon merolae*
- Determinar las condiciones óptimas para el establecimiento del cultivo aséptico de semillas *in vitro* de *Dioon merolae*
- Evaluar el efecto de la concentración de sales del medio de cultivo para la germinación *in vitro* de *Dioon merolae*
- Realizar la descripción morfo- anatómica de la plántula y semilla de *Dioon merolae*

3. HIPÓTESIS

El proceso de germinación de *Dioon merolae* en condiciones *in vivo* está en función del tipo de escarificación aplicada a la semilla, las condiciones ambientales del cultivo y de la concentración de la fitohormona esteroideal CIDEF-4 utilizada.

El proceso de germinación de *Dioon merolae* en condiciones *in vitro* está en función de la edad fisiológica de la semilla, tipo de escarificación de la misma, las condiciones de desinfección previos al establecimiento del cultivo y la concentración de sales en el medio de cultivo.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Aspectos generales de la semilla

4.1.1 Concepto de semilla

La semilla es una unidad reproductiva compleja, característica de las plantas vasculares superiores, que se forma a partir del óvulo vegetal, generalmente después de la fertilización. Se encuentra en las plantas con flores (angiospermas) y en las gimnospermas. En las angiospermas los óvulos se desarrollan dentro de un ovario; en tanto que en las gimnospermas la estructura que los contiene es muy diferente, pues no constituye una verdadera flor; sin embargo, la estructura de las semillas de estas plantas es básicamente similar a la de las plantas con flores (Vázquez *et al.*, 1997). Para Greulanch y Adams (1980) las semillas son simplemente óvulos maduros.

4.1.2 Tipos de semillas

Las semillas se clasifican en ortodoxas y recalcitrantes. Se han definido como semillas ortodoxas a aquellas que pueden permanecer viables bajo condiciones controladas de almacenamiento y semillas recalcitrantes a aquellas que no pueden ser almacenadas porque pierden rápidamente su viabilidad cuando son deshidratadas y mantenidas a bajas temperaturas y, por lo general, no presentan latencia o ella es débil (Figuerola y Jaksic, 2004).

4.1.3 Latencia

La latencia, dormancia o letargo, es un estado natural que se genera en las semillas durante sus procesos evolutivos y que sucede con un fin específico: servir como mecanismo de supervivencia o adaptación frente a ciertas condiciones ambientales o de sitio que se dan en la naturaleza. La palabra latencia, que proviene del latín “*Latensentis*” y significa oculto, escondido o aparentemente inactivo, es utilizada en el sector forestal y viverista para hablar específicamente de un fenómeno natural que se presenta en las semillas de la gran mayoría de especies forestales y arbustos, en el que estando maduras y viables, no germinan pese a contar con condiciones favorables para su desarrollo (Ruiz, 2010).

4.1.4 Tipos de latencia

Las semillas de muchas especies arbóreas germinan enseguida cuando se las somete a condiciones de humedad y temperatura favorables. Cuando la latencia es fuerte, la

regeneración artificial exige de manera esencial alguna forma de tratamiento previo de la semilla, a fin de obtener una tasa de germinación razonablemente alta en poco tiempo. La latencia puede ser de diferentes tipos, y a veces la misma semilla presenta más de uno. La clasificación más sencilla distingue entre: latencia exógena o del pericarpo/cubierta seminal; latencia endógena o del embrión, y latencia combinada, en la que la latencia afecta al mismo tiempo a la cubierta seminal y al embrión. Dentro de la latencia exógena se pueden clasificar tres tipos de latencias como es la física, es decir, impermeabilidad de la cubierta o el pericarpo al agua, la latencia química, cuando existen inhibidores en el pericarpo o la cubierta y la latencia mecánica que se presenta cuando existe resistencia mecánica del pericarpo o la cubierta al crecimiento del embrión. Dentro de la latencia endógena se encuentra la latencia morfológica y la fisiológica, la primera se refiere al subdesarrollo del embrión y la segunda a un mecanismo fisiológico inhibidor que impide la germinación.

4.1.5 Escarificación

Según Hartmann y Kester (1980), la escarificación es cualquier proceso de ruptura, rayado o alteración mecánica de las cubiertas de la semilla para hacerlas permeables al agua o a los gases.

4.1.6 Métodos de escarificación

Existen diferentes métodos para escarificar las semillas, estos dependen en gran medida del tipo de latencia que presentan las semillas.

4.1.6.1 Físico

Uno de los métodos físicos más sencillos y directos consiste en cortar, perforar o abrir un pequeño orificio en la cubierta de cada semilla antes de sembrarla. Puede utilizarse también papel de lija para reducir el grosor de la cubierta por abrasión. Cuando hay que tratar grandes cantidades de semilla, la escarificación mecánica está más indicada que el método manual. Se pueden voltear o agitar las semillas en una hormigonera con grava de arista viva o arena, o también en un tambor especial forrado en su interior con material abrasivo como papel de lija, cemento o trozos de vidrio, o dotados de discos abrasivos giratorios (Willan, 1991).

Varios tratamientos comprenden el remojo de las semillas en agua u otros líquidos. Estos tratamientos en húmedo combinan a veces dos efectos, el de ablandar la cubierta dura y el de extraer por lixiviación los inhibidores químicos.

Algunas semillas que tienen poca resistencia a la germinación pueden responder bien al remojo durante 24 horas en agua a temperatura ambiente. Esto puede deberse a una imbibición más rápida que la que puede obtenerse en un semillero humedecido. En algunas especies está recomendado aplicar este tratamiento después de la escarificación manual, mecánica o con ácido.

El tratamiento con agua caliente ha dado buenos resultados en varias semillas de leguminosas. Por lo general se colocan las semillas en agua hirviendo, que se retira inmediatamente de la fuente de calor y se deja enfriar poco a poco; las semillas están en el agua unas 12 horas. Por imbibición, las semillas se van hinchando a medida que se enfría el agua. La relación adecuada entre el volumen de agua y el volumen de semillas puede determinarse experimentalmente. Puede variar de una manera considerable según la especie de que se trate, y se ha sugerido que la cantidad de agua sea mayor que la de semilla en 2–3 veces, 4–5 veces hasta 5–10 veces. Las instrucciones sobre el tratamiento de las semillas con agua caliente para eliminar la latencia de la cubierta deben observarse meticulosamente, pues de lo contrario las semillas pueden morir debido a un calentamiento excesivo.

4.1.6.2 Químico

La sustancia química que más se utiliza para romper la latencia de la cubierta es el ácido sulfúrico concentrado. En algunas especies es más eficaz que el tratamiento con agua caliente. Es posible que las semillas que han estado almacenadas durante un período prolongado deban estar más tiempo en el ácido que las semillas frescas, las cuales podrían resultar gravemente dañadas con un tratamiento de esa duración (Willan, 1991).

La duración óptima de la inmersión en el ácido puede determinarse tratando pequeñas muestras durante períodos distintos y después poniéndolas a remojar en agua, a temperatura ambiente, durante 1–5 días (según la especie). La duración de tratamiento que corresponda al porcentaje más alto de semillas hinchadas (por haber tomado agua) sin daños visibles es la

adecuada. Un exceso de tiempo de remojo puede “picar” la parte exterior de la semilla e incluso dejar al descubierto el endospermo. En la mayoría de las especies, un tiempo de remojo insuficiente deja las cubiertas lustrosas; las de las semillas correctamente tratadas son mates, pero no muy “picadas”.

4.1.6.3 Biológico

En la naturaleza, los animales y microorganismos son un factor importante a la hora de romper la impermeabilidad de la cubierta seminal. Aunque resulta difícil utilizar a esos organismos como un tratamiento previo y controlado de las semillas, en algunos casos se han obtenido resultados satisfactorios.

Las semillas de *Acacia senegal* y *Ceratonia siliqua* a las que se ha hecho pasar por el tracto digestivo de una cabra germinan enseguida cuando se colocan en condiciones favorables, y ello se debe a la acción de los fuertes jugos gástricos del animal. En estas especies funciona bien el procedimiento que consiste en dar las vainas como alimento a cabras estabuladas y recoger después las semillas de sus excrementos. Se afirma que en el caso de algunas especies, como *Gmelina arborea*, el animal regurgita las semillas después de rumiarlas parcialmente, las ovejas y cabras expulsan las semillas de *Acacia nilotica* después de rumiarlas, mientras que en el caso del ganado bovino pasan por todo el tracto digestivo. En ambos casos, la acción digestiva mejora la germinación (Willan, 1991).

En muchas partes de los trópicos, los termes son un importante agente de interrupción de la latencia de la cubierta seminal. En Tailandia los frutos de teca se extendían en el suelo, en una capa de 5 cm de grosor, inmediatamente después de la recolección y se tapaban con cartón. A las cinco semanas aproximadamente los termes se habían llevado todo el exocarpo: después de humedecerlos y secarlos de manera alternada, estos frutos germinaban mejor que los que se sembraban con el exocarpo intacto.

4.1.6.4 Uso del fuego

En los trópicos que son estacionalmente húmedos y secos, el fuego es un poderoso factor natural para eliminar la latencia de la cubierta. Un fuego fuerte mata las semillas, pero un fuego entre leve y moderado, como los que se asocian con la combustión temprana controlada, reduce la impermeabilidad de la cubierta y estimula la germinación. A veces se extienden los frutos en el suelo, en una capa gruesa, y se cubren con hierba a la que se prende fuego, o también se pueden chamuscar ligeramente los frutos con una pistola de llama (Willan, 1991).

4.1.7 Germinación

La germinación es el proceso mediante el cual una semilla se desarrolla hasta convertirse en una nueva planta. La germinación se inicia con la entrada de agua en la semilla (imbibición) y finaliza con el comienzo de la elongación de la radícula. En condiciones de laboratorio, la posterior rotura de las cubiertas seminales por la radícula es el hecho que se utiliza para considerar que la germinación ha tenido lugar (criterio fisiológico). Sin embargo en condiciones de campo no se considera que la germinación ha finalizado hasta que se produce la emergencia y desarrollo de una plántula normal (criterio agronómico) (Pita y Pérez, 1998). Para lograr esto, toda nueva planta requiere de elementos básicos para su desarrollo: luz, agua, oxígeno y sales minerales. La germinación es un mecanismo de la reproducción sexual de las plantas.

La germinación de las semillas comprende tres etapas sucesivas que se superponen parcialmente: 1) la absorción de agua por imbibición, causando su hinchamiento y la ruptura final de la testa; 2) el inicio de la actividad enzimática y del metabolismo respiratorio, translocación y asimilación de las reservas alimentarias en las regiones en crecimiento del embrión, y 3) el crecimiento y la división celular que provoca la emergencia de la radícula y posteriormente de la plúmula. En la mayoría de las semillas el agua penetra inicialmente por el micrópilo y la primera manifestación de la germinación exitosa es la emergencia de la radícula (Vázquez *et al*, 1997).

4.2 Aspectos generales de las cícadas

Las cícadas se encuentran incluidas dentro de un grupo de plantas llamadas gimnospermas, las cuales se caracterizan por presentar semillas desnudas, es decir las semillas no se encuentran encerradas dentro de la pared del ovario formando una fruta, como en las angiospermas. Así bien, estas plantas son dioicas, es decir presentan sexos separados (Pérez y Vovides, 1997).

4.2.1 Tallo

Las cícadas más modernas se asemejan a las palmas arbóreas por la presencia de un tronco firme y una corona de frondas pinnadas en el ápice. Generalmente carecen de ramas pero en algunas especies existen ramas adventicias (Sporne, 1982). En *Cycas revoluta*, por ejemplo, se desarrollan brotes laterales comúnmente desde varias áreas del tronco. Estos brotes laterales, los cuales aparentemente son originados desde los tejidos vivos de la base persistente de las hojas son capaces de enraizar y producir nuevas plantas si son separados desde el tronco (Foster y Gifford, 1974). Varias especies alcanzan alturas hasta de 10-15 m, por ejemplo *Dioon spinulosum* aunque la más alta de todas es *Macrozamia hopei* que llega a medir hasta 18 m. Sin embargo algunas tienen tallos subterráneos cortos, tuberosos y ramificados en forma irregular, por ejemplo en algunas especies de *Zamia* (Sporne, 1982).

El tallo de las cícadas es distinguido por varias características anatómicas. Primero, el cortex y la medula son excepcionalmente grandes (Figura 1A), comparado con lo relativamente estrecho del diámetro del cilindro vascular (Foster y Gifford, 1974).

El rasgo anatómico más interesante desde el punto de vista evolutivo, es la estructura de las nervaduras y trazas foliares, en las cuales existen dos tipos de xilema. Uno de ellos es un área aproximadamente triangular del xilema centripeto. Con una sola región de protoxilema; el otro está separado del primero por tejido parenquimatoso y consiste de un arco de traqueidas asociado con el floema en tal forma que aparenta ser de origen secundario (Sporne, 1982). Aunque el crecimiento secundario por medio del cambium vascular ocurre en el tallo de muchos géneros, la cantidad de tejido vascular secundario producido es relativamente pequeño y el xilema es atravesado por numerosos rayos parenquimatosos amplios. A la madera de textura suelta de cícadas se ha designado como “manoxílico” (Figura 1B) en

contraste con el xilema más compacto y denso de coníferas el cual se denomina “picnoxílico” (Foster y Gifford, 1974).

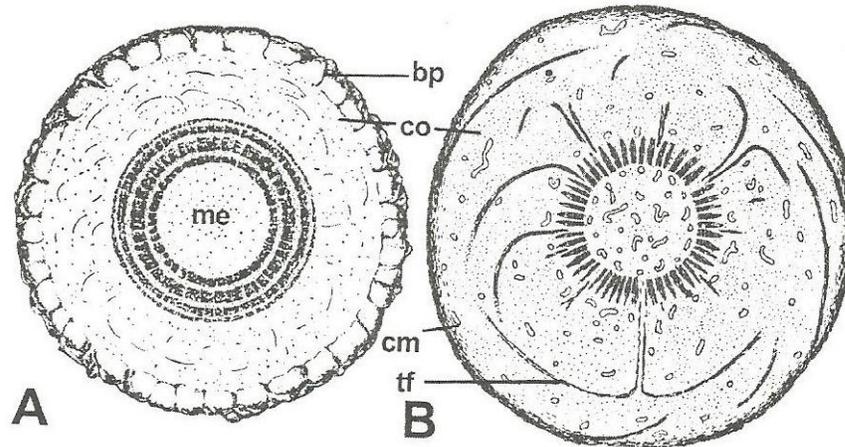


Figura 1. Sección transversal de un tallo A) Sección transversal del tallo de *Cycas circinalis* mostrando la condición polixilemática, armadura de las bases de las hojas y una médula y córtex grandes; B) Sección transversal del tallo de *Zamia sp.* Mostrando las zonas de las trazas foliares y la madera manoxilemática. En ambas se observan el córtex y la médula con abundantes canales de mucilago. Bp, base del peciolo; cm, canal de mucilago; co, cortex, me, médula; tf, trazas foliares (Tomada de Yáñez, 2006)

4.2.2 Hoja

Todas las cícadas producen dos tipos de hojas, hojas en forma de escama o catafilos y hojas foliadas. A excepción del género *Bowenia* que presenta hojas grandes bipinadas, en todas las otras cícadas vivientes las hojas desarrollan una sola serie de foliolos. Las hojas de las cícadas consisten en una lámina pinnatocompuestas sin un folíolo terminal, una base abultada, ya sea con o sin estípulas y un peciolo que puede ser pronunciada como en *Zamia* u discreto como en *Dioon* y *Encephalartos* (Stevenson, 1990). Antes de la expansión de una corona de nuevas hojas ésta se superponen y son protegido por una larga serie de escamas imbricadas de las yemas duras. Estas estructuras como la base de las hojas foliadas, persisten por muchos años sobre el tronco y así además contribuyen a las características de armadura de la hoja. En muchas cícadas las nuevas hojas son erguidas y los foliolos son planos durante el periodo de expansión la corona. Pero en el género *Cycas*, la vernación de los foliolos jóvenes es distintivamente circinados como en muchos helechos (Foster y Gifford, 1974). Pero solo en *Bowenia* se encuentra vernación circinada de raquis y foliolos (Yáñez, 2006).

Las bases de las hojas de cícadas son a menudo hinchados hasta el punto de parecer bulbosa particularmente en *Cycas*, *Dioon*, *Lepidozamia* y algunas especies de *Encephalartos* y *Macrozamia*. Las estipulas están presentes sobre el foliolo de las bases de las hojas y catáfilos (cuando están presentes) en varios géneros. Las estipulas son de dos tipos, el primero el cual está presente en solo en *Stangeria* y *Bowenia*, son algo carnosa, bien desarrolladas y vascularizada. En *Stangeria* las estipulas parecen estar fusionados lateralmente y forman una estructura como de capucha sobre el lado abaxial de la base de la hoja. En contraste las estipulas presentes tanto hojas como en catafilos de *Ceratozamia*, *Microcycas* y *Zamia* son diminutas, discretas y no vascularizadas (Stevenson, 1990).

Hay varios tipos de patrones de venación en los foliolos o pinas de hojas de las cícadas en el género *Cycas* es único porque cada pinna es atravesada por solo una simple prominente vena media y las venas laterales son ausentes. En contraste, los foliolos de *Stangeria* desarrollan un tipo pinado de venación consistente de una vena media desde la cual salen venas laterales que son poco espaciados y dicotómicamente ramificados. En los géneros restantes, la pina carece de vena media y la venación consiste de una serie de venas longitudinales las cuales ramifican dicotómicamente en varios niveles en su curso a través de la pina (Foster y Gifford, 1974).

La mayoría de los representantes existentes de cícadas muestran adaptaciones en sus hojas para ambientes xerófilos: una cutícula gruesa, la hipodermis bien definido formado por células de paredes gruesas y estomas hundidos, por lo general sólo en la parte inferior de las láminas. Estos rasgos fueron posiblemente heredado de un antepasado que habitaban ambientes secos y fuertemente irradiados (Acuña y Marín, 2013a).

4.2.3 Raíces

Las cícadas producen tres tipos de raíces, aunque uno de estos está restringido a las especies de *Cycas* (Jones, 1993). El sistema radical primario es equivalente al sistema radical pivotante que se encuentra en la mayoría de las plantas. La raíz primaria de una plántula se desarrolla para formar la gran raíz principal que frecuentemente, alcanza varios metros de largo. La raíz principal de todas las cícadas es contráctil, lo cual parece ser de gran importancia para el

establecimiento exitoso de las plántulas. En la etapa inicial, las plántulas de las cícadas son suculentas y susceptibles a ser depredadas, al fuego y a la desecación. Las raíces contráctiles primarias atraen a las partes susceptibles bajo el suelo en donde se encuentran protegidas, hasta que las plantas crecen lo suficiente para desarrollar hojas protectoras en la base (Yáñez, 2006). En general la raíz primaria principal está presente a través de la vida del individuo, en los taxa con tallos subterráneos hay usualmente una sola raíz principal (aunque puede haber varias raíces principales de almacenamientos en algunas especies de *Zamia*). En taxa arborescentes, varias de la primeras raíces laterales formadas también se desarrollan entre la raíz principal así que la planta tiene entonces varias raíces principales. Estas parecen ayudar en la estabilización de los tallos paquicaules (Stevenson, 1990). Otro tipo de raíces presente en los esporofitos de todas las cícadas forman raíces apogeotrópicas las cuales crecen hacia arriba y cerca de la superficie del suelo, presentan ramificación dicotómica, formando peculiares masas coraloides de raicillas, las raicillas coraloides pueden formarse en la plántula pero son particularmente conspicuos cerca del tronco de especímenes cultivados bien desarrollados, específicamente en las plantas de crecimiento tuberoso. Una de las características distintivas de las raíces coraloides es la presencia de una bien definida zona cilíndrica de células pobladas de un alga verde azul, *Anabaena cycadeae Reinke* en el córtex de la raíz (Foster y Gifford, 1974) las cuales establecen una asociación de tipo simbiótica. Las micorrizas también establecen una asociación simbiótica en las raíces, y propician la absorción de minerales (Fisher y Vovides, 2004).

4.2.4 Estructuras reproductivas

Todas las especies de cícadas son dioicas y anualmente o algunas veces bianualmente, producen estructuras reproductivas (Stevenson, 1990). Estas estructuras reproductivas se originan en la parte apical del tallo. Estas estructuras son conos, denominados técnicamente comoestróbilos. Al cono masculino se le conoce como microstróbilo y el cono femenino como megastróbilo. Cada cono está conformado por escamas. En el caso de las escamas del cono femenino se le denominan megasporófilos y a las del cono masculino, microsporofilos. Es dentro del conofemenino en donde se forman las semillas. El microstróbilo se encarga de producir el polen, que se forma dentro de cámaras polínicas llamadas microsporangios. Estos

se encuentran en el envés de cada microsporófilo (Pérez y Vovides, 1997). En todos los géneros con excepción de *Cycas*, ambos tipos de estróbilos son estructuras compactas como conos con crecimiento determinado; en posición ellos son aparentemente terminales tal como en el género *Dioon*, aunque en ciertas especies de *Macrozamia*, *Bowenia* y *Encephalartos* pueden estar axilar o lateralmente (Foster y Gifford, 1974). Los microsporofilos en las cícadas aunque varían en tamaño y forma, todos son más bien gruesas, estructuras similares a escamas. El número de microsporangios que surgen por una sola esporofila varía desde más de un mil en *Cycas media* a varias docenas en *Zamia floridana* (Foster y Gifford, 1974). Al madurar los esporangios se presentan muy similares a los de los helechos eusporangiados por la presencia de una pared sólida, varias células gruesas y porque su origen es típicamente eusporangiado. Una célula hipodérmica se divide para dar origen a una pared celular esporogénica primaria. De estas se originan las paredes gruesas y numerosas células esporogénicas, siendo antes circundadas por un tapete que se parte hacia abajo para producir un plasmodio en el cual se desarrollan más tarde. Cada una de las células madre de la espora sufre meiosis para producir una tétrada de granos de polen haploides. El número haploide de cromosomas se ha contemplado como sigue: 13 *Microcycas*, 11 en *Cycas*; 8 *Stangeria*, *Ceratozamia* y *Zamia* spp; nueve en el resto de los géneros (Sporne, 1982)

Los megasporófilos varían considerablemente en tamaño y forma; en muchos casos la forma es de gran valor sistemático en la caracterización de los géneros o especies. Dos tipos extremos ocurren en *Zamia*, *Microcycas* y *Ceratozamia*, por ejemplo, los megasporófilos son peltadas, como órganos con escamas, cada soporte con dos óvulos (Figura 2B). En notable contraste los megasporófilos de *Cycas revoluta*, son conspicuamente pinatífidas como estructuras de hojas que soportan 6-8 óvulos lateralmente organizados sobre el eje de esporofilas por debajo del grupo terminal de pinnas rudimentarias. En otros géneros tal como *Dioon* y *Encephalartos* los esporofilos aunque esencialmente como en forma de escamas, pueden mostrar puntas extendidas o estrías marginales sugestivo de láminas de hojas reducidas (Figura 2A). (Foster y Gifford, 1974).

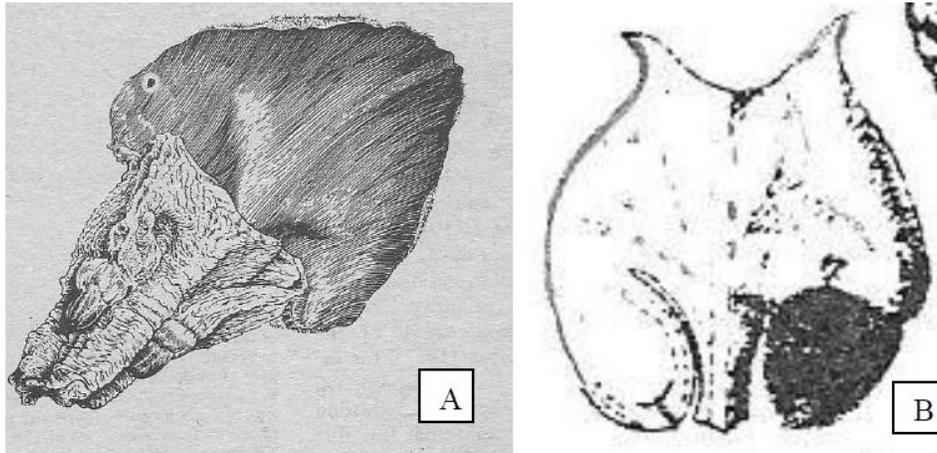


Figura 2. Megasporófilos de cícadas. A) Megasporófilo de *Dioon edule* con la punta de la lamina expandida y dos óvulos; B, megasporófilo de *Zamia Fischeri*. (A, Tomada de Foster y Gifford, 1974 y B, Sporne, 1982)

Las cícadas tienen dos diferentes tipos de morfología del óvulo. El óvulo platipérmico es claramente aplanado por lo tanto simétricamente bilateral. Este tipo se restringe a *Cycas*. Todas las otras cícadas tienen óvulos radiospérmicos. Asociado con la morfología platispérmico está un mecanismo distintivo de la germinación e la cual la apertura de la semilla se divide en dos mitades bien diferenciadas cerca del micrópilo. Este es patrón diferente sorprendentemente a la observada en la germinación de las semillas radiospérmicas de las cícadas, donde el embrión, aparentemente por digestión parcial de la capa de madera, se abre camino a través de la cubierta de la semilla por ruptura en la región micropilar (Stevenson, 1990).

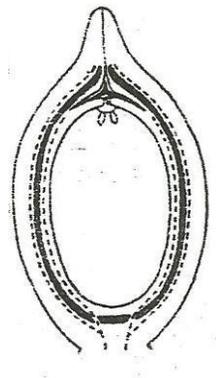


Figura 3. Óvulo maduro de *Bowenia spectabilis* (Tomada de Sporne, 1982)

En conjunto, los óvulos de las cícadas son grandes comparados con los óvulos de otras gimnospermas. Los óvulos de *Cycas circinalis* y *Macrozamia denisonii* pueden alcanzar 6 cm en longitud; en otros géneros los óvulos son más pequeños, el más pequeño sería de *Zamia pumila* el cual mide solo 5-7 mm en longitud. Estructuralmente el óvulo de las cícadas consiste del integumento lateralmente unido con la nucela masiva excepto cerca del fin micropilar del ovulo (Figura 3). Durante la ontogenia, el integumento llega a ser histológicamente diferenciado entre tres capas: una capa carnosa externa y una interna y capa dura media, la cual es esclerificada y dura en textura. Una característica muy interesante del ovulo en las cícadas es el desarrollo de dos sistemas vasculares separados. El sistema exterior se extiende como una serie de venas no ramificadas que atraviesan la capa carnosa externa mientras el sistema interno consiste de numerosas hebras ramificadas dicotómicas, vascularizadas la capa carnosa interna. Esto ha sido reportado en varios géneros, algunos de las ramificaciones del sistema vascular interno pueden terminar en la base de la parte libre de la nucela. La capa interna del integumento usualmente rompe durante el desarrollo de la semilla, pero la capa carnosa externa persiste, y en la semilla madura puede ser rojo brillante (*Encephalartos*, *Zamia*) rosa salmón (*Microcycas*) o casi blanco (*Dioon*, *Ceratozamia*)(Foster y Gifford, 1974).

4.2.5 Gametofito masculino

El desarrollo del gametofito masculino endospórico de cícadas procede a través de los estados tempranos antes de que los granos de polen sean dispersados desde el microsporangio. La división mitótica del núcleo de la microspora forma dos células: una pequeña célula basal protalial y una grande meristemática inicial. La última función como un inicial anteridial y su división de rendimientos como una célula generativa la cual radica próxima a la célula protalial y un tubo celular comprime un núcleo y su citoplasma asociado. En estas tres etapas unicelulares, el gametofito masculinoparcialmente desarrollado, encerrado dentro de la pared de la espora original, es liberado desde el microsporangio como un grano de polen(Foster y Gifford, 1974).

Durante el crecimiento de las células del tubo polínico, la célula generativa se divide produciendo una célula estéril localizada cerca de la célula protalial y una célula

espermatogénica. Estos términos propuestos por Sterling en 1963 parece preferible a la más antigua terminología en la cual dos células derivadas de la división de la célula generativa donde se designo como el tallo celular y el cuerpo celular. El termino tallo celular sugiere homología no probada con el tallo del anteridio de briofitas y ciertos helechos leptosporangiados. Además el también llamado tallo celular, en la mayoría de las cícadas no es funcional y por lo tanto estéril, aunque en *Microcycas* el tallo celular se divide repetidamente, formando una serie lineal de cuerpo celular cada una de las forma dos espermatozoides. Esto es también evidente que el término cuerpo celular podría ser reemplazado por el termino más explicito “célula espermatogénica” el cual claramente define el rol de esta célula, es decir la producción de un par de gametos (Foster y Gifford, 1974).

4.2.6 Gametofito femenino

El gametofito femenino en gimnospermas surge por la ampliación y división de una sola megaspora funcional la cual está situada profundamente entre el tejido nucelar y el ovulo. Siguiendo la ampliación de la megaspora funcional, el gametofito femenino es iniciado por una serie sincronizada de divisiones celulares libres. Los extremadamente numerosos núcleos que son formados durante esta etapa en desarrollo llegan a ser organizado en la capa periférica del citoplasma el cual es encontrado entre la pared de la megaspora y la gran vacuola central del gametofito coenocítico. Porque de la muy delicada estructura del gametofito, esto es extremadamente difícil para estimar exactamente el número de óvulos libres (Foster y Gifford, 1974).

En el final del periodo libre nuclear, el núcleo periférico llega a ser conectado por medio de ejes secundarios con seis núcleos adyacentes. Las paredes anticlinales entonces llegan a desarrollarse centripetamente, resultando en la formación de células las cuales son llamadas alveolos. Cada alveolo es hexagonal en la transección y su núcleo reside en su base o en el final interno, el cual abre cerca de la vacuola. El gametofito femenino en esta etapa ha sido comparado con un panal, cada cavidad representa a un solo alveolo. Como el alveolo tubular se extiende hacia el centro del gametofito muchos de ellos llegan a cerrarse, en varias distancias desde el centro, por división nuclear seguidas por el desarrollo de paredes más o

menos oblicuamente orientadas. Las pequeñas células triangulares las cuales resultan son llamadas alveolos cerrados precozmente. Las células triangulares así como los otros alveolos, por medio de repetidas divisiones periclinales (con referencia a la superficie del gametofito) forman filas de células organizadas radialmente, pero después como resultado de más divisiones en planos irregulares, esta organización puede perderse (Figura 4A)(Foster y Gifford, 1974).

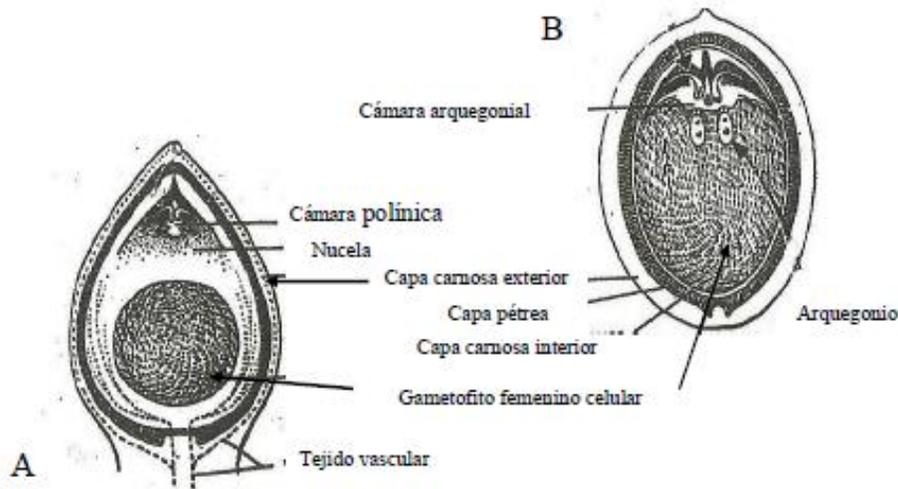


Figura 4. Diagrama de un óvulo A) Diagrama de una sección longitudinal del óvulo de *Dioon edule* mostrando la etapa temprana del tubo polínico en desarrollo y la etapa celular del gametofito femenino. B) Diagrama de una sección longitudinal del óvulo de *Dioon edule* mostrando el tubo polínico colgando hacia abajo en la cámara arquegonial y la posición de los arquegonios en el gametofito femenino (Tomada de Foster y Gifford, 1974).

Los enormes gametofitos femeninos de cícadas se desarrollan relativamente despacio, requiriendo 5- 6 meses para alcanzar la madurez sexual. En muchos géneros y especies, son formados de 2 a 5 arquegonios cada uno inicialmente equipado con un par de células del cuello sobresaliente entre una depresión circular llamada cámara arquegonial, la cual está localizada en el fin distal del gametofito femenino (Figura 4B). *Mycrocycas* difiere desde su forma básica teniendo hasta varios cientos de arquegonios extendiéndose sobre su tercio distal del gametofito (Norstog, 1990).

4.2.7 Fertilización

El desarrollo del prótalo masculino se inicia en tanto que los granos de polen aun están en el microsporangio. En los diferentes estadios del proceso, el núcleo se divide una vez de tal manera que una sola célula se corta en una parte, el otro núcleo hijo a veces llamado núcleo inicial anteridial, se divide otra vez para producir un tubo nuclear y una célula generativa. Es en esta fase que los granos de polen se desprenden y los óvulos son polinizados. Los granos de polen son atrapados en una gota de fluido secretado por el micrópilo y son conducidos hacia abajo rumbo a la cámara de polen, enseguida se produce un tubo polínico que penetra a las partes de la cámara de polen, la cual sujeta los granos de polen mientras tanto, la célula generativa se divide para producir una célula estéril y una célula espermatogénica la cual, a su vez, se divide para producir dos espermatozoides como lo indica el nombre. La célula estéril no participa en este papel pero en *Microcycas* se divide repetidamente hasta producir una sucesión de 10 u 11 células espermatogénicas, cada una de las cuales origina dos espermatozoides (Sporne, 1982).

El descubrimiento de los gametos masculinos multiflagelados (espermatozoides) en *Gingo* y *Cycas* ha sido considerado como uno de los descubrimientos botánicos más significativos de finales del siglo 19, con lo cual se advertía una estrecha relación entre las plantas primitivas con semillas y criptógamas, como musgos, helechos y licopodios, que también tienen espermatozoides (Norstog, 1990).

Los espermatozoides de cícadas son células espectaculares que van desde 80 μm en *Myrocycas* alrededor de 400 μm en *Zamia roezlii* y equipados con hasta 4000 flagelos. (Norstog, 1990). Al llegar la fertilización un fenómeno curioso ocurre en *Bowenia* en este momento: cada arquegonio secreta una gota de agua a través de las células del cuello; esta agua junto con el líquido desde el microgametofito, suministra el medio por el cual los microgametos nadan activamente. En este mismo género la pared externa de cada célula del cuello es muy delgada y de media altura, en el lado interior la pared de cada célula del cuello es bastante gruesa; con una célula angosta soportando las dos células del cuello, una bisagra como el arreglo es por lo tanto erecto, permitiendo que las células se abran momentáneamente

hacia la entrada de los microgametos. Las células del cuello están en contacto íntimo con el solo ápice y los movimientos activos de los microgametos constituyen suficiente presión para causar que las células abran. Las células del cuello no son demolidas como sucede en el periodo correspondiente de muchas gimnospermas pero ellas colapsan inmediatamente después de comenzar las divisiones nucleares libres. El número de microgametos los cuales entran a un determinado arquegonio pueden variar desde uno hasta seis o incluso más, pero en realidad sólo uno penetra el citoplasma para fusionar con el núcleo del arquegonial. El microgameto entra con fuerza considerable, lo suficientemente fuerte como para quitarse el citoplasma y la banda ciliada en la parte superior del arquegonio y dejando el núcleo desnudo para viajar la corta distancia restante para contactar el núcleo arquegonial (Johansen, 1950). Después de que se ha efectuado la fertilización se llevan a cabo repetidas divisiones nucleares libres, hasta 64, generalmente 256 o incluso se han llegado a formar arriba de 1000 núcleos, antes de paredes transversales se han colocado hacia abajo. En algunos géneros por ejemplo *Cycas*, *Encephalartos* y *Macrozamia*, los embriones se vuelven totalmente celulares aunque en otros sólo la región basal se vuelve celular (Sporne, 1982).

El núcleo libre es usualmente dispersado ligeramente a través del citoplasma arquegonial. Muchos de los reportes recientes describen la formación de una vacuola central o una desorganización del citoplasma y el núcleo parece ser inexacto. Lo que pasa en el citoplasma arquegonial previo a la formación de la pared varía de acuerdo a su género o especie. En *Stangeria* muchos de los núcleos en el centro y parte superior del proembrión migran a la parte basal, donde el citoplasma llega a ser más y más denso, con una vacuolización correspondiente del citoplasma en la parte superior. Un segundo periodo de mitosis nucleares libres ocurre, seguida por la formación de la pared. Como en *Stangeria*, *Cycas revoluta* también tiene pocas mitosis simultáneas libres en la base del proembrión, mientras hay divisiones amitóticas en la parte superior en *Cycas* y reposan los núcleos en *Stangeria*. Las paredes aparecen simultáneamente a lo largo de todo el proembrión en *Macrozamia moorei*, *Encephalartos*, *Dioon edule*, y *Stangeria paradoxa* pero en *Macrozamia reidlii* una pequeña región central sigue siendo celular con núcleos libres. La formación de la pared ocurre solo en la base del proembrión en *Bowenia*, *Zamia* y *Ceratozamia* (Johansen, 1950).

Las paredes que protegen a la base del proembrión en muchas especies son frecuentemente débiles y evanescentes. Una vacuola aparece en la región central tarde o temprano y el arquegonio formador finalmente llega a estar vacío pero su contorno es preservado por su gruesa membrana. Las paredes celulares permanentes eventualmente son desarrolladas en la base del proembrión y las células así formadas llegan a diferenciarse en tres regiones (Johansen, 1950).

La diferenciación en la región celular de *Stangeria* comienza casi inmediatamente después de la delimitación pero en muchos de los otros géneros muchos cientos de células son producidos antes que la diferenciación reconocible llega a ser aparente. Primeramente hay dos regiones, una superior en contacto con la región nuclear libre y con las células más grandes; y una inferior compuesta de células más pequeñas, densas y más numerosas. En *Bowenia* ocurre una mitosis simultánea tan pronto como el núcleo libre ha migrado a la base del proembrión y resultan las paredes celulares, pero la región central permanece nucleada libre.

La zona de alargamiento del proembrión se denomina suspensor (Yáñez, 2006). El desarrollo de este último comienza bastante temprano. Las células grandes más lejanas son removidas desde la base del proembrión llegan a ser mucho más alargadas. Durante las etapas formativas tempranas los suspensores son separados pero todos estos desde los varios embriones pronto llegan a ser unidos y curvos, se enrollan y giran, ya que poco a poco crecen más y más en el endospermo. Finalmente solo el sistema suspensor perteneciente al primer embrión llega alcanzar pleno desarrollo (Figura 5). Los suspensores de las cícadas son remarcablemente largos. Los de *Ceratozamia* cuando están totalmente extendido miden 7 a 8 cm de longitud y en *Bowenia*, *Cycas* y *Macrozamia* pueden exceder los 10 cm (Johansen, 1950).

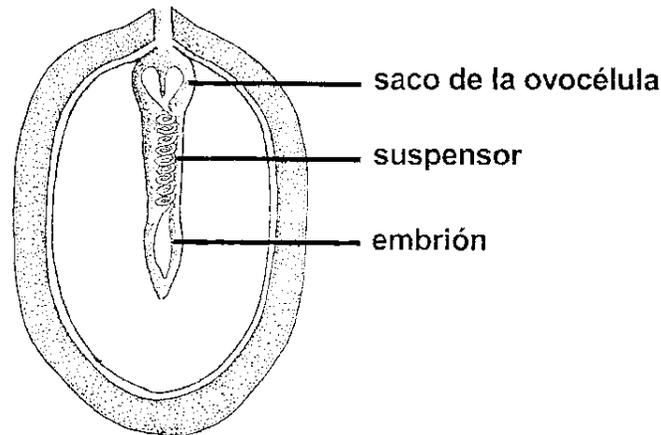


Figura 5. Sección longitudinal media de una semilla mostrando el embrión en desarrollo con la zona de alargamiento o suspensor (Tomada de Yáñez, 2006; Giddy, 1974)

El desarrollo del cotiledón, es similar en todos los géneros excepto en *Ceratozamia*. Este último género normalmente sólo tiene un cotiledón; los demás tienen dos u ocasionalmente tres. Las semillas se desprenden en *Cycas*, *Macrozamia*, y *Ceratozamia* antes que lo cotiledones estén desarrollados. Desde que la semilla yace en una posición horizontal después que esta desprendida, la gravedad tiene algo que hacer con el desarrollo del único cotiledón en *Ceratozamia* pero claramente no en los otros dos géneros. Cuando las semillas de *Ceratozamia* han sido puestas sobre una posición acostada para la germinación, el cotiledón suprimido se desarrolla completamente (Figura 6). En muchas especies los cotiledones frecuentemente que han sido reportados son más o menos desiguales en tamaño. Los cotiledones cierran sobre el ápice caulinar y en *Zamia* y *Bowenia* ellos se fusionan juntos en una etapa cercana a lo largo de la mitad superior de su longitud mientras en *Encephalartos* ellos están fusionados a lo largo de su longitud total, por ambos márgenes en la base y en su único o ambos márgenes cerca del ápice. Aproximadamente a la región central del embrión se desarrolla una estructura conspicua y característica llamada coleorriza (Figura 6). Su función es principalmente protectora (Johansen, 1950)

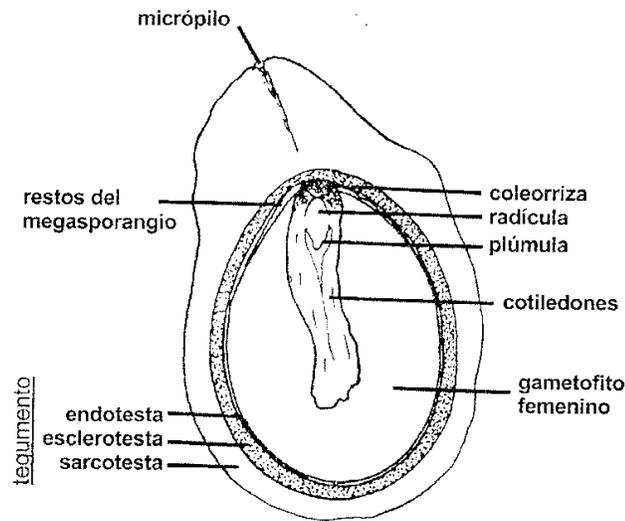


Figura 6.Sección longitudinal media de una semilla recién dispersada (Tomada de Yáñez, 2006; Bold *et al.* 1989)

4.2.8 Plántula

No hay periodo fijo de la dormancia de la semilla en las cícadas, y la germinación puede darse tan pronto como la semilla cae sobre el suelo. El extremo micropilar de la capa pétreo de la semilla es primero rota por la elongación de la coleorriza, una envoltura de tejido que encierra la punta de la raíz. La punta de la raíz entonces sobresale a través de la coleorriza y llega a crecer hacia abajo hasta el suelo(Figura 7A y 7B). Una característica distintiva del desarrollo subsecuente de la plántula es que las láminas de los dos cotiledones permanecen dentro de la semilla, aparentemente funcionando como órganos haustorial mientras la envoltura cotiledonar y la primera hoja primaria pronto emerge desde la cubierta de la semilla rota (Figura 7C). En plantas de dos o más años de edad, la semilla puede todavía permanecer unidos por los cotiledones secos al eje de la planta joven. Por varios años después de la germinación, el ápice caulinar de la plántula produce hojas escamosas (catafilos) y en intervalos, hojas foliares solas. Como el desarrollo de la planta joven continua, el número de hojas incrementa, alternando con zonas de hojas escamosas, que llegan a establecer el patrón de crecimiento (Foster y Gifford, 1974).

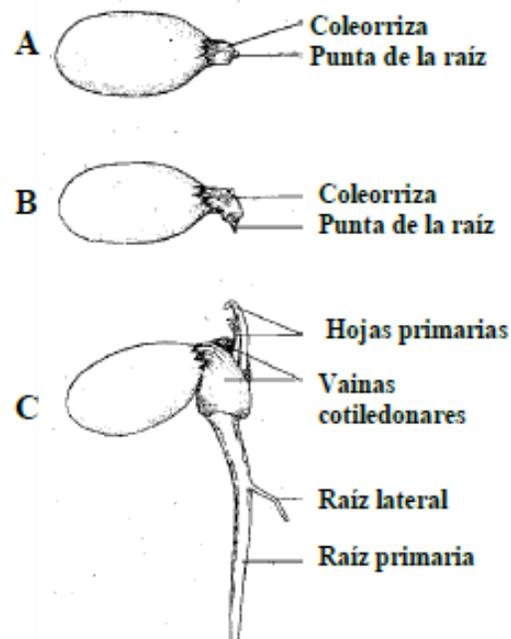


Figura 7. Plántula en desarrollo de *Dioon edule*. A y B, muestran etapas tempranas en la germinación de la semilla, mostrando la emergencia de la punta de la raíz desde la coleorriza; C, plántula joven con varias hojas primarias encerradas en las vainas de los dos cotiledones (Tomada de Foster y Gifford, 1974).

Durante la transición de plántula a esporofito adulto, el ápice caulinar incrementa enormemente en tamaño y en *Cycas revoluta* puede alcanzar un diámetro de cerca de 3.5 mm. Una dimensión grandemente excedente que el típico de los ápices de las plantas vasculares. Una de las características más distintivas del ápice en todas las cícadas es la convergencia de las bien definidas filas de células desde la parte lateral de la zona de iniciación hacia las células internas de la zona de las células madre central. El arreglo de las células como abanico, que aparece sorprendentemente en *Microcycas*, presenta un problema difícil en un esfuerzo por interpretar el patrón de división celular y la polaridad de la célula en el ápice caulinar (Foster y Gifford, 1974).

4.2.9 Semilla

Las semillas de las cícadas tienen una capa carnosa exterior denominada sarcotesta, que cubre a la capa interior dura conocida como esclerotesta. El embrión está fijado en el gametofito femenino y a menudo es impropriamente llamado endospermo. El embrión maduro y ensanchado, absorbe el alimento desde el gametofito por medio del suspensor (Dehgan, 1983). Las semillas de las cícadas se producen en una amplia variedad de tamaños, forma, color y textura de su superficie. Probablemente las semillas más grandes son las de *Macrozamia macdonnellii* y las más pequeñas las de *Zamia pygmaea* (Yáñez, 2006). La esclerotesta de las semillas de las cícadas van de esféricas a ovoides, lisas, y en algunas especies, presenta una corónula, que está siempre bien desarrollada, como en el caso de la especie *Ceratozamia norstogii*. El color de la sarcotesta varía de especie en especie, por ejemplo en *Dioon* es principalmente blanco o crema cuando esta inmadura y amarilla cuando está madura; en *Ceratozamia* es blanca cuando está inmadura y de blanco-amarillento cuando logra la madurez. En la mayoría de las especies de *Zamia* son rojas cuando la semilla está madura y algunas son de color naranja o amarillo (Pérez y Vovides, 1997).

4.2.10 Polinización

Las cícadas y su asociación con los insectos se conocen desde hace mucho tiempo, pero el papel de insectos en la polinización ha sido descubierto sólo recientemente. Anteriormente se suponía que estas plantas eran sólo polinizadas por el viento. Investigaciones en los Estados Unidos, Sudáfrica y Australia están confirmando la participación del escarabajo. Sólo unas pocas especies parecen ser en realidad sólo polinizadas por el viento. (Jolivet, 2005). Los escarabajos (Curculionidae y Languridae) también primitivos, indica una coevolución muy antigua (Vovides, 2000). El ciclo de vida del escarabajo es altamente interdependiente con el crecimiento de las cícadas y su reproducción. Los escarabajos obtienen alimento y refugio en el tejido del cono masculino a lo largo de su ciclo de vida (Brenner *et al*, 2003).

Los Conos de cícadas producen componentes volátiles y olores diversos, resinosa, con sabor a fruta, moho, etc, sin duda para atraer a los insectos polinizadores. Los conos son visitados por más o menos escarabajos específicos y las hojas por jóvenes de Lepidoptera, en su mayoría

Lycaenids y muchos escarabajos. Suponemos que los escarabajos atraídos por conos masculinos y sus fuentes nutritivas, van después a los conos femeninos por "error", y al hacerlo, polinizan. Se ha observado muy raramente, la fertilización a menudo por la noche o en la oscuridad (Jolivet, 2005).

Un ejemplo claro de simbiosis mutualista se da entre *Zamia furfurácea* y su efectivo polinizador, *Rhopalotria mollis*, quien utiliza los conos masculinos de esta cícadas para llevar a cabo su ciclo reproductor completo incluyendo copulación, ovoposición y alimentación de las larvas y pupas (Norstog, 1990). Significativamente la extinción de la planta o el insecto, en estos caso podría ser crítica o fatal, como en el caso de una cícada cubana amenazada, cuyo escarabajo polinizador se extinguió y las plantas que quedan producen semillas únicamente por medio de polinización artificial bajo cultivo (Schneider *et al*, 2002).

Zamia pumila L. en Cuba tiene dos polinizadores, los conos masculinos de los cuales son visitados por *Rhopalotria slossoni* y por el Langurido, *Pharaxonota floridana* Casey. *Dioon califanoi* en México es polinizada por varias especies de *Pharaxonota*. Estos escarabajos languridos (en realidad, para algunos especialistas Erotylidae) frecuentan igualmente los conos masculinos y femeninos de *Ceratozamia* en México. En Costa Rica, en La Selva, varios *Pharaxonota* frecuentan los conos masculinos de *Zamia skinneri* Warsz. Hay también, a veces, en los conos *Zamia*, huevos de lepidópteros, larvas y pupas, incluidos los de *Lycaenidae* (*Eumaeus spp.*), Que se alimentan normalmente en las frondas (Jolivet, 2005).

En Australia, las cícadas *Macrozamia communis* y *Lepidozamia peroffskyana* se asocian con los escarabajos Tranes lyterioides una gran especie nocturna, que se desarrolla en el interior de los conos masculinos y comen el polen. Muchos otros escarabajos están asociados con conos masculinos de Cycadales, a saber. *Tenebrionidae*, *Rhizophagidae*, *Languridae*, *Anthribiidae*, *Boganiidae* y *Nitidulidae*. Otros insectos frecuentan los conos masculinos de cícadas, como las abejas *Trigona*, un género conocido del Cretácico, lo que sugiere una asociación muy antigua (Jolivet, 2005).

Los polinizadores están restringidos a unos cuantos géneros puesto que las cícadas no representan una fuente de alimento para todos, debido a que están protegidos con compuestos altamente tóxicos. Sólo los insectos que tienen la capacidad para desintoxicar o controlar los compuestos de las plantas pueden alimentarse de ellos. Esta toxicidad ha sido considerado como una estrategia de defensa hacia los herbívoros (Prado, 2011).

4.2.11 Toxicidad

En las cícadas se han registrado los glucósidos del metilazoximetanol (MAM), cicasina, macrozamina y neocicasinas, una clase de compuestos neurotóxicos y carcinogénicos, , en particular se ha establecido que la cicasina es característica y exclusiva de todas las cícadas porque está presente en todos los géneros de este taxón y ausente en otras gimnospermas y en los helechos. La Macrozamina es el glucósido más abundante encontrado en estas plantas y cuya concentración parece característica a nivel genérico (Siniscalco, 1990).

La parte tóxica de la cicasina es el grupo metilazometoxipresente en su estructura, el cual es liberado como MAM, al ser metabolizado en el aparato digestivo por la enzima-glucosidasa derivada de la fauna bacteriana normal del intestino delgado. Por esta razón, la cicasina solo ejerce su efecto tóxico cuando es ingerida por vía oral. El MAM deriva del metabolismo de la macrozamina, tiene capacidad tóxica y carcinógena muy alta debido a la presencia del grupo *azo* en su estructura química. Este compuesto a nivel celular inhibe la síntesis de proteínas y afecta al ADN de las neuronas vulnerables llevándolas a procesos apoptóticos (Rivadeneira y Rodríguez, 2013).

Se ha encontrado la asociación entre el consumo de semillas de cícadas y sus derivados con alteraciones motrices y electroencefalográficas en animales de experimentación y en el ser humano se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas como el complejo demencia-parkinsonismo-esclerosis-lateral amiotrófica (DPELA) y otras enfermedades de la motricidad (Rivadeneira y Rodríguez, 2013).

Estos compuestos, al parecer son elementos cruciales en el desarrollo y mantenimiento del mutualismo (polinización) y el parasitismo (herbivoría) de los herbívoros vinculados a las cícadas (Schneider *et al*, 2002).

4.3 Sistemática y distribución de las cícadas

Anteriormente el orden cycadales se agrupaban en 3 familias *Cicadaceae*, *Zamiaceae* y *Stangeriaceae*, esta última con dos géneros, *Bowenia* y *Stangeria*. Actualmente el orden Cycadales se representa únicamente por dos familias: *Cicadaceae* con un sólo género *Cycas* y *Zamiaceae* con nueve géneros *Bowenia*, *Ceratozamia*, *Dioon*, *Encephalartos*, *Lepidozamia*, *Macrozamia*, *Microcycas*, *Stangeria* y *Zamia* (Christenhusz, *et al.*, 2011). Primeramente se reconocían 11 géneros dentro del Orden, sin embargo, el género *Chigua* se reasignó al género *Zamia*, considerando *C. bernalii* y *C. restrepoi*, sus dos únicas especies, como una sola identidad *Zamia restrepoi* (Lindstrom, 2009). Quedando el orden cycadales representado por 10 géneros.

Su distribución comprende cuatro grandes áreas: África y las islas del Océano Índico, Australia, Asia y América (Donaldson, 2003). Se encuentran en las regiones tropicales del mundo. Son abundantes en Sudáfrica, Australia, Sudamérica, Centroamérica (mayor diversidad) y las islas del Caribe (Yañez, 2004).

Los centros de diversidad de cícadas se producen en el sur de África, Australia, y el trópico del Nuevo Mundo, aunque la extensión de la diversidad varía a nivel de familia, género, y especies. A nivel genérico, el Nuevo Mundo tiene la mayor diversidad con cinco géneros (*Ceratozamia*, *Chigua*, *Dioon*, *Microcycas* y *Zamia*), mientras que Australia tiene cuatro géneros (*Bowenia*, *Cycas*, *Macrozamia* y *Lepidozamia*). Tres géneros se encuentran en África (*Cycas*, *Encephalartos* y *Stangeria*) y sólo *Cycas* ocurre en Asia (Donaldson, 2003). Es importante recordar que *Chigua* fue recientemente reasignada al género *Zamia*. La diversidad de cícadas se distribuye mucho más uniformemente en nivel de especie, con amplia evolutiva radiaciones en *Cycas*, *Encephalartos*, *Macrozamia*, *Zamia*, *Ceratozamia* y *Dioon*. Como resultado, Australia, Asia, África y el Nuevo Mundo tienen cada uno más de 60 especies. A pesar de la amplia distribución a nivel de especie, algunas regiones se destacan como centros críticos de diversidad de especies, en particular Australia, Sudáfrica, México, China y Vietnam, que en conjunto representan más del 70% de la población mundial de cícadas (Donaldson, 2003).

En México se encuentra la familia Zamiaceae con tres géneros que son *Ceratozamia*, *Zamia* y *Dioon* (Yáñez, 2004). Se distribuyen por lo general en zonas del ecotono entre la selva tropical seca y el bosque de encinos y pinos, a lo largo y ancho de la sierra madre occidental, la oriental, la del sur y el eje volcánico transversal. Muchos de estos confines concuerdan con los lugares considerados como refugios del ecosistema de selva tropical seca durante las glaciaciones del pleistoceno (Gutiérrez 2010).

4.4 Género *Dioon*

El nombre *Dioon* se deriva del griego *dis* (dos) *oon* (huevos) refiriéndose a que cada escama que conforman los conos femeninos (esporofilos) contiene dos semillas aunque esa no sea una característica exclusiva del género. Además, tienen los troncos cilíndricos, robustos y a veces subterráneos (Gutiérrez 2010); todas las especies son arborescentes con diferentes longitudes de tronco y los tallos están protegidos con las bases de los pecíolos persistentes protegiendo así a las plantas de incendios (Vovides, 2008), en algunas especies pueden llegar a tener más de 10 metros de altura. Tienen una corona cerrada de hasta 30 hojas dispuesta en espiral (Gutiérrez 2010).

Dioon es un género exclusivamente neotropical (continental) con 13 especies conocidas actualmente, 12 son endémicas de México y una especie conocida desde Honduras y posiblemente Nicaragua (Vovides, 2008). En México se distribuye en ambas vertientes, en la vertiente occidental desde Sonora hasta Chiapas y en la vertiente oriental desde el Sur de Tamaulipas hasta Veracruz. Se puede considerar un género casi exclusivamente mexicano, con la excepción de la especie hondureña *Dioon mejiae* Standley & L. O. Williams (Vovides, 1983).

4.5 *Dioon merolae*

Esta especie fue encontrada en Chiapas, México, Distrito de Tonalá, Cerro de la Placa, cerca 4 km al oeste de Tres Picos, el 27 de mayo 1979, por Mario Vázquez Torres, con características particulares que la definieron como especie, esta especie tiene una distribución restringida en esta zona por lo que se clasifica como una especie endémica, el nombre común por el que es conocido es “Espadaña”. Lo peculiar de esta especie son sus hojas planas lineal-

lanceoladas que surgen en un ángulo agudo respecto al raquis, imbricados y oblicuamente insertados en ella, a excepción de la porción basal de la fronda. Estos ejemplares permiten separar *Dioon merolae* de las otras especies del género (De Luca *et al*, 1981).

Actualmente la especie se ha encontrado en pequeñas poblaciones aisladas en Oaxaca, en la Sierra Madre del Sur, la Sierra de Juárez, los Valles Centrales, en las regiones de Tehuantepec y Los Chimalapas y en al menos 12 poblaciones en dos regiones fisiográficas de Chiapas (figura 8): la Depresión Central de Chiapas (municipios de Cintalapa, Jiquipilas, La Concordia y Villaflores) y la Sierra Madre de Chiapas, en los municipios de Arriaga y Tonalá (Lázaro - Zermeño *et al.*, 2012).

La especie tiene plantas arborescentes que constan de un tronco cilíndrico, erecto o inclinado, de 3 m o más de altura, con diámetro de 25-40 cm. Pueden presentarse uno o más tallos secundarios unidos a una misma base que no rebasan los 3.5 m de longitud, y cada tallo puede producir su copa de hojas y eventualmente ramificar en su porción distal (Lázaro - Zermeño *et al.*, 2012).

La especie muestra catafilos densamente lanosos ca. 10 cm de largo y con bases de 2 cm de ancho. Las hojas son planas, numerosas, coriáceas, ascendentes, tomentosas cuando jóvenes al madurar glabras, de 100 a 140 cm de largo (De Luca *et al*, 1981) presentan un color verde oscuro, semibrillantes en la madurez. El raquis es semi-cilíndrico, recto o irregularmente retorcido; pecíolo semi-cilíndrico de 7-10 cm de largo y con base de 2-3 cm de ancho. Folíolos subopuestos, numerosos (120 o más), linear-lanceolados, con un aguijón, insertados oblicuamente sobre el raquis, imbricados con excepción de los basales, márgenes revolutos, adelgazándose hacia la base, el ápice tendiente a espinuloso. Folíolos inferiores de 1 cm de largo y 2 mm de ancho, gradualmente más grandes, margen entero o con un aguijón; folíolos de la parte media 7-9 cm de largo, 10-12 mm de ancho, ca. 20 nervios, márgenes, enteros o con 1-2 aguijones de 1 mm de largo en la parte superior; los folíolos superiores gradualmente decreciendo hasta 1.5-2.0 cm de largo y 3 mm de ancho, márgenes inferiores enteros o dentados, con uno o rara vez dos aguijones, márgenes superiores con 1-4 aguijones de 1 mm de largo (De Luca *et al*, 1981).

Dioon merolae produce sus estructuras reproductivas en elápice de los tallos. Los megaestróbilos emergen entre marzo y mayo, pueden ser fertilizados entre agosto y diciembre durante un periodo individual de fertilidad de tres semanas. El megaestróbilo es ovoide de 45 × 25 cm y pesa en promedio 3.6 kg (± 1.97 , $n = 6$; aunque se han encontrado conos de más de 6.4 kg), ápice agudo; las escamas son lanceoladas de 10-12 × 4-5 cm, densamente lanosas en su exterior. El microestróbilo es alargado cilíndricamente, de (20-) 30-40(-60) × 8-10 cm; pueden emerger en cualquier época del año y se desarrollan completamente en un lapso de siete meses y pesan en promedio 216 g (± 128.0 , $n = 10$). Los microesporofilos con la base angosta de 2.5 cm de largo; la parte fértil bilobada, la parte estéril hacia arriba con un ángulo menor a 30° del eje (*parte esterili sursum arrecta*; De Luca *et al.*, 1981), con una proyección curva terminada en punta en su mitad superior. Las semillas son ovoides, de 3 cm de diámetro y pueden producirse entre 107 y 149 semillas por cono, con un peso promedio de 14.4 g (± 1.8 , $n = 154$) cada una (Lázaro-Zermeño, 2002). Las semillas pueden desprenderse del cono generalmente a los ocho meses después de la polinización, en algunos casos hasta 22 meses después. Las semillas están cubiertas por una sarcotesta almidonosa y aromática de color amarillo. Al caerse la sarcotesta y si el embrión se ha desarrollado completamente, la semilla puede germinar de inmediato. Las semillas son recalcitrantes y, por tanto, no forman bancos de semillas (Lázaro-Zermeño *et al.*, 2012).

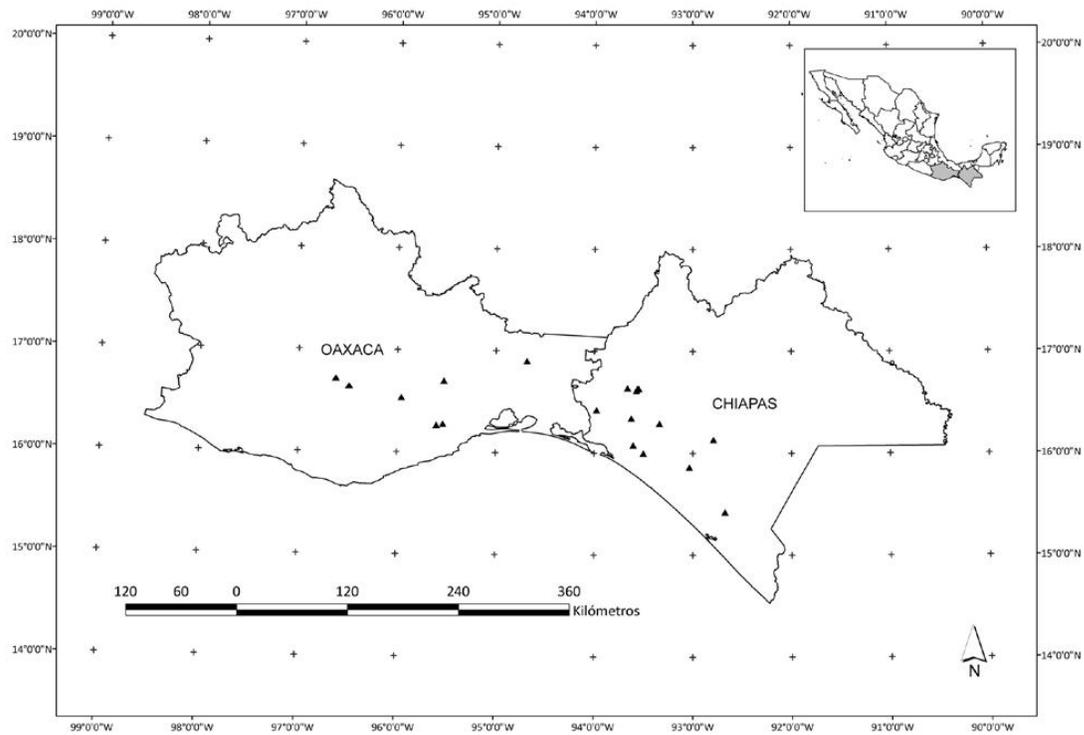


Figura 8. Distribución de las poblaciones de *Dioon merolae* en Chiapas y Oaxaca, México (Tomada de Lázaro-Zermeño *et al.* 2012)

Esta especie es localmente llamada “espadaña” (en español, perteneciente a espada) o como “nimalari” (nima: hoja, lari: pluma, en el lengua materna chiapaneco, y es muy venerada durante el festival religioso de la Santa Cruz del 3 de mayo. El festival se inicia durante la última semana de abril con la colecta de espadaña por los habitantes de Terán y Suchiapa, Chiapas. Estas personas caminan 42 millas de Suchiapa a Cerro Nambiyugua cerca de Villaflores o desde Terán al Cerro Estoraque en el municipio de Jiquipilas cada año. No hay otros usos conocidos de esta planta por las personas locales, más que como símbolo religioso y el ornamento (Pérez y Vovides, 2006). Actualmente *Dioon merolae* ocupa sólo las laderas de los promontorios rocosos y no las áreas llanas con suelos aluviales (González-Espinosa *et al.*, 2012).

Para la ceremonia de la santa cruz, los recolectores de hojas (espadañeros) con frecuencia desprenden hasta 100% de las hojas de individuos adultos (generalmente 1-2.5 m de altura), que al realizarse de manera anual repercute en el desempeño reproductivo y el tamaño de las hojas pues se ha encontrado que en una población anualmente defoliada, los

individuos femeninos de *D. merolae* se reproducen menos que los individuos no defoliados (Lázaro -Zermeño *et al.*, 2010). Actualmente el número de plantas vivas y de hojas en cada planta ha disminuido debido a la cosecha anual mal planificada. Solamente los individuos distribuidos en lugares de difícil acceso, como las partes altas de los montículos y acantilados, han quedado fuera del alcance de los grupos de espadañeros (unas 40 personas por grupo, que colectan cada una 200-300 hojas). Lo anterior ha provocado que los espadañeros busquen nuevas localidades para seguir con la tradicional cosecha de hojas (Lázaro -Zermeño *et al.*, 2012).

D. merolae tienen un alto valor en el mercado ilegal nacional e internacional como plantas de ornato (Pérez y Vovides, 2006). Sin embargo, la mayor amenaza a sus escasas poblaciones se debe a la intensa cosecha anual de las hojas de los adultos (Pérez y Vovides, 2006), a su limitada regeneración por semilla y a los efectos esporádicos sobre plántulas y juveniles, ocasionalmente severos, de incendios rasantes y sequía (González- Espinosa *et al.*, 2012). Estos factores aunado a su lento crecimiento y el avance de la frontera agrícola que reducen su hábitat natural hacen que esta especie hoy se encuentre dentro de la NOM 059 desde 1994 (INE, 1994) catalogada como en peligro de extinción.

4.6 Propagación y cultivo de cícadas

Las cícadas son poco conocidas en la horticultura, en parte, porque ellos raramente se cultivan en los viveros, su escasez en el comercio, sin embargo, es causada por una falta general de información de la horticultura, la falta de disponibilidad de semillas, que son inherentemente lentas para germinar, y en la mayoría de las especies, también su crecimiento (Dehgan, 1983). Son pocas las especies de las cuales se conoce un método eficiente para propagación de ejemplares, muchas otras son obtenidas de su hábitat natural para la comercialización. Sin embargo, es muy importante conocer un proceso eficaz que permita reproducir la especie para fines de conservación ya que aunque haya especies poco conocidas en el mercado ornamental muchas están amenazadas por otros factores.

La propagación de las cícadas puede darse por semilla que es la más conocida pero la más lenta, y la vegetativa, que consiste en sacar hijuelos a partir de los nuevos retoños que aparecen

alrededor de la planta adulta, esta última aplicada a pocas especies, la mayoría con muchos años de investigación (Dehgan, 1983).

En el caso de la propagación por semilla Pérez y Vovides (1997) sugieren que una vez colectadas las semillas, estas deben limpiarse, esto consiste en eliminar la capa carnosa o sarcotesta de las semillas, debido a que estas presentan sustancias inhibitorias a la germinación, por lo que debe de eliminarse antes de sembrarse. El ácido abscísico (ABA) o sustancias con propiedades similares son los responsables de este letargo químico. Estas sustancias químicas se originan a partir de los carotenoides, violaxantina por vía de producción de xantoxina en varias partes de las semillas maduras. Estos carotenoides se han identificado como del tipo (alfa-caroteno, cryptoxantina y zeaxantina en los túbulos de cromoplastos, en *Cycas revoluta*, dando a la semilla una coloración anaranjada. El efecto inhibitorio de la sarcotesta puede ser resultado del ABA y otras sustancias que se originan de estos carotenoides. Las semillas germinan solo cuando la sarcotesta es removida o naturalmente eliminada. Para esto, las semillas frescas, se colocan en una cubeta con agua, dejándolas remojar por unos días, para que, estas se ablanden, y la capa carnosa pueda desprenderse fácilmente (Pérez y Vovides, 1997).

Si las semillas colectadas, presentan letargo por embrión no desarrollado, como en el caso de algunas especies de *Ceratozamia*, es aconsejable almacenarlas por tres o cuatro meses. Después de la colecta de las semillas, se debe realizar la limpieza de las semillas previo al almacenamiento. Este tiempo sirve para que el embrión complete su desarrollo de una forma natural y maduren bien. Las semillas pueden colocarse en un costal con arena húmeda para su almacenamiento. No obstante, las semillas no deben almacenarse por tiempo indefinido, ya que las semillas de las cícadas son recalcitrantes, es decir que estas se secan y pueden perder su viabilidad (Pérez y Vovides, 1997).

El almacenamiento de las semillas en un ambiente cálido, puede ocasionar un desarrollo más rápido del embrión, pero también existe una pérdida rápida de la viabilidad. En contraste, el almacenamiento en frío, el embrión se desarrolla lentamente, pero existe pérdida de la

viabilidad. Lo más recomendable es almacenar las semillas en una bolsa de plástico con musgo ó heno a una temperatura de 10-15 °C (Pérez y Vovides, 1997).

Algunos estudios de maduración en semillas de cícadas han demostrado, que muchas especies presentan letargo por embrión inmaduro y en este estado las semillas son incapaces de germinar. Si las semillas se mantienen almacenadas adecuadamente, el embrión continúa su desarrollo lentamente hasta alcanzar su madurez, posteriormente, puede ser capaz de germinar. Este largo periodo de tiempo de almacenamiento, es conocido como periodo postmaduración, el cual es variable para cada especie. Algunas especies de *Ceratozamia*, *Dioony Zamia*, presentan períodos cortos de postmaduración, los cuales requieren unos 30 días para que sus semillas maduren. Mientras que en *Bowenia*, *Cycas*, *Encephalartos*, *Lepidozamia*, *Macrozamia*, y *Stangeria* puede ser hasta de 6 a 12 meses para este proceso (Pérez y Vovides, 1997).

Cuando las semillas colectadas están maduras, como en el caso de *Dioon merolae*, el cual no presenta letargo de embrión inmaduro, la germinación se presenta aproximadamente en 30 días. Mientras que las semillas de *Ceratozamia norstogii*, el cual presentan letargo de embrión no desarrollado, es necesario unos 3 meses de almacenamiento, para que sus semillas maduren bien (Pérez y Vovides, 1997).

4.7 Germinación de cícadas

En la germinación de semillas de cícadas, se encuentran involucradas tres dormancias independientes, la capa carnosa que tiene un efecto inhibitorio, la capa pétreo que es gruesa y evita la entrada de agua a la semilla, y el embrión, el cual tiene que madurar antes de que las semillas germinen. El embrión en la mayoría de las cícadas no es completamente maduro en el momento de abscisión semilla. En varias especies la eliminación de la capa carnosa es suficiente para permitir la germinación, las semillas siempre se recogen sólo después de que los conos se han desmoronado. Varias especies de *Dioon*, *Macrozamia*, *Lepidozamia*, así como *Zamia loddigesii* Miq. Y *Z. fischeri* Miq., están entre las que germinan sin dificultad. Esto se produce porque el embrión es maduro, a pesar del espesor de la

esclerotesta. El espesor de ésta, sin embargo, es un importante obstáculo para la germinación en las especies cuyos embriones están todavía en las etapas tempranas de desarrollo, aunque las semillas pueden parecer maduras en su totalidad (Dehgan, 1983).

Para la germinación de cícadas es importante tener humedad en el medio germinativo y una temperatura de 21-27°C con sombra parcial y una humedad relativa de 60-70%. (Pérez y Vovides, 1997).

En *Dioon merolae*, la germinación se presenta cuando la radícula brota, esta presenta un color blanco a beige de consistencia dura y con un diámetro aproximado de 5 mm (a los 24 días aproximadamente), se engruesa y se forma un hipocótilo, desde donde emerge una raíz, que se alarga llegando a medir 25 cm de largo a los 4 meses de siembra y observándose la formación de raíces laterales. El hipocótilo se va engrosando conforme se va desarrollando la plántula (Pérez y Vovides, 1997).

El vástago comienza a emerger a los 5 meses de siembra, este emerge de un ensanchamiento que se produce en la base del hipocótilo, principalmente por una abertura en donde se desarrolla una yema vellosa que al crecer se alarga y da origen a la hoja primaria, esta hoja es aplanada y plegada de color verde claro, pubescente y flexible, a medida que crece se va abriendo y endureciendo, haciéndose coriácea (a los 6 meses de siembra). Los folíolos son opuestos a subopuestos, presentan dos a tres espínulas en cada uno de los márgenes y de una a dos espinas en el ápice. De la misma manera se presenta la germinación en *Ceratozamianorstogii*, al mes de haberse sembrado, las semillas germinan, y a los 3 meses emergen la primera hoja con 4 o 6 folíolos (Pérez y Vovides, 1997).

Pérez y Vovides (1997) recomiendan que una vez germinadas, las plántulas pueden trasplantarse en túneles de plástico en un ambiente controlado con un rango de temperatura de 28-30°C. Bajo estas condiciones de cultivo, se puede aplicar regularmente cada fin de semana fertilizantes líquidos en forma de N-K-P, 3-1-5 en una dilución 1:1000. Así también, se recomienda un pH de sustrato de 6.5-7.0

4.8 Crecimiento de cícadas

El problema de lento crecimiento y el desarrollo en las cícadas ha sido ampliamente ignorado. Sin embargo, es la principal causa de su desaparición en la naturaleza. Sólo (Dehgan, 1983) ha reportado la mejora en crecimiento y número de hoja de *ZamiainTEGRIFOLIA* de manera significativa con los niveles de nitrógeno adicionales. Un factor importante de control en la disponibilidad de nutrientes es el pH del suelo. La formación de nódulos fijadores del Nitrógeno está directamente afectada por el Ca^{2+} , humedad disponible, y el pH del suelo. La adición de N a partir de fuentes combinadas (nitrato y amoníaco) también tiende a reducir la formación de nódulos y la fijación de N. Así, en virtud de un cultivo donde diversos factores pueden ser controlados, la fertilización debe consistir en sólo una forma de Nitrógeno. Los resultados preliminares indican la aplicación de N en forma amoniacal es preferible para el crecimiento de plántulas. Una característica única de todas las cícadas es la rápida extensión de la raíz principal.

4.9 Cultivo *in vitro* de cícadas

Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se incluyen como una de las áreas de la Biotecnología Agrícola que más ha sobresalido debido a la amplia gama de aplicaciones que ha tenido desde hace mucho tiempo. Entre ellas se tiene la propagación masiva de plantas sobre todo aquellas de gran interés económico y/o alimenticio, propagación de plantas libres de virus, propagación de especies en peligro de extinción, conservación de bancos de germoplasma y las aplicaciones en el mejoramiento genético vegetal, por destacar las más sobresalientes.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es un grupo heterogéneo de técnicas, no una disciplina científica, mediante las cuales un explante (parte separada (disecada) de un vegetal: protoplasto, célula, tejido u órgano) se cultiva asépticamente en un medio de cultivo de composición química definida y se desarrolla (crece y diferencia) bajo condiciones ambientales controladas.

En particular en México, en los últimos años, una de las alternativas más exitosas para recuperar especies en riesgo o peligro de extinción, es la técnica de cultivo de tejidos

vegetales *in vitro*. Muchas especies son cotizadas ya sea por su uso, belleza o por su edad lo que la mayoría de las veces los expone a la extinción.

Uno de los problemas que frecuentemente se presenta al implementar la técnica de cultivo de tejidos es la obtención y desinfección de explantes, ya que en ocasiones no se dispone del material vegetativo, o bien este puede tener un alto grado de contaminación en el medio natural donde se encuentra, siendo una de las etapas más difíciles de enfrentar, por lo que las semillas son una muy buena alternativa para obtener explantes en condiciones asépticas, al inducir su germinación *in vitro*, de este modo, se obtienen pequeñas plántulas de las que se utilizan sus tejidos como explantes para la formación de callo, brotes o plántulas. La germinación *in vitro* tiene ventajas respecto a la producida en condiciones naturales: Puede solucionar casos de inhibición total de la germinación, permitir la germinación de semillas con intermediario obligado, aumentar la tasa de germinación, evitar el aborto embrionario, reducir el tiempo necesario y sincronizar la germinación (Cuellar *et al.*, 2006).

En cícadas los trabajos sobre cultivo de tejidos vegetales *in vitro* son realmente pocos comparado con otras especies. Se han hecho trabajos de cultivo *in vitro* en varias cícadas como en los géneros *Zamia*, *Ceratozamia* y *Dioon*.

Se ha reportado regeneración de cícadas vía organogénesis en *Ceratozamia hildae*, *Ceratozamia mexicana*, *Dioon edule*, *Zamia pumila*, *Zamia fischeri*, y *Zamia furfurácea* por organogénesis a partir de embriones cigóticos extirpados. (Litzet *al.* 2005)

Chávez *et al.* (1995) describió la inducción de cultivos embriogénicos a partir de hojas maduras de *Ceratozamia mexicana*, y demostró que la histología de los embriones somáticos y cigóticos fueron similares

En Costa Rica se han hecho varios trabajos de micropropagación con el género *Zamia*, Venegas (1997) obtuvo la micropropagación de *Zamia skinneri* y *Warszewia* partir de megagametofitos mientras Bolaños (2005) hizo un trabajo con la misma especie pero a partir

de segmentos de foliolo y de tallo con la que obtuvieron callos; sin embargo, a partir de estos no se pudo obtener la organogénesis con los medios de cultivo utilizados.

En el género *Dioon* se reportan dos estudios en *D. edule*, en el que se formaron brotes a partir de megagametofitos y de embriones cigóticos (Chávez y Litz, 1999), mientras en *Dioon merolae* se hizo un estudio de morfogénesis a partir de explantes de embriones cigóticos y megagametofitos a partir de los cuales se obtuvo la inducción de callos y en algunos la formación de brotes adventicios (Cabrera, 2008).

4.10 Hormonas vegetales o fitohormonas

Se entiende por hormonas vegetales aquellas sustancias que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo ó metabolismo del vegetal. El término "sustancias reguladoras del crecimiento" es más general y abarca a las sustancias tanto de origen natural como las sintéticas que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo ó desarrollo en la planta.

Las fitohormonas son las moléculas responsables del desarrollo, aunque no se sabe bien cómo actúan en las células. Se sabe que su mecanismo de acción es por interacción con un receptor específico (la sensibilidad de un tejido hace referencia a su número de receptores), y que su modo de acción una vez recibida la señal es por transducción. De la transducción se sabe poco, pero parece ser que no es muy diferente de la de los animales.

Las rutas de transducción transforman la señal en una respuesta. La actuación depende de la sensibilidad del tejido y de la concentración de la hormona. Se denomina nivel activo de una hormona a las formas que desencadenan respuestas. Es necesario un control u homeostasis hormonal, importante para el control del crecimiento, defensa ante situaciones eventuales como cerrar constantemente los estomas en sequía. Para ello existen diversos mecanismos: a). Biosíntesis: es la fabricación de hormonas para aumentar su concentración; b). Degradación catabólica: es la eliminación para conseguir el efecto contrario; c) Transporte: es llevar

hormonas de zonas de afloramiento a zonas de déficit, o transportar hormonas al lugar donde se necesita su acción; d). Conjugación: es la modificación de hormonas (añadiendo azúcares o aminoácidos principalmente, o otras moléculas de bajo peso molecular). Sirve como paso inicial para la degradación de éstas, para poder almacenarlas, para su mayor eficacia en el transporte o para inactivarlas; y e). Compartimentación: sirve para aumentar o disminuir los niveles hormonales.

4.10.1 Auxinas

Son las primeras hormonas que se descubrieron. Su estructura es un derivado del fenol o el indol, y tienen anillos aromáticos con dobles enlaces conjugados. La forma de ocurrencia natural más común de auxina es el ácido indol-3-acético (AIA) que se determinó a mediados de la década de 1930. Los compuestos que sirven como precursores de IAA también pueden tener actividad de las auxinas (por ejemplo, indoleacetaldehído). Algunas plantas contienen otros compuestos que muestran una débil actividad auxina. IAA también puede estar presente como diversos conjugados tales como aspartato indoleacetyl. Mientras el Ácido 4-cloroindolacético (4-CL-IAA) también se ha reportado en varias especies, aunque no está claro hasta qué punto la actividad de las auxinas endógena en las plantas puede ser explicada por 4-CL-IAA. Varias auxinas sintéticas también se utilizan en aplicaciones comerciales (Davies, 2004).

Otras auxinas fueron descubiertas más tarde en las plantas superiores, pero IAA es con mucho el más abundante y relevante fisiológicamente. Debido a que la estructura de la IAA es relativamente simple, que laboratorios académicos e industriales fueron rápidamente capaces de sintetizar una amplia gama de moléculas con actividad de las auxinas. Algunos de estos son utilizados como herbicidas en la horticultura y la agricultura (Taiz y Zeiger. 2010).

Uno de los papeles más importantes de la auxina en las plantas superiores es la regulación del crecimiento de elongación en tallos y coleóptilos, la auxina promueve el crecimiento de elongación principalmente mediante el aumento de la extensibilidad de la pared celular. es responsables del fototropismo y gravitropismo Además de sus papeles en el crecimiento y el tropismos, auxina juega papeles reguladores centrales de la dominancia apical, la iniciación de

las raíces laterales, abscisión de la hoja, la diferenciación vascular, formación de yemas florales, y el desarrollo del fruto (Taiz y Zeiger, 2010). Sin embargo, en varios sistemas (por ejemplo, crecimiento de las raíces) la auxina, particularmente en altas concentraciones es inhibidora. Casi invariablemente, esto se ha demostrado que está mediada por el etileno producido. Si la síntesis del etileno se previene por diversos inhibidores de la síntesis de etileno, entonces no será auxina inhibidora (Davies, 2004).

Las auxinas también inducen la síntesis de giberelinas, hormonas que promueven el crecimiento del tallo, por lo que las auxinas también estimularían el crecimiento en forma indirecta. (Jordán y Casaretto, 2006). Las auxinas principales son el Ácido indolacético que es con la que se ha experimentado, el Ácido 4-cloroindolacético, el Ácido indolbutírico el cual actúa en el enraizamiento, y el Ácido fenilacético, entre otros.

Las aplicaciones agrícolas de las auxinas son la reproducción, la formación de frutos, floración, partenocarpia (frutos sin semilla), aparición de flores femeninas y creación de herbicidas y enraizadores (Cassan, *et al*, 2008).

4.10.2 Giberelina

Las giberelinas son una familia de compuestos terpenoides, definidos por su estructura están constituidos por unidades de isopreno. Son un grupo de hormonas muy heterogéneo, ahora son más de 125, algunos de los cuales sólo se encuentran en el hongo *Gibberella fujikuroi*. Las más comunes son GA₁, GA₃ y GA₄ (Taiz y Zeiger, 2010), siendo GA₁ la giberelina más importante en plantas, la cual es la principal responsable de la elongación de tallos, mientras muchas otras son las precursoras de GA₁ (Davies, 2004).

Las giberelinas se sintetizan a partir de gliceraldehído-3-fosfato, vía isopentenil difosfato, en los tejidos jóvenes del tallo y semillas en desarrollo. Su biosíntesis comienza en el cloroplasto y posteriormente implica membrana y grados citoplásmicos. Algunas GAs están probablemente transportadas en el floema y xilema. Sin embargo, el transporte principal de GA₁ parece restringido (Davies, 2004).

Las giberelinas inducen la elongación de los entrenudos en ciertos tipos de plantas, como las especies y hierbas enanas y roseta. Otros efectos fisiológicos de giberelinas incluyen cambios en la fase juvenil y la flor, la sexualidad y la promoción de la producción de frutos, crecimiento del fruto y la germinación de semillas. Las giberelinas tienen varias aplicaciones comerciales, principalmente en la mejora del tamaño de uvas sin semillas y en el malteado de la cebada. Inhibidores de la síntesis de giberelina se utilizan como agentes enanismo (Taiz y Zeiger, 2010).

4.10.3 Citocininas

Las citocininas son un grupo de hormonas vegetales que promueven la división celular y la diferenciación (Mok y Mok, 2001). Las citoquininas naturales pueden definirse estructuralmente como moléculas derivadas de la adenina con una cadena lateral unida al grupo amino 6 del anillo purínico. La cadena lateral puede ser de naturaleza isoprenoide o aromática. Dentro de las citoquininas isoprenoides se encuentran la zeatina, la isopenteniladenina y la dihidrozeatina. Entre las aromáticas se incluyen la benciladenina, la cinetina y la topolina. También se consideran citocininas ciertos compuestos sintéticos derivados de la difenilurea como el CPPU y el tidiazuron (TDZ), que actúan como análogos estructurales de la molécula natural y presentan una actividad muy potente (Azcon-Bieto y Talon, 2000).

Las Citocininas se sintetizan en cualquier tejido vegetal: tallos, raíces, hojas, flores, frutos o semillas, aunque se acepta generalmente que es en las raíces donde se producen las mayores cantidades de estas hormonas. Regularmente, hay mayor producción de citocininas en sitios y momentos en los que haya iniciado un proceso de diferenciación celular y/o una intensa división celular, sea porque se requiere para inducir el proceso y/o porque las nuevas células formadas sintetizan mayores cantidades de esta hormona. Así, cualquier tejido o etapa de la planta que no presente actividad de crecimiento activo, estará produciendo pocas citocininas en sus partes terminales (puntos de crecimiento) (Azcon-Bieto y Talon, 2000).

Las citocininas fueron descubiertos en la búsqueda de los factores que estimulan la división de las células vegetales. En el cultivo de tejidos vegetales las citocininas

están asociadas tanto con la división celular como con la diferenciación que conduce a la producción de yemas del vástago. Las citocininas en sí mismas presentan pocos efectos en las células de cultivo, pero cuando se aplican junto con la auxina, las células cultivadas comienzan a dividirse y diferenciarse. Tales efectos dependen en gran medida de la concentración de los reguladores. Desde su descubrimiento, se ha demostrado que las citocininas tienen efectos sobre muchos otros los procesos fisiológicos de desarrollo, incluyendo la senescencia foliar en movilización de nutrientes, dominancia apical, la formación y la actividad de meristemos apicales, el desarrollo floral, la ruptura de la dormancia de las yemas, y germinación de las semillas. Las citocininas también parecen mediar muchos aspectos de regulación de la luz por el desarrollo, incluyendo la diferenciación del cloroplasto, el desarrollo del metabolismo autotrófico, y la expansión de hojas y cotiledones (Taiz y Zeiger, 2010).

4.10.4 Ácido abscísico

ABA es un compuesto que existe naturalmente en plantas inferiores y superiores. Se trata de una molécula terpenica de 15 carbonos (sesquiterpeno) similar a los carotenoides pero con particularidades, es un ácido, por lo que posee un grupo COOH en un extremo. Como cualquier terpenoide, ABA deriva de un precursor común de 5 carbonos, el isopentenil Pirofosfato (Jordán y Casaretto, 2006).

ABA se sintetiza en casi todas las células que contienen plastidios y puede ser movilizado por toda la planta por el xilema y floema. Sin embargo, el examen de algunas enzimas claves ha revelado que ABA es sintetizado preferentemente en tejidos vasculares en plantas no sometidas a estrés. El nivel de ABA fluctúa dramáticamente en respuesta a los cambios ambientales y de desarrollo. Precursores de ABA o la hormona misma pueden luego ser transportados a otros tejidos. Otros lugares de síntesis que se relacionan con la acción de ABA son los embriones y las células guarda (oclusivas) de los estomas. Las concentraciones típicas de ABA son entre 0,01 y 1,0 mg/L, pero estos niveles pueden incrementarse hasta 50 veces bajo estrés hídrico (Taiz y Zeiger, 2010).

ABA controla muchos aspectos importantes del desarrollo de la planta, incluyendo la síntesis de proteínas y lípidos de almacén en semillas, la adquisición de la tolerancia de semilla a la desecación y la inhibición de la transición a germinación y crecimiento reproductivo (la latencia de las semillas y la germinación son controlados por la relación de ABA y GA, deficiencia de ABA en embriones pueden presentar la germinación precoz y viviparidad)(Taiz y Zeiger. 2010).

ABA también estimula respuestas a estreses ambientales como el cierre estomático inducido por sequía o estrés osmótico (durante la escasez de agua, el nivel de ABA de la hoja puede aumentar 50 veces. Además de cerrar los estomas, ABA aumenta la conductividad hidráulica de la raíz), la inducción de tolerancia a sequía, salinidad, hipoxia, bajas temperaturas y respuestas a heridas y patógenos(Jordán y Casaretto, 2006). Aunque se sabe menos sobre el papel de la ABA en brotes, ABA es uno de los inhibidores que se acumula en las yemas dormidas (Taiz y Zeiger. 2010)

No existen muchas aplicaciones prácticas para el ABA debido a los distintos efectos que puede causar en las plantas, en especial la inhibición de crecimiento y debido al escaso conocimiento de sus efectos en la fisiología y procesos bioquímicos. Sin embargo, muchas de las investigaciones para mejorar la tolerancia de cultivos contra estreses, pretenden incrementar la capacidad de las plantas de acumular ABA o optimizar la respuesta de ellas cuando están sometidos a condiciones adversas. Debido a que ABA ejerce muchos efectos fisiológicos en algodón, una de las aplicaciones de esta hormona es como defoliante de esta planta. A nivel biotecnológico donde su uso cumple un rol único fundamental, es en la inducción de embriones de células en suspensión derivadas de masas embrionales (de reciente polinización), en el proceso denominado “poliembriogénesis somática”, atinente exclusivamente al tipo de morfogénesis y respuestas de coníferas, bajo condiciones *in vitro*(Jordán y Casaretto, 2006).

4.10.5 Etileno

El Etileno (C₂H₄) es la única hormona vegetal gaseosa, simple y pequeña, presente en angiospermas y gimnospermas aunque también en bacterias y hongos además de musgos,

hepáticas, helechos y otros organismos. Siendo un gas puede moverse rápidamente por los tejidos, no tanto por transporte sino por difusión. Su efecto además se inicia con cantidades mínimas, comúnmente menores a 1.0 ppm (1.0 μL^{-1}), las cuales ya provocan respuestas (Jordán y Casaretto, 2006).

La síntesis de etileno se lleva a cabo a partir de la metionina. Con gasto de un ATP se activa S-adenosilmetionina. Con la ACC-sintetasa a partir del S-adenosil-metionina se forma metil-tio-adenosina (CMTA) y ACC. La CMTA se recicla en metionina ya que es un aminoácido esencial, y el ACC (aminoácido complejo) se forma en etileno con la acción de una ACC-oxidasa desprendiendo dióxido de carbono. Las enzimas ACC-sintetasa y ACC-oxidasa son enzimas inducibles ambientalmente (sobre todo la sintetasa), para poder responder al estrés ambiental. Endógenamente también son inducibles: A mayor concentración de auxinas, mayor de etileno (también ocurre lo mismo con las citocininas aunque en menor grado). La ACC-oxidasa es una enzima constitutiva, está siempre presente y limita la producción de etileno. Está estimulada por el ambiente y por la maduración (Taiz y Zeiger, 2010).

El etileno regula la expansión celular en hojas y la expansión lateral en plántulas en germinación con inhibición de la elongación del epicótilo y radícula, causando también un incremento en la curvatura a nivel de la porción cotiledonar, lo que en conjunto se conoce como el efecto de la “triple respuesta”. Otros efectos fisiológicos del etileno son la epinastia, inducción de floración, quiebre de la dormancia en semillas y yemas, maduración de frutosclimatéricos, aceleración de la senescencia y caída de hojas y de flores (Jordán y Casaretto, 2006).

Es una hormona asociada a todas las situaciones de estrés de la planta (temperaturas extremas, heridas, patógenos etc.). Interviene en la formación de parénquima, formando un tejido con huecos para favorecer la llegada de oxígeno a las raíces. Los huecos se obtienen mediante la lisis de células. También puede generarse un parénquima muy compacto para limitar el acceso de oxígeno. El etileno también se ha demostrado que actúa como un regulador positivo de la formación de pelos radicales en varias especies. Promueve la elongación de las especies

acuáticas y a través de la tecnología de la ingeniería genética, se han confirmado tanto el papel de etileno y citocininas en la regulación de la senescencia foliar (Taiz y Zeiger, 2010).

En cuanto a las aplicaciones agrícolas destacan la gran conveniencia de aplicar etileno a frutos de varias especies para incrementar significativamente su tamaño sincronía en la inducción floral referida a piñas o a mango, ambos cultivos de gran relevancia en zonas tropicales, y la inducción floral por etileno de varias especies de Bromeliaceas como ornamentales. Además algunos cultivos que presentan flores femeninas y masculinas, el etileno afecta la diferenciación floral y gatilla la formación de flores femeninas. Con ello el número de plantas productivas y el rendimiento por hectárea aumenta flores (Jordán y Casaretto, 2006).

En biotecnología destaca el retraso de la senescencia y marchitamiento de los pétalo de las flores cortadas durante semanas en estas plantas transgénicas. En futuro cercano puede verse una gran variedad de especies de importancia agrícola que han sido modificados genéticamente para manipular la biosíntesis de etileno o de su percepción (Taiz y Zeiger, 2010).

4.10.6 Brasinoesteroides

Los Brasinoesteroides (BRs) son una clase de polihidroxiesteroides de plantas que han sido reconocidos como un nuevo tipo de fitohormonas que juegan un papel esencial en el desarrollo de la planta. Los brasinoesteroides están estructuralmente relacionados con las hormonas esteroides de los animales y de insectos (Bajguz, 2011).

Los brasinoesteroides son moléculas estimuladoras del crecimiento de las plantas que se encuentran en bajas concentraciones en todo el reino vegetal y se encuentran ampliamente distribuidas en plantas inferiores y superiores. Estos han sido detectados en todas los órganos de la planta tales como el polen, anteras, semillas, hojas, tallos, raíces, flores, y granos (Bajguz, 2011). Participan en la regulación de importantes procesos fisiológicos, tales como germinación, fotomorfogénesis, elongación, y el desarrollo de los órganos reproductivos. A diferencia de otras fitohormonas, estas no están sujetos a transporte activo dentro de la planta, por lo tanto, sus niveles son determinado por el equilibrio entre las reacciones biosintéticas de

inactivación y locales (Hategan *et al*, 2011). Además, las BRs pueden proteger las plantas de diversas tensiones bióticas y abióticas, tales como las causadas por la sal, altas temperaturas, y metales pesados a través de la activación de diferentes mecanismos (Bajguz y Hayat, 2009).

Para explicar el efecto de los brasinosteroides sobre la expansión celular, diferentes hipótesis han desarrollado y examinado experimentalmente. Se encontró que el efecto de los brasinoesteroides es genéticamente determinado y que probablemente están involucrados en todos los pasos de la regulación del crecimiento celular. Asimismo, el modo de acción está dado principalmente por un efecto sobre la biosíntesis de enzimas como una consecuencia sobre la expresión del genoma y un efecto sobre la pared y la membrana celular (Salgado *et al*, 2008).

Debido a la baja concentración de brasinoesteroides en plantas, se realizan estudios encaminados al esclarecimiento del mecanismo de acción de estos compuestos, lo que ha llevado a la síntesis de análogos de brasinoesteroides no presentes en la naturaleza, que han producido efectos cualitativamente similares al de los compuestos naturales. Estos análogos en general se caracterizan por reproducir sólo determinadas agrupaciones estructurales presentes en los brasinoesteroides naturales (Salgado *et al*, 2008).

Entre los brasinoesteroides y sus análogos aplicados en plantas de valor agrícola se encuentran: Biobras-16 (Cetona esteroideal polihidroxilada), Epin (24-epibrasinólida) EBR (24-epibrasinólida) Epibrasinólida, Brasinólida, Biobras-16 y CIDEF-4 (80 % de compuesto esteroideal) (Salgado *et al*, 2008).

4.11 Biofertilizantes

En la actualidad es importante alcanzar sustentabilidad en los diversos ámbitos de la producción. La agricultura no es la excepción, se busca aumentar los rendimientos, reducir costos y al mismo tiempo alcanzar un equilibrio con el ambiente. Para lograr estos objetivos es importante elegir alternativas de origen biológico como es el caso de los Biofertilizantes ya que los fertilizantes químicos pueden llegar a ser una fuente severa de contaminación del suelo y agua.

4.11.1 Micorrizas

Las micorrizas son asociaciones simbióticas de ciertos hongos en el suelo con las raíces de muchas plantas. La planta cede al hongo hidratos de carbono y el hongo proporciona a la planta un aumento en su capacidad para absorber agua y algunos elementos nutritivos especialmente fosforo (Fuentes, 2006).

Las raíces de una planta micorrizada exploran un volumen de suelo mucho mayor que cuando no hay micorrizas. Además, el hongo segrega unas enzimas que facilitan a la planta la absorción de nutrientes. Todo ello se traduce en un incremento de la biomasa de la planta tanto de la parte aérea como del sistema radical. Por otra parte, el hongo, al desarrollar sus propias defensas, impide el desarrollo de otros posibles competidores, con lo cual la planta hospedera resulta más resistente a organismos patógenos (Fuentes, 2006).

4.11.2 Bacterias

El desarrollo y uso de los biofertilizantes se contempla como una importante alternativa para la sustitución parcial o total de los fertilizantes minerales. La aplicación de bacterias que interaccionan con las plantas es considerada una opción viable en muchos países y en

la actualidad se buscan el desarrollo de biofertilizantes basados en bacterias promotoras del crecimiento vegetal, en particular con la bacteria *Azospirillum*, fijadora de nitrógeno y productora de fitohormonas (Caballero *et al.* 2009). Se considera al *Azospirillum* como uno de los géneros de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal más estudiados en la actualidad debido a su capacidad de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo, así como el rendimiento de numerosas especies vegetales de interés agrícola. Uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal en plantas inoculadas con *Azospirillum* sp., se relaciona con su capacidad de producir y metabolizar compuestos reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas tales como auxinas, especialmente ácido indolacético (AIA) y citosinas o citocininas (Cit); sin embargo, también se ha observado la capacidad de este microorganismo para producir compuestos del tipo giberelinas (GAs), etileno (E), en incluso ácido abscísico (ABA), entre otras moléculas (Cassanet *al.* 2008).

La inoculación con cepas de *Azospirillum* seleccionadas permite reducir hasta en 50% el uso de los fertilizantes minerales (N,P,K) sin que disminuya el rendimiento del cultivo, e incluso se obtiene 5-10% de aumento respecto a los cultivos fertilizados con el 100% del fertilizante mineral (Caballero *et al.* 2009).

5 LITERATURA CITADA

- Acuña-Castillo R. y W. Marín-Méndez. 2013. Comparative anatomy of leaflets of *Zamia acuminata* and *Z. pseudomonticola* (Zamiaceae) in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.)* Vol. 61 (2): 539-546
- Azcón- Bieto J., y Talón M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill Interamericana. 522 p.
- Bajguz A. 2011. Brassinosteroids – occurrence and chemical structures in plants. *In: HAYAT S., AHMAD A. (Eds.) 2011. Brassinosteroids: A class of plant hormone. 1st edition, 462 p.*
- Bajguz, A., and S. Hayat, 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.*, 47: 1–8.
- Bolaños V., P. 2005. Propagación de *Zamiaskinneri* Warszewicz, una planta tropical ornamental en peligro de extinción. *Revista Agricultura Tropical* 35: 107-117.
- Brenner E. D., D. Stevenson W., y W. R Twigg 2003. Cycads: evolutionary innovations and the role of plant-derived neurotoxins *TRENDS in Plant Science* Vol.8 (9):446-452.
- Caballero M. J., J. Onofre, V. A. Wong, Castro G. R., Estrada S. P., Rodríguez S.J., Suárez R, Iturriaga G. y Martínez A. L. 2009. Uso de *Azospirillum* México como biofertilizante y potencial de nuevas especies bacterianas como biofertilizantes, agentes de biorremediación y biocontrol de fitopatógenos. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
- Cabrera, H. S.L. 2008. Morfogénesis *in vitro* de *Dioon merolae* De Luca, Sabato & Vázquez-Torres (Zamiaceae, cycadales) a partir de Megagametofitos y embriones cigóticos. *Interciencia* 33, 12: 929-934
- Chavez VM, and Litz R.E. 1999. Organogenesis from megagametophyte and zygotic embryo explants of the gymnosperm *Dioon edule* Lindley (Zamiaceae, Cycadales). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 58: 219-222.

- Chavez, V.M., E. Litz, R., y J. Marquez, 1995. Histology of somatic embryogenesis of the cycad, *Ceratozamia Mexicana* from leaves of a mature tree. *Plant Science* 108: 191-200.
- Christenhusz, M.J.M.; Reveal, J; Farjon A; Gardner M. F.; Mill, R R.; and Chase, M. W. 2011. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa* 19: 55-70.
- Cuéllar CH. L., M. E Morales R., Y J.F. Treviño N. 2006. La Germinación *in vitro* una alternativa para obtener explantes en cactáceas. Universidad Nacional Agraria La Molina. Zonas Áridas No. 10: 129-133
- Davies, P. J. (Ed.) 2004. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* 3rd ed. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 802 p.
- Dehgan B. 1983. Propagation And Growth Of Cycads: A conservation strategy *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 96: 137-139
- De Luca P. S. Sabato, and M. Vázquez-Torres. 1981. *Dioonmerolae* (Zamiaceae), a new species from Mexico *Brittonia* 33, Number 2: 179-185.
- Donaldson, J.S. (ed.). (2003). *Cycads. Status Survey and Conservation Action Plan.* IUCN/SSC Cycad Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 86 p.
- Figueroa J. A. y F. M. Jaksic, 2004. Latencia y banco de semillas en plantas de la región mediterránea de Chile Central. *Revista Chilena de Historia Natural* 77: 201-215.
- Fisher J. B. y P. A. Vovides, 2004. Mycorrhizae Are Present in Cycad Roots. *The Botanical Review* 70(1):16-23.
- Foster A. S., and Gifford E.M., 1974. *Comparative morphology of vascular plants.* Second edition, Freeman and company. San Francisco, CA, USA. pp. 406- 440
- González-Espinosa M., Pérez-Espinosa B.A. y Ramírez-Marcial N. 2012. Distribución espacial y respuesta fototrópica de *Dioon merolae* (Zamiaceae) en poblaciones relictuales del centro de Chiapas, México. *Botanical Sciences* 90 (1): 63-72
- Gutiérrez O. J. S. 2010. Cíadas: fósiles vivientes en nuestros paisajes actuales. En: *Nuestra Tierra* 14: 8-12
- Hartmann H. T., y KESTER D.E. 1980. *Propagación de plantas, principios y prácticas.* Editorial Continental, S. A. México

- Hategan L., Godza B., y Szekeres M. 2011. Regulation of brassinosteroid metabolism *In*: Hayat S., Ahmad A. (Eds.) 2011. Brassinosteroids: a class of plant hormone. 1st Edition, 462 p.
- Haynes J. L. 2012. World list of Cycads: A Historical Review. 38 p.
- Instituto Nacional de Ecología (INE) 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994. SEDESOL, México. 66 p.
- Johansen D. A. 1950. Plant embryology: Embriogeny of the spermatophyta. Waltman, MASS, USA. 13-17 pp.
- Jolivet P. 2005. Cycads and beetles. recent views on pollination. *The cycad newsletter* 28 (3-4):3-7
- Jordán M., y Casaretto J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. *In*: Fisiología vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile
- Kang Y.Y., and Guo S.R. 2011. Role of brassinosteroids on horticultural crops. *In*: Hayat S., Ahmad A. (Eds.) 2011. Brassinosteroids: a class of plant hormone. 1st Edition, 462 p.
- Lázaro-Zermeño, J.M., González-Espinosa M., Mendoza A., Martínez-Ramos M., y Quintana-Ascencio P.F. 2010. Individual growth, reproduction and population dynamics of *Dioon merolae* (Zamiaceae) under different leaf harvest histories in Central Chiapas, Mexico. *Forest Ecology and Management* 261:427-439.
- Lázaro-Zermeño J.M., González-Espinosa M., Mendoza A., y Martínez-Ramos M. 2012. Historia natural de *Dioon merolae* (Zamiaceae) en Chiapas, México. *Botanical Sciences* 90 (1): 73-87
- Lindstrom A.J. 2009. Typification of some species names in *Zamia* L. (Zamiaceae), with an assessment of the status of *Chigua* D. Stev. *Taxon* 58(1): 265-270.
- Litz R.E., P.A. Moon, V.M. y Chavez A. 2005. Somatic embryogenesis and regeneration of endangered Cycad species. II International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species
- Mok, D.W.S., and Mok, M.C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 89- 118
- Norstog, K. J. 1990. Studies of Cycad reproduction at Fairchild Tropical Garden. *Memories of the New York Botanical Garden* 57: 63-81
- Pérez F. M. A. y Vovides P. A. 1997. Manual para el Cultivo y Propagación de cícadas, CONABIO. 47 p.

- Pérez F. M. A, y Vovides P.A. 2006. The ceremonial use of the threatened espadaña cycad (*Dioon merolae*, *Zamiaceae*) by a community of the central depression of Chiapas, Mexico. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, núm. 78:107-113
- Pita V. J.M. y Pérez G. F. 1998. Germinación de semillas. Hojas divulgadoras num 2090. Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación. 20 p.
- Prado A. 2011. The cycad herbivores. Bulletin de la Société d'entomologie du Québec. *Antennae*, vol. 18, no 1:3-6
- Rivadeneira-Domínguez E, y Rodríguez-Landa JF. 2013. Las cícadas y su relación con algunas enfermedades neurodegenerativas. *Neurología*:1-6
- Ruiz R. P. 2010. Latencia: Cuando las Semillas Duermen. Revista M&M. Madera y Mueble No. 67:12-18
- Salgado G. R., Cortés R. M. A, y Del Rio R. E. 2008. Uso de brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura. *BIOLÓGICAS*, No. 10:18-27
- Schneider D., Wink M., Sporer F., and Lounibos P. 2002. Cycads: their evolution, toxins, herbivores and insect pollinators. *Naturwissenschaften* 89: 281-294
- Siniscalco G. G. 1990. Chemotaxonomic significance of MAM glycosides and mucilages in Cycads. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 57: 123-131
- Sporne K. R. 1982. Morfología de gimnospermas. Estructura y evolución de las plantas con semillas primitivas. 140 p.
- Stevenson, D. W. 1990. Morphology and systematics of the Cycadales. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 57: 8-55.
- Taiz L., y E. Zeiger. 2010. Plant physiology. Ed. Casebound, Quinta Edición. Pág. 782
- Venegas, E. 1997. Estudio morfogénico de *Zamia* (*Zamiaskinneri*). Tesis Lic. Ing. Agr, San Carlos, CR, ITCR. 41.
- Vovides A. P. 1983. Flora de Veracruz (*Zamiaceae*). Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos Xalapa, Veracruz, México. Fascículo 26. 31 p.
- Vovides A. P. 2000. México: segundo lugar mundial en diversidad de cícadas. *CONABIO. Biodiversitas* 31: 6-10
- Vovides A. P. 2008. Cycadales in México (*Dioon edule*). NDF Workshop Case Studies, Cycads and Succulents, CITES-CONABIO. Case study 3, 17 p.

- Yáñez E. L. 2004. Las principales familias de árboles en México. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. pp. 10-20
- Yáñez E. L. 2006. Las cycadas: Biología y conservación en México. División de ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo. 208 p.
- Willan R. L. 1991 Guía para la manipulación de semillas forestales. Centro de Semillas Forestales de DANIDA/FAO

CAPÍTULO I

GERMINACIÓN *in vivo* DE *Dioon merolae* DE LUCA, SABATO Y VÁZQUEZ-TORRES

**CAPÍTULO I. GERMINACIÓN *in vivo* DE *Dioon merolae* DE LUCA, SABATO Y
VÁZQUEZ-TORRES**

1. INTRODUCCIÓN

Las cícadas son el grupo de gimnospermas más antiguas que sobreviven en la actualidad, sin embargo, todas las especies representativas de este grupo se encuentran en algún estatus de riesgo, ya que sus poblaciones son cada vez más reducidas debido a diferentes factores. Las especies de cicadales tienen gran valor de importancia biológica, ecológica, económica y religiosa; aunque principalmente son cotizadas como plantas ornamentales. Una de las características principales de todas estas especies es que son de muy lento crecimiento y *Dioon merolae* no es la excepción.

Dioon merolae pertenece a la familia Zamiaceae, es una especie endémica de México. Comúnmente es conocida como Espadaña y tiene gran importancia dentro de las festividades religiosas de la Santa Cruz en el estado de Chiapas, México, sin embargo, se encuentra catalogada como en peligro de extinción dentro de la NOM 059.

Para algunas especies a las cuales les es difícil la propagación por semilla, una alternativa es la propagación vegetativa o asexual, de esta manera es más rápida y cuantiosa sin embargo tiene la desventaja de tener poca variación genética, un aspecto sumamente importante cuando el objetivo principal es la conservación de la especie.

De manera natural la tasa de germinación de las semillas de *Dioon merolae* es baja debido principalmente a la latencia que presenta, posee una esclerotesta muy dura y una sarcotesta que contiene sustancias inhibitorias por lo que es sumamente importante encontrar un método de escarificación eficaz que permita obtener alto porcentaje de germinación. Además hacer uso de las hormonas es básico, ya que al ser una especie de muy lento crecimiento, los efectos que se puedan promover tanto en germinación como en crecimiento son de gran valor.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en la unidad de cámaras de ambiente controlado en el Laboratorio de Fisiología de Estomas del Postgrado de Botánica; en el Laboratorio de Morfología de insectos del Postgrado de Fitosanidad y en invernadero del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, México.

2.1 Descripción del sitio de colecta de material biológico

La colecta se llevó a cabo en la localidad Andrés Quintana Roo, Municipio de Jiquipilas, Chiapas, México (figura 9), donde se encuentran poblaciones naturales de *Dioon merolae*. El sitio es conocido como “el lajerio” o “el bochito” (Figura 10) y se ubica entre las coordenadas 19° 37' 26.10” latitud norte y 93° 33' 48.01” longitud oeste a una altitud de 594 msnm. Crece principalmente en terrenos accidentados muy rocosos (Figura 11), y es difícil encontrar ejemplares en la zona de planicie.



Figura 9. Ubicación del municipio de Jiquipilas en el estado de Chiapas.
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mapa_jiquipilas.jpg



Figura 10. Vista general de la zona de distribución de *Dioon merolae* en el ejido Andrés Quintana Roo en el municipio de Jiquipilas, Chiapas, México



Figura 11. Ejemplar adulto de *D. merolae* con el tallo inclinado

El clima predominante es Aw_0 (García, 1988) y corresponde a cálido subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media anual de 24.2°C, máxima de 30.5°C, y mínima de 17.9 °C. La precipitación anual es de 975.4 mm con una evaporación total anual de 1706.3 mm (SMN-CNA, 2014).

2.2 Colecta de semillas

Se identificaron ejemplares hembras con conos maduros (Figura 12). La madurez se determinó con una pequeña prueba que consistió en jalar una esporofila, si esta salía fácilmente el cono se encontraba en estado de madurez y se podía colectar. Se cortó el cono de la planta madre con la ayuda de un machete y se colocaron en costales de rafia para su transporte.



Figura 12. Ejemplares femeninos de *Dioon merolae* con conos A) Cono inmaduro B) Cono maduro

2.3 Limpieza de las semillas

En el laboratorio los conos se abrieron para extraer las semillas, se obtuvieron 203 en total de dos conos (Figura 13A y 13 B). Se depositaron en una cubeta con agua y permanecieron en remojo durante tres días con el fin de ablandar la sarcotesta. Después se retiró la sarcotesta para

lo cual se utilizó una cuchara con la que se raspó hasta dejar la semilla con la esclerotesta limpia (Figura 13 C y 13D).



Figura 13. Proceso de extracción y limpieza de limpieza de semillas de *Dioon merolae* A) Cono maduro B) Semillas completas C) Retiro de la sarcotesta D) Semillas sin sarcotesta

2.4 Pruebas de viabilidad

Para determinar la viabilidad de las semillas se colocaron dentro de una cubeta con agua durante un minuto, las que se flotaron fueron semillas no viables por lo regular de tamaño pequeño y deformes, por lo que se desecharon. Las que se hundieron eran normales y viables.

Se obtuvieron 165 semillas viables que se secaron a media sombra, posteriormente se guardaron en un recipiente plástico con tapa a una temperatura de 10 °C.

2.5 Inducción de germinación *in vivo* Etapa I

La primera etapa consistió en inducir la germinación de semillas. Se establecieron nueve tratamientos utilizando la hormona brasinoesteroide CIDEF-4, el hongo micorrízico (*Glomus intraradices* Schenk y Smith) y la bacteria *Azospirillum* como se indica en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos a utilizar en la Etapa I de germinación.

Tratamiento	Abreviatura	Descripción
1	T1	Testigo (sin micorriza sin brasinoesteroide, sin <i>Azospirillum</i>)
2	T2	Sin micorriza y con brasinoesteroide en la primera aplicación (a la semilla), sin <i>Azospirillum</i>
3	T3	Sin micorriza y con brasinoesteroide en la segunda aplicación (a los 60 días después de la siembra), sin <i>Azospirillum</i>
4	T4	Sin micorriza y con brasinoesteroide en la primera y segunda aplicación, sin <i>Azospirillum</i>
5	T5	Con micorriza y con brasinoesteroide en la primera aplicación (a la semilla), sin <i>Azospirillum</i>
6	T6	Con micorriza y brasinoesteroide en la segunda aplicación (a los 60 días después de la siembra), sin <i>Azospirillum</i>
7	T7	Con micorriza y con brasinoesteroide en la primera y segunda aplicación, sin <i>Azospirillum</i>
8	T8	Con micorriza y sin brasinoesteroide, sin <i>Azospirillum</i>
9	T9	Con <i>Azospirillum</i> (Sin remojo, sin escarificar)

2.5.1 Escarificación de la semilla

Se realizaron las técnicas de escarificación:

a) Lijado de las semillas

Se utilizaron 126 semillas libres de sarcotesta de las cuales 112 se lijaron por la zona del hilo por 3 minutos con un papel lija y las 14 restantes se dejaron sin lijar.

b) Remojo

Las semillas lijadas se mantuvieron en remojo por 72 horas; la mitad (56 semillas) se remojaron en una solución de la fitohormona brasinoesteroide CIDEF-4 (100 mg L⁻¹) con agua destilada y la otra mitad sólo en agua destilada.

2.5.2 Preparación del sustrato y contenedores

El sustrato consistió en una mezcla de tezontle fino (2 mm de diámetro aproximadamente), tierra negra, y tierra del sitio de distribución natural de la especie (Ejido Andrés Quintana Roo) en proporción 2:2:1. Se revolvió perfectamente sobre un plástico grande y con la ayuda de una pala (Figura 14 A).

Se utilizaron bolsas negras tipo forestal de 9X25 cm (Figura 14 A) y charolas de plástico color negro (Figura 14B). Se llenaron 126 bolsas con el sustrato y se regaron perfectamente hasta humedecerlo a capacidad de campo.



Figura 14. Germinación de *Dioon merolae*. A) Sustrato B) Bolsa tipo forestal C) Charola plástica

2.5.3 Siembra de la semilla de *Dioon merolae*

Al momento de la siembra se aplicaron 10 g de la micorriza (*Glomus intraradices* Schenk y Smith) a 56 bolsas con sustrato ó 10 g de la bacteria *Azospirillum* otras 14. A las 56 restantes no se les aplico micorriza ni bacteria.

Las semillas se sembraron 2/3 sumergidas en el sustrato, una semilla por bolsa, respetando los tratamientos indicados y se regaron con agua corriente. Para el etiquetado se utilizaron clip's y pink's de colores y papel aluminio.

Finalmente las bolsas se colocaron encámara de crecimiento a 28° C con fotoperiodo de 16/8 y luz blanca fluorescente. Se acomodaron dentro de las charolas de plástico, sin espacio entre cada bolsa (Figura 15). Se colocaron 14 charolas, siete de las cuales contenían ocho bolsas cada una con el fertilizante micorrízico y siete con 10 bolsas que no contenían el fertilizante micorrízico (Ver diseño en 2.5.4)



Figura 15. Arreglo del experimento dentro de la cámara de crecimiento

El riego se aplicó diariamente con agua corriente y se realizaron las observaciones para cada ejemplar para observar si se inició la germinación o algún tipo de contaminación. A los 60 días después de la siembra se realizó la segunda aplicación de la fitohormona en una dosis de 100 mg L^{-1} disuelta en agua destilada, aplicándose en forma de riego cuidando que cada ejemplar recibiera la misma cantidad de agua, utilizando un recipiente graduado. El experimento se mantuvo 87 días en cámara de crecimiento posteriormente fue trasladado a un invernadero donde se continuaron las observaciones.

2.5.4 Diseño experimental del Experimento de la Etapa I

Para la distribución del experimento dentro de la cámara de crecimiento se consideró como un diseño experimental completamente al azar con 14 repeticiones en parcelas divididas, con un arreglo factorial de tratamientos de $2 \times 2 \times 2 + 1$. Para el análisis de la varianza se utilizó el paquete estadístico InfoStat (InfoStat, 2014)

Cuadro 2. Factores a evaluar en la etapa I de germinación

Factor 1	Nombre	Factor 2	Nombre	Tratamiento
Aplicación de micorriza.	A	Fitohormona Brasinoesteroide (Primera Aplicación)	NO(1)	A1
			SI (2)	A2
Sin micorriza	B	Fitohormona Brasinoesteroide (Segunda Aplicación)	NO (1)	B1
			SI (2)	B2

Cuadro 3. Asignación de colores de los tratamientos con la hormona brasinoesteroide CIDEF- 4 y la micorriza

Trat.	Color		Aplicación de Brasoniesteroide	
1	Rojo		Sin aplicación	A1B1
2	verde		Con primera aplicación	A2B1
3	Azul		Con segunda aplicación	A1B2
4	Negro		Con dos aplicaciones	A2B2
5	Amarillo		Con azospirilum	Adicional
Tratamientos Con micorriza				
Tratamientos Sin micorriza				

A continuación se muestra la distribución de las charolas (Figura 16) con los tratamientos dentro de la cámara de crecimiento. Los cuadros sombreados en gris muestran los tratamientos con micorriza y no sombreados sin micorriza

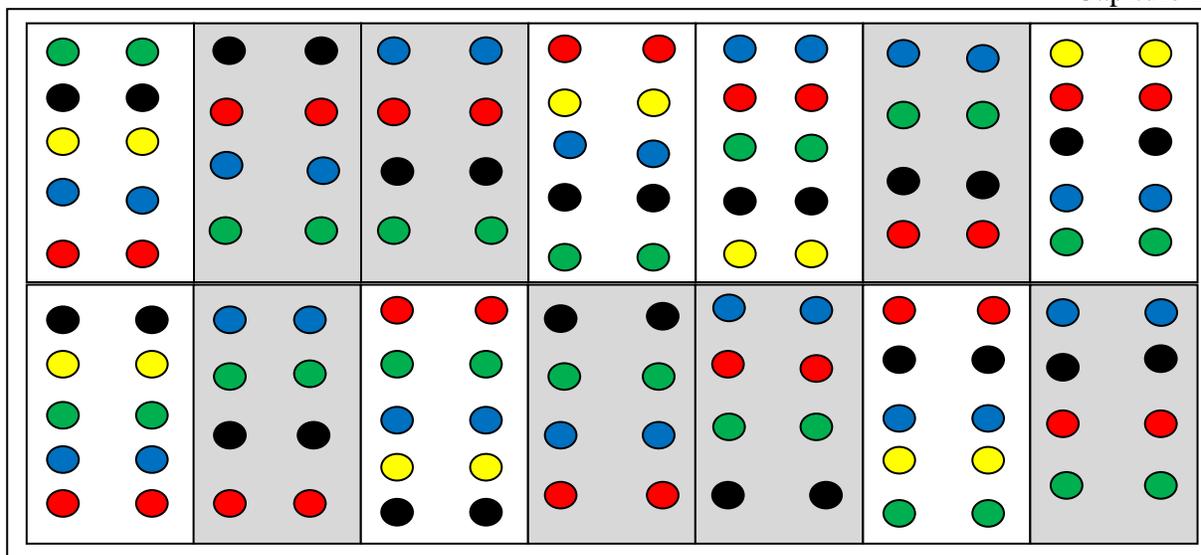


Figura 16. Distribución de las charolas conteniendo las bolsas dentro de la cámara de crecimiento

2.6 Inducción de germinación *in vivo* Etapa II

La segunda etapa consistió en la inducción de la germinación aplicando técnicas de escarificación diferentes a la etapa I, y con la aplicación de la hormona brasinoesteroide CIDEF-4. Se establecieron cinco tratamientos (Cuadro 5).

Cuadro 4. Descripción de los tratamientos de la Etapa II.

Tratamiento	Abreviatura	Descripción
1	Sf/48 hrs H ₂ O (T1)	Semilla fracturada con remojo de 48 horas en agua destilada
2	Sf/24 hrs H ₂ O+CIDEF-4 (T2)	Semilla fracturada remojadas en brasinoesteroide 24 horas
3	Sf/24 hrs H ₂ O (T3)	Semilla fracturada con remojo 24 horas sin brasinoesteroide
4	Sc H ₂ O ₂ /24 hrs H ₂ O (T4)	Semilla cerrada con peróxido y remojo 24 horas en brasinoesteroide
5	Sc H ₂ O ₂ /24 hrs H ₂ O+CIDEF-4 (T5)	Semilla cerrada con peróxido y remojo en agua destilada 24 hrs.

2.6.1 Escarificación

Para inducir la germinación se utilizaron semillas libres de sarcotesta las cuales fueron escarificadas por tres técnicas: mecánica, química y física

a) Mecánica

Consistió en fracturar la esclerotesta de la semilla utilizando un tornillo de banco (Figura 17), aplicando la fuerza necesaria para romperla pero sin dañar el gametofito donde se encontraba el embrión, por esta técnica se escarificaron 24 semillas.

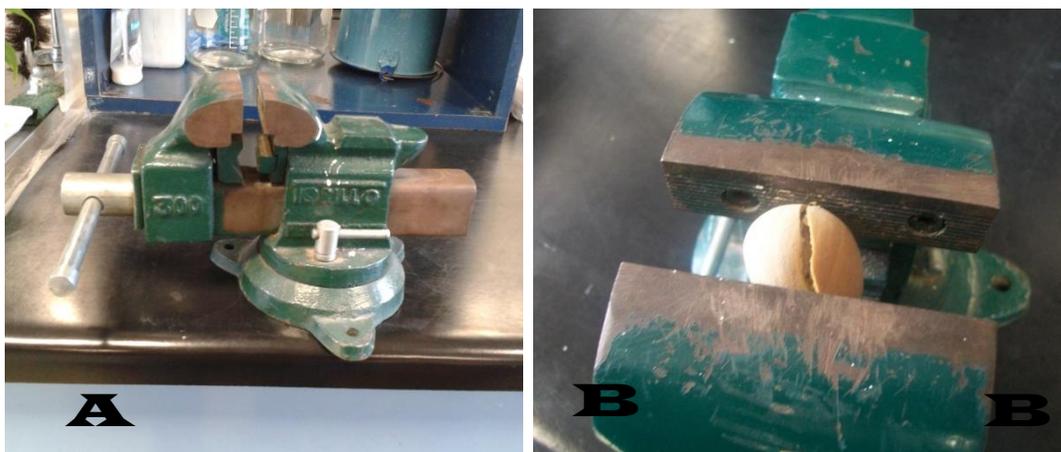


Figura 17. Uso del tornillo de banco para fracturar la esclerotesta de la semilla de *Dioon merolae* A) Tornillo de banco B) Semilla fracturada en el tornillo de banco

b) Química

Consistió en sumergir las semillas sin romper en un frasco que contenía una solución con peróxido de hidrógeno al 3 % durante 24 horas en agitación para lo cual se utilizó un agitador orbital, para esta técnica se escarificaron 16 semillas.

c) Física

Consistió en el remojo de la semilla por 24 o 48 horas en agua. Esta técnica se aplicó después de la escarificación mecánica o química. El remojo por 48 horas en agua destilada se aplicó

sólo a ocho semillas fracturadas mientras el remojo por 24 horas en agua destilada se aplicó a ocho semillas fracturadas y ocho sin romper en tanto que las 16 restantes (ocho semillas fracturadas y ocho sin romper) se remojaron en una solución de agua con la fitohormona CIDEF-4 100 mgL^{-1} durante 24 horas.

2.6.2 Preparación del sustrato y contenedores

En la etapa II, el sustrato utilizado fue tezontle fino o arenilla roja, macetas de plástico de 7.5X7.5X11 cm en color negro (Figura 18) y charolas plásticas sin división. Las macetas se llenaron completamente con el sustrato y se regaron con abundante agua.



Figura 18. Macetas negras de 7.5X7.5X11 cm

2.6.3 Siembra

Las semillas se sembraron 2/3 sumergidas en el sustrato, una semilla por maceta (figura 19 A). Las macetas se etiquetaron según su tratamiento con clip's, y papel aluminio. Después fueron colocadas en las charolas de plástico que se acomodaron dentro la cámara de crecimiento (Figura 19 B).

Las condiciones de la cámara fueron: Temperatura 35°C , fotoperiodo 16 h luz y 8 h oscuridad, con luz blanca fluorescente. El riego se aplicó diariamente con agua corriente y se realizaban

las observaciones para cada ejemplar para observar el inicio la germinación o algún tipo de contaminación.



Figura 19. Siembra de *Dioon merolae* A) Siembra de semilla 2/3 sumergido en el sustrato. B) Colocación de las macetas en la cámara de crecimiento

2.6.4 Diseño experimental Etapa II

Se probaron cinco tratamientos en un diseño completamente al azar. Se establecieron ocho repeticiones para cada tratamiento y la unidad experimental fue una semilla. Para el análisis de la varianza se utilizó el paquete estadístico InfoStat (InfoStat, 2014) por medio de tablas de contingencia para el análisis de poblaciones homogéneas debido a que los resultados fueron similares. Además se realizó la prueba X^2 con valor de p simulado basado en unas 10000 unidades.

Diariamente se contabilizó el número de semillas contaminadas por bacterias por tratamiento (%), número de semillas contaminadas por hongos (%), inicio de germinación por tratamiento (días) y número de semillas germinadas por tratamiento (%).

2.7 Efecto de la hormona brasinoesteroide CIDEF-4 en la germinación de *Dioon merolae* Etapa III

Para determinar el efecto de la hormona brasinoesteroide en la germinación de *Dioon merolae* se estableció un experimento con dos tratamientos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Descripción de los tratamientos de la etapa III

Tratamiento	Abreviatura	Descripción
1	T1	Semilla abierta con remojo de 48 horas en agua destilada
2	T2	Semilla abierta remojadas 48 horas en brasinoesteroide (CIDEF-4)

2.7.1 Escarificación

La semilla, libre de la sarcotesta, se colocó en un tornillo de banco donde se aplicó un poco de presión hasta fracturar la esclerotesta. Para este experimento se utilizaron 20 semillas, después de fracturarlas se mantuvieron en remojo durante 48 horas, 10 de ellas se remojaron en agua destilada y las 10 restantes en una solución con la fitohormona brasinoesteroide CIDEF- 4 (100 mg L^{-1}).

2.7.2 Sustrato y contenedores

Como sustrato se utilizó tezontle muy fino también conocido como arenilla roja, se llenaron macetas de 7.5X7.5X11 cm de color negro.

2.7.3 Siembra y sus condiciones dentro de la cámara de crecimiento

La semilla se sembró 2/3 sumergida en el sustrato en posición horizontal, una semilla por maceta, estas últimas fueron colocadas en charolas de plástico negro, diez por cada charola, se colocaron dentro de una cámara de crecimiento y se regó con abundante agua. Al día siguiente, se aplicó un riego con fungicida captán (4 mg/L) para prevenir contaminación por hongos. Los siguientes riegos se aplicaron diariamente con agua corriente. Las condiciones dentro de la cámara de crecimiento fueron de una temperatura de $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16h/8 h y luz blanca fluorescente.

2.7.4 Diseño experimental

Se evaluaron dos tratamientos con una distribución completamente al azar. Se establecieron 10 repeticiones para cada tratamiento y la unidad experimental fue de una semilla. Para el

análisis de la varianza se utilizó el paquete estadístico InfoStat (InfoStat, 2014) por medio de tablas de contingencia para el análisis de poblaciones homogéneas debido a que los resultados fueron similares. Además se realizó la prueba X^2 con valor de p simulado basado en unas 10000 unidades.

Se contabilizó número de semillas contaminadas por bacterias por tratamiento (%), número de semillas contaminadas por hongos (%), inicio de germinación por tratamiento (días), y número de semillas germinadas por tratamiento (%).

2.8 Fabricación de rizotrones caseros

Con la finalidad de observar el crecimiento de la raíz de la especie sin afectar a la plántula se optó por fabricar rizotrones caseros. La metodología se adaptó de la utilizada por Aguilar (2007) utilizando semillas germinadas de un mes de edad, del experimento de inducción de germinación *in vivo*.

- Envases de plástico PET
- Navajas
- Tijeras
- Clavos
- Clips
- Bolsa de polietileno color negra
- Tela tipo “Tergal” liso en color blanco

Los envases se cortaron en la parte del cuello con una navaja y tijeras, después se perforaron en la base con un clavo caliente, haciendo cinco agujeros. Con la tela tipo “tergal” se fabricaron bolsas dobles cociendo los extremos y la base. Las bolsas de tela se colocaron al interior de los envases de plásticos y posteriormente se llenaron con tezontle fino humedecido (Figura 20 A).

Una vez puesto el sustrato se colocaron las plántulas entre la pared del recipiente y la bolsa de tela, para que el sustrato no hiciera contacto directo con la raíz de la plántula (Figura 20 B y

20 C). Una vez terminado el trasplante cada rizotrón se introdujo en la bolsa de polietileno. Se sujetaron con clip's (Figura 20 D) y se regaron con abundante agua.

Se colocaron en los rizotrones nueve semillas germinadas que se sacaron de las macetas hasta el momento del trasplante, se midieron con la finalidad de llevar el control del crecimiento de la raíz, y se colocaron una por cada rizotrón. Las semillas provenían del experimento dos de inducción de germinación *in vivo*. Se regaron diariamente con agua corriente procurando que el riego llegara lentamente a la semilla para que pudiera absorber los nutrientes del sustrato. Se evaluaron cada 20 días registrando la medida de la raíz de cada plántula. En el siguiente Cuadro se presenta el tratamiento recibido por cada semilla y longitud de la raíz correspondiente al momento del trasplante.

Cuadro 6. Longitud de la raíz de los ejemplares antes del trasplante a rizotrones

Tratamiento	Descripción	Longitud de raíz (cm)
T1	Semilla abierta con remojo	1
	en agua por 5 días	6
		4.5
T2	Semilla abierta con remojo	1.5
	en brasinoesteroide por 24 horas	2
T3	Semilla abierta con remojo	5.5
	en agua sin	3.0
	brasinoesteroide por 24 horas	3.5
		1.5



Figura 20. Fabricación de rizotrones caseros A) Contenedor con sustrato, B) Semilla germinada, C) Siembra de semilla entre el contenedor y el sustrato, D) Vista final del rizotrone

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

La inducción de la germinación *in vivo* se consiguió después de varias pruebas ya que al inicio no se encontraron los resultados esperados, sin embargo, al final se lograron obtener plántulas que demuestran que se puede lograr la germinación de *Dioon merolae* fuera de su hábitat. Para el análisis de resultados se registraron únicamente el porcentaje de germinación e inicio

de la germinación en días, la contaminación y la supervivencia. No fue posible medir el crecimiento de la raíz porque estuvo oculta.

3.1 Inducción de germinación *in vivo* Etapa I

En este primer experimento no se obtuvieron resultados positivos ya que no se presentó la germinación en ninguno de los nueve tratamientos evaluados (Figura 21). En el cual se atribuyen los resultados a que la escarificación no fue la adecuada.

Pérez y Vovides (1997) mencionan que la germinación de *Dioon merolae* se presenta 30 días después de la siembra de la semilla removiendo únicamente la sarcotesta, sin embargo, en este caso no se presentó la germinación aún cuando se realizó lijado y remojo de la semilla. Algunos pobladores del ejido Andrés Quintana Roo mencionan que en algunas ocasiones han sembrado semillas de *D. merolae* para ello retiran la sarcotesta, y se remojan en agua hasta por ocho días y aun así obtiene de un 20 % a un 30 % que se considera una tasa muy baja. Santos (2013, Comunicación personal). Esto concuerda con lo reportado por Witte (1977) quien obtuvo un 30 % de germinación en semillas sin escarificar de la cícada de *Zamia floridana*.



Figura 21. Experimento No. 1 sin germinación

Para algunas especies el remojo en agua es suficiente para que se promueva la germinación, y puede mejorar si se combina con una escarificación mecánica como se reporta en café (Coa *et*

al, 2014), o en diferentes pastos o forrajes (Reino *et al*, 2011). La escarificación química también ha sido ampliamente utilizada en muchas especies utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorhídrico (HCl) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Frett(1987) recomienda el ácido sulfúrico en semillas de *Cycas revoluta* durante 60 a 90 min. para aumentar la germinación en tanto que Dehgan y Johnson (1983)mencionan que la germinación de semillas de *Zamia floridana* fue acelerada hasta en 90 % por la rápida eliminación mecánica la sarcotesta, la inmersión en H_2SO_4 durante 60 min seguido de enjuague con agua, y sumergiéndolas en 1000 mg L⁻¹ de ácido giberélico GA₃ durante 48 horas. Sin embargo, cuando se trata de semillas de testa muy gruesa, los porcentajes más altos de germinación se consiguen con una escarificación mecánica más que con una química (Godínez- Álvarez y Flores-Martínez, 1999). Este último tipo de escarificación es más recomendable para semillas con latencia endógena, por lo que para semillas con latencia exógena y endógena no sólo promoverá altos porcentajes de germinación sino que puede acelerarla (Yanget *al*, 2007).

Para *Dioon merolae* el remojo y escarificación mecánica por lijado de la semilla no fue suficiente para la promover la germinación por lo que fue necesario probar otras formas de escarificación.

3.2 Resultados Inducción de germinación *in vivo* Etapa II

En la segunda etapa de la inducción de la germinación donde se probaron dos tipos de escarificación, se logró obtener la germinación en tres de los cinco tratamientos (Figura 22) que se propusieron, con porcentajes mayores de 50 %.



Figura 22. Emergencia de la radícula en tres tratamientos diferentes A) Semilla fracturada remojada en agua destilada 48 horas (T1); B) semilla fracturada remojada 24 horas con CIDEF-4 (T2) y C) semilla fracturada remojada 24 horas en agua destilada (T3).

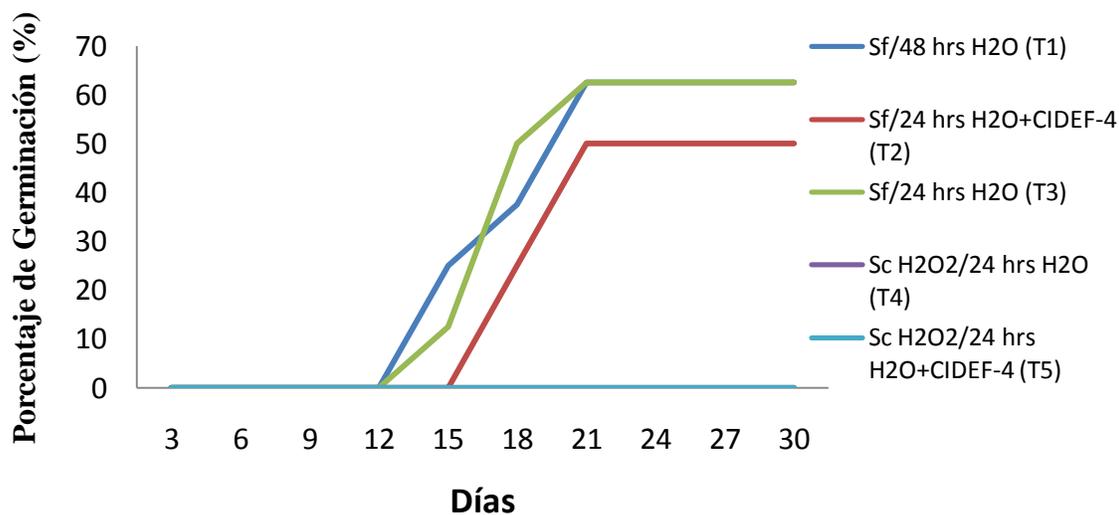


Figura 23. Porcentaje de germinación de *Dioon merolae* en la etapa II

El inicio de la germinación que fue vista a partir del día 15 en dos tratamientos y se detuvo hasta el día 21. En los tratamientos en los que las semillas no se rompieron y solamente se ataron con peróxido de hidrógeno (T4 y T5), no hubo germinación. En los tratamientos donde la semilla se fracturó y remojó en agua destilada sin hormona en dos diferentes tiempos de exposición (T1 y T3) se obtuvo el mayor porcentaje de germinación con 62.5%. Se observó que el porcentaje de germinación es ligeramente menor si se usa la hormona brasinoesteroide CIDEF-4 que sólo agua destilada.

El análisis estadístico de los resultados reveló diferencias significativas entre los cinco tratamientos ($p=0.005$), pero al comparar los tres tratamientos donde hubo germinación ningún tratamiento fue estadísticamente diferente ($p=0.84$) Es decir si hubo diferencias entre triturar la semilla y no fracturarla pero no hubo diferencias entre el uso de la hormona CIDEF-4 en el porcentaje de germinación de *Dioon merolae*.

La respuesta obtenida se asemeja a lo reportado por Witte (1977) en *Zamia floridana* donde se incrementó la germinación del 38 % a 77 % con una escarificación mecánica de la semilla que consistió en aplicar presión sobre los lados de la semilla con unas pinzas, al mismo tiempo, la inserción de la punta de un cuchillo debajo de la punta distal terminal de la semilla. Además se menciona que la germinación de semillas sin escarificar después de seis semana apenas alcanzó 5 %.

Ramón *et al* (2002) también compararon la germinación con escarificación mecánica y peróxido de hidrogeno en palma Camedor (*Chamaedorea elegans* Mart.), y obtuvieron resultados similares de hasta 80 % de germinación con la remoción de una parte de la testa de la semilla.

Los datos obtenidos en este segundo intento demostraron que la escarificación mecánica que consistió en la fisura de la esclerotesta, independientemente del uso de la fitohormona CIDEF-4, fue la mejor opción para lograr la germinación.

El proceso de germinación está constituido por varias fases que inician con la absorción de agua por la semilla o imbibición; seguido por activación del metabolismo y proceso de respiración, síntesis de proteínas y movilización de sustancias de reserva; finalmente la elongación del embrión y ruptura de la testa producen la emergencia de la radícula (Chong *et al.* 2002). Comúnmente la radícula crece hacia abajo y desarrolla el sistema de raíz primario. La plúmula crece hacia arriba y forma el tallo. Durante este crecimiento la pequeña plántula deriva su sustento de los cotiledones y/o el endospermo (Chong *et al.* 2002).

Muchas semillas germinan poco después de ser expuestas o plantados en un suelo húmedo y cálido (Chong *et al.* 2002). Sin embargo, las semillas de muchas especies son incapaces de germinar, aun cuando presentan condiciones favorables para ello, lo cual se debe a que las semillas se encuentran en estado de latencia (Doria, 2010).

Dioon merolae presenta doble latencia exógena (de la cubierta seminal) una química y otra física. La latencia química se debe a los inhibidores que se encuentran en la sarcotesta, esta latencia es eliminada al retirar esta capa de la semilla. La latencia física se debe al grosor y dureza de la esclerotesta que evita la permeabilidad.

Cuando la latencia se debe a condiciones de la cubierta seminal, el letargo termina en el momento en que esta se agrieta o debilita por acciones mecánicas o químicas o por efecto del ambiente o acción química (Madueño *et al.*, 2006). Para obtener la germinación en esta especie es necesario eliminar esta latencia con un método adecuado de escarificación.

La absorción de agua es el primer paso para la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria (Doria, 2010). Por ello al romperse la esclerotesta se inició la germinación, y 15 días después de la siembra se observó la emergencia de la radícula obteniendo una tasa de germinación de 60 % en tan sólo 22 días.

Existen pocos trabajos sobre los métodos de escarificación en cícadas, siendo los más estudiados el uso de H_2SO_4 y GA_3 (Frett, 1987; Dehgan y Johnson 1983; Dehgan, y Schutzman, 1989). Aunque este último parecen responder favorablemente en algunas especies, Pérez y Vovides (1997) mencionan que el GA_3 parece inducir un efecto negativo sobre *Dioon merolae*. Por lo que fue importante usar un método diferente en este caso el peróxido de hidrogeno y la escarificación mecánica.

Aunque el uso de peróxido de hidrogeno H_2O_2 se ha utilizado para promover y aumentar el porcentaje de germinación en muchas especies por su acción oxidante, para *Dioon merolae*

inmersión en H₂O₂ al 3 % por 24 horas no fue favorable. El H₂O₂ aumenta el nivel de oxígeno en el ambiente y estimula la respiración y demás procesos metabólicos (CATIE-PROSEFOR, 1999), pero no fue capaz de traspasar la capa pétreo de la semilla por lo que no se tuvo éxito.

De acuerdo con los resultados obtenidos, *D. merolae* no presenta problemas latencia endógena o del embrión, por lo que al eliminar la latencia exógena (de la cubierta seminal) la germinación alcanza tasas elevadas comparadas con las que se dan de manera natural.

La escarificación mecánica puede ser muy efectiva, no obstante, puede exponerse el embrión a patógenos, lo cual se puede prevenir con aplicaciones de fungicidas o bactericidas. En muchas ocasiones este procedimiento también puede no ser muy apropiado cuando se trata de grandes cantidades de semilla, sin embargo para esta especie es muy adecuada ya que por su tamaño suficientemente grande facilita la manipulación.

3.3 Efecto de la hormona brasinoesteroide CIDEF-4 en la germinación de *Dioon merolae*

En la última etapase evaluó el uso de la hormona brasinoesteroide CIDEF-4 para la germinación de la cual se encontraron los siguientes resultados. La germinación inició a partir del día 9 en ambos tratamientos, siendo el tratamiento T1, en el cual no se utilizó la hormona brasinoesteroide CIDEF-4, el que tuvo un porcentaje ligeramente mayor de germinación. El porcentaje de germinación fue bastante alto para ambos tratamientos y muy similares entre sí (Figuras 24 y 25)

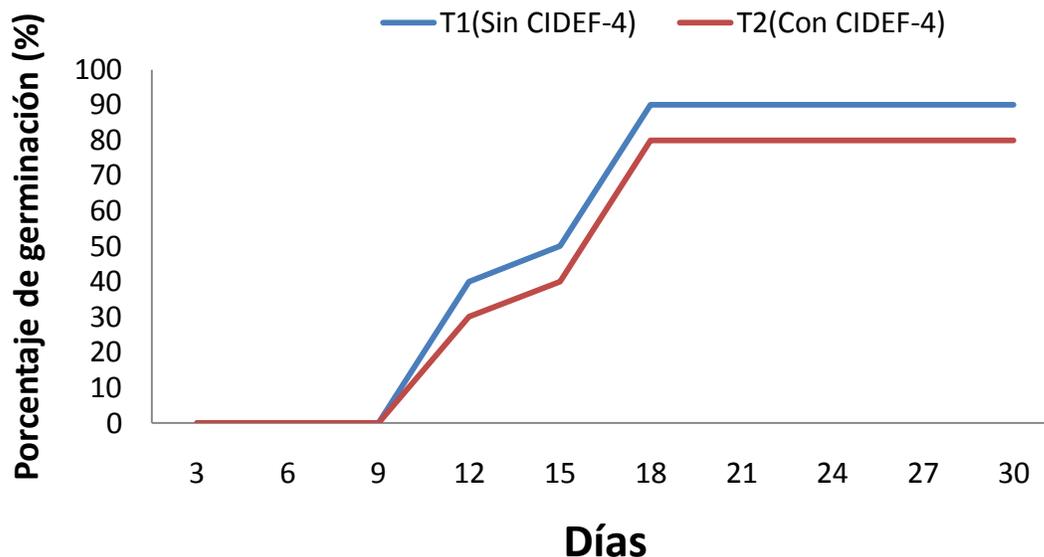


Figura 24. Efecto de la hormona brasinoesteroide CIDEF-4 en la germinación de *Dioon merolae*

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0.53$) por lo que se concluye que la hormona brasinoesteroide CIDEF-4 no produjo ningún efecto en la germinación al ser similar que el tratamiento testigo.

Si se compara el tiempo de emergencia de este experimento con el de la etapa II, en este último inició seis días antes que en el experimento II. Por lo tanto es posible concluir que el tiempo de remojo de 48 horas es más favorable que solo 24 horas ya que promovió promueve la emergencia.



Figura 25. Emergencia de la radícula de *Dioon merolae* en dos tratamientos diferentes.

Los brasinoesteroides se producen a bajas concentraciones en todo el reino vegetal y juegan un papel esencial en el desarrollo de la planta (Bajguz, 2011). Con el progreso de la tecnología, los brasinoesteroides (BRs) se han modificado estructuralmente con una mayor estabilidad en condiciones de campo y han sido sintetizados en una escala comercial y registrada como reguladores del crecimiento vegetal para cultivos hortícolas específicos. En tanto, la aplicación fundamental y orientada a la investigación, los brasinoesteroides y sus análogos desempeñan papeles destacados en varios procesos fisiológicos, incluyendo, desarrollo de la semilla y la germinación, floración, expresión del sexo, desarrollo de los frutos, la mejora de la cantidad y rendimiento de los cultivos, y la resistencia a diversos condiciones de estrés bióticos y abióticos (Kang y Guo, 2011).

Con este experimento se probó la hormona brasinoesteroide para determinar su efecto sobre la germinación. Los resultados arrojaron que la hormona CIDEF-4 no produce ningún efecto sobre la germinación de *Dioon merolae* en concentraciones de 100 mg L^{-1}

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Uribe y Dzid (2006) quienes compararon el efecto de la aplicación de fitohormona brasinoesteroide, con fertilizantes químicos convencionales en una variedad de maíz en cuatro años diferentes, sin embargo, no encontraron diferencias significativas y se obtuvieron resultados similares con el testigo absoluto que no tuvo fertilización química.

Caso contrario ocurrió en semilla de pasto guinea (*Panicum maximum*) cv. Tanzania donde Joaquín *et al.* (2007) evaluaron la fitohormona esteroidea (CIDEF-4) en el rendimiento y calidad de la semilla, en 2 etapas de aplicación (antes de la emergencia de la semilla y, al inicio de la antesis) en cuatro concentraciones 0, 2, 4 y 6 mg / kg de ingrediente activo para CIDEF-4. En este caso CIDEF-4 aumentó en gran medida el rendimiento de semillas.

La hormona esteroidea CIDEF-4 también ha sido probado en maíz por Torres *et al* (2007) al determinar la respuesta de híbridos androestériles y fértiles de maíz ante la aplicación de este brasinoesteroide. Ellos evaluaron, dos dosis (30 y 60 g ha⁻¹) de fitohormona con su respectivo testigo en 10 genotipos, bajo un diseño de bloques completos al azar. Obteniendo que para la variable rendimiento no hubo diferencia significativa al aplicar CIDEF-4 en los genotipos, en el análisis general donde se engloban los 10 genotipos, sin considerar el tipo de cruza. Mientras que al efectuar un análisis separando tipos de cruza, se observó que al aplicar CIDEF-4 en híbridos trilineales fértiles, se tuvieron diferencias altamente significativas, donde la dosis de 30 g ha⁻¹ rindió 8.083 t ha⁻¹, respecto al testigo cuyo valor fue 3.858 t ha⁻¹. En cambio en los híbridos trilineales androestériles no se presentaron diferencias significativas para las variables evaluadas. Sin embargo, en los híbridos de cruce simple en versión fértil y androestéril la hormona adelantó la floración masculina y femenina.

Cada especie responde diferente a ciertas condiciones que se le presente por lo que la aplicación de una fitohormona no siempre tendrá los mismos resultados en todas las especies, incluso en la misma especie en variedades diferentes. Además dependen de las condiciones ambientales presentes en el momento en que son analizadas y otros factores que pueden influir en las respuestas de cada organismo.

Esto se ejemplifica con los estudios realizados por Reyes *et al.* (2010) quienes estudiaron el efecto del análogo esteroideo de brasinoesteroide (Biobras-16, BB-16) en la germinación y el crecimiento inicial de plántulas de tomate de las variedades Amalia e INCA 9 (1) en condiciones de estrés salino; ellos encontraron que el BB-16 provocó un aumento significativo en la velocidad de germinación de las semillas de la variedad INCA 9 (1) en condiciones salinas, especialmente en la concentración de 10⁻⁷ mol L⁻¹, la cual fue capaz de igualarse al

control sin cloruro de sodio (NaCl). Mientras que en la variedad Amalia no se observó ningún efecto del análogo en las variables estudiadas. Reafirmando que aun en una misma especie en diferentes variedades los efectos de la hormona pueden ser diferentes.

Si bien la hormona brasinoesteroide CIDEF-4 no mostro algún tipo de efecto sobre *Dioon merolae* faltan hacer más pruebas con otras dosis ya que debido a la falta de material biológico (semilla) no se pudieron probar otras concentraciones de la fitohormona. Como es reportado en la literatura concentraciones pequeñas promueven la germinación, mientras que concentraciones mayores pueden producir un efecto inhibitorio como lo menciona Reyes *et al.* (2010) en su investigación, la concentración mayor estudiada le produjo retraso en la velocidad de germinación en dos variedades de tomate.

Además es preciso mencionar la importancia de evaluar la aplicación de la fitohormona en la etapa de crecimiento pues si bien no se producen efectos en la germinación puede haberlos en una segunda o más aplicaciones de la hormona cuando se empieza a desarrollar la plántula. Tal y como lo recomiendan Utria-Borges *et al.*(2004) al demostrar la necesidad de una segunda aplicación de brasinoesteroide en estadio temprano del crecimiento de las plántulas de *Coffea arabica* L. Puesto que los brasinoesteroides además de promover la germinación también se ha demostrado que tienen un efecto estimulador sobre el crecimiento de las raíces, hojas y vástagos en especies como la caña de azúcar (Ortega-Rodés *et al.* 2003) y un híbrido de *Vriesea*, una bromelia ornamental (Capote *et al.* 2007).

Continuar con estudios que promuevan la germinación y el crecimiento de *Dioon merolae* son de suma importancia por el estatus en la que se encuentra la especie, a la vez que se ofrecen más herramientas para los pobladores locales interesados en reproducir la especie y aprovechar al máximo las semillas ya que con los porcentajes tan bajos se desperdicia gran cantidad de material valioso. A su vez que se pueden probar en otras especies de cícadas puesto que existen muy pocos estudios para este grupo de plantas.

3.4 Crecimiento de raíz en rizotrones caseros

Las semillas que se trasplantaron a los rizotrones tuvieron un crecimiento progresivo; sin embargo, se tuvo alto porcentaje de mortalidad ya que murieron cuatro ejemplares de nueve sembrados, equivalentes a un 44 % del total. Aunque la pérdida de material es importante se logró el objetivo de registrar el crecimiento de la raíz y observar el desarrollo del vástago. En el Cuadro 7 continuación se presenta las medidas registradas en un lapso de 100 días, después de este tiempo se trasplantaron a bolsas negras de polietilenos con tezontle fino debido a que necesitan estar en contacto directo con el sustrato y con esto evitar la pérdida de más material vegetal.

Cuadro 7. Crecimiento de la raíz de semillas trasplantadas a rizotrones

Tratamiento	Longitud de raíz (cm)					
	Transplante	20 días	40 días	60 días	80 días	100 días
T1	1 cm	4	M*	M*	M*	M*
	6 cm	8	12	19	21	23
	4.5 cm	6	7	13	16	18
	1.5 cm	M*	M*	M*	M*	M*
T2	2 cm	2.5	6	8	11	12
	5.5	8	11	M*	M*	M*
T3	3.0	7	10.5	14	18	24
	3.5	6	11	12	13	14.5
	1.5	M*	M*	M*	M*	M*

*Ejemplar muerto

4. CONCLUSIONES

Dioon merolae presenta una doble latencia ocasionada por los inhibidores contenidos en la sarcotesta y una esclerotesta impermeable, para eliminar debilitar esta última capa y promover la germinación, el método de escarificación más eficaz fue la fractura de la esclerotesta. El remojo en agua por 48 horas, lijado de la semilla e inmersión en peróxido de hidrógeno al 3 % por 24 horas de la semilla no fueron suficientes para promoverla.

La aplicación de la hormona brasinoesteroide CIDEF-4 disuelta en una dosis 100 mg L⁻¹ en remojo durante 48 horas, no influyó significativamente en la tasa de germinación de esta cícada.

5. LITERATURA CITADA

- Bajguz A. 2011. Brassinosteroids – occurrence and chemical structures in plants. *In: HAYAT S., AHMAD A. (Eds.) 2011. Brassinosteroids: A class of plant hormone. 1st Edition, 462 p.*
- Capote I., M.Escalona, M.Daquinta, D. Pina, D.Gonzalez, yC. Aragon.2007. Efecto del análogo de brasinoesteroide (MH5) en la aclimatización de los brotes de *Vriesea* propagados en Sistemas de inmersión temporal. *Ciencia y Tecnología 3: 29-33*
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza-Proyecto Semillas Forestales (CATIE-PROSEFOR). 1999. Técnicas para la escarificación de semillas forestales. Manual técnico/ CATIE No. 36. DANIDA Forest Seed Centre. Turrialba, C. R., 57 pp.
- Chong, C., Bible, B. B., y J. Hak-Yoon. 2002. Germination and emergence. En: Pessaraki M. (Ed.). *Handbook of plant and crop physiology. 2a. ed. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 57- 115.*
- Coa U. M., N.J.R. Mendez, A. R.Silva, y P.S Mundarain. 2014.Evaluación de métodos químicos y mecánicos para promover la germinación de semillas y producción de fosforitos en café (*Coffea arabica*) var. Catuaí Rojo. IDESIA (Chile). Volumen 32, (1): 43-53
- Dehgan B., y C.R Johnson. 1983. Improved seed germination of *Zamia floridana* (sensu lato) with H₂SO₄ and GA₃ *Scientia Horticulturae, Vol. 19, Issues 3–4: 357-361*

- Dehgan, B., y B. Schutzman, (1989). Embryo development and germination of Cycas seeds. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 114(1):125-129.
- Doria J. 2010. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1):74-85
- Frett J.J 1987. Seed germination of Cycas revolute. *J. Environ. Hort.* 5(3):105-106.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Offset Larios S.A. México D.F. p.
- Godínez- Álvarez H., y A. Flores-Martínez 1999. Germinación de semillas de 32 especies de plantas de la Costa de Guerrero: su utilidad para la restauración ecológica. *Polibotánica* núm. 11:1-19
- González-Espinosa M., B.A. Pérez-Espinosa, y N. Ramírez-Marcial. 2012. Distribución espacial y respuesta fototrópica de *Dioon merolae* (Zamiaceae) en poblaciones relictuales del centro de Chiapas, México. *Botanical Sciences* 90 (1): 63-72
- Instituto Nacional de Ecología (INE) 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994. SEDESOL, México. 66 p.
- Joaquín T.B.M., A. C Trejo., Y. Hernández-Gara, P.J. Pérez, S. DE G. García, y C.A.R. Quero. 2007. Effects of ethephon, salicylic acid and cidef-4 on the yield and quality of guinea grass seed. *Tropical Grasslands* Vol. 41:55-60
- Kang Y.Y., and S.R. Guo. 2011. Role of brassinosteroids on horticultural crops. *In: HAYAT S., AHMAD A. (Eds.) 2011. Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone. 1st Edition, 462 p.*
- Madueño, A., García, D., Hernández, J., Rubio, C., Navarrete, A., y J. Bojorquez, 2006. Germinación de semillas de frijolillo, *Rhynchosia minima* (L) DC., luego de someterla a tratamientos de pregerminación. *Bioagro*, 18 (2): 101-105.
- Ortega-Rodés P., G. R. Rodés, D. E. Ortega, G. L. Fernández, M. Díez-Cabezas, y V. García. 2003. Efecto de un brasinoesteroide sintético (DAA-6) sobre el crecimiento del vástago y las raíces de la caña de azúcar. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 34, No. 2
- Pérez F. M. A. y Vovides P. A. 1997. Manual para el Cultivo y Propagación de cícadas, CONABIO. 47 p.
- Ramón J. V., M. A. Velázquez, M. J. Jasso, M. A. Musalem 2002. Efecto de tratamientos en la germinación de semillas de palma camedor (*Chamaedorea elegans* Mart.) *Rev. Ciencia Forestal en México* Vol. 27 (92): 95-103

- Reino J., J. A. Sánchez, B. Muñoz, Y. González, y L. Montejo 2011. Efecto combinado de la escarificación y la temperatura en la germinación de semillas de leguminosas herbáceas Pastos y Forrajes, Vol. 34, (2): 179-184
- Reyes Y., L. M. Mazorra, L. Martínez, y M. Núñez. 2010. Efecto del análogo de brasinoesteroide (biobras-16) en la germinación y el crecimiento inicial de las plantas de dos variedades de tomate en condiciones de estrés salino. Cultivos Tropicales, 2010, vol. 31, no. 2, p. 103-109
- Santos S. A. 2013. El Sr. Adrian Santos Sarmiento es un habitante del Ejido Andrés Quintana Roo, conoce ampliamente la zona de distribución de la especie *Dioon merolae* así mismo a la especie.
- Servicio Meteorológico Nacional-Comisión Nacional Del Agua. 2014. Normales climatológicas. Disponible en http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=42&Itemid=75
- Torres R. B. L., C. A. Espinosa, R. M. Mendoza, J.L. Rodríguez, M.B. Irizar, y J.S. Castellanos 2007. Efecto de brasinoesteroides en híbridos de maíz androestériles y fértiles. Agronomía mesoamericana 18(2): 155-162
- Uribe V. G. y Dzid E. R. 2006. Micorriza arbuscular (*Glomus intraradices*), *Azospirillum brasilense* Brassinoesteroide en la producción de maíz en suelo Luvisol. Agricultura Técnica en México Vol. 32 No. 1 p. 67- 76
- Utría-Borges E., V. Rodríguez-Oquendo, L. G. Moisés-Medina, J. O. Calderón-Agüero, y F. Suárez-Soria. 2004. Respuesta de plántulas de caféto (*Coffea arabica* L.) A la aplicación de brasinoesteroide en diferentes concentraciones y etapas de su desarrollo. Revista Chapingo Serie Horticultura 10(1): 11-14
- Witte, W.J. 1977. Storage and germination of *Zamia* seed. Proc. Fla. State Hort. Soc. 90: 89-91.

CAPÍTULO II

GERMINACIÓN *in vitro* DE *Dioon merolae* DE LUCA, SABATO Y VÁZQUEZ-TORRES

CAPÍTULO II. GERMINACIÓN *in vitro* DE *Dioon merolae* DE LUCA, SABATO Y VÁZQUEZ-TORRES

1. INTRODUCCIÓN

Dioon merolae, comúnmente llamada espadaña, es una especie de la familia Zamiaceae perteneciente al antiguo grupo de gimnospermas conocido como cicadales. Es una especie endémica de Chiapas y Oaxaca. Actualmente catalogada como en peligro de extinción en la NOM O59 (INE, 1994). Esta especie tiene un alto valor comercial en el mercado ilegal nacional e internacional como planta de ornato (Pérez y Vovides, 2006). Posee un gran valor biológico como especie primitiva, endémica y tiene estatus de riesgo.

La mayoría de las especies de cícadas son de muy lento crecimiento (Dehgan, 1983) comparado con otras especies, ya que pueden alcanzar decenas de años para alcanzar la edad adulta y vivir cientos de años. Subsecuentemente, la disponibilidad de semillas es muy baja las cuales a su vez son muy lentas para germinar.

Dioon merolae presenta una baja tasa de germinación de manera natural, aunque se sabe que cuando las semillas se desprenden del cono, el embrión ya se encuentra maduro, las capas de la semillas pueden ser una gran obstáculo para que esta germine. La semilla posee una capa carnososa con efecto inhibitorio llamada sarcotesta seguido de una capa pétreo (esclerotesta) muy gruesa que limita la entrada de agua (Dehgan, 1983). Pobladores locales de la región donde se localiza la especie mencionan que han probado la propagación por semilla con una escarificación mecánica eliminando la sarcotesta y remojo con la cual han obtenido tasas de germinación de un 20 a un 30 % (Santos, 2013: Comunicación personal). Siendo una tasa muy baja para una especie tan importante.

Aunque se puede buscar la reproducción de la especie por vía asexual, el uso de semillas como la fuente de material de propagación es importante debido a que se puede mantener una base genética más amplia (Fay, 1992) vital para la supervivencia de una especie. Por lo que es vital encontrar un procedimiento más eficiente para la germinación *D. merolae* haciendo uso

de métodos no convencionales y herramientas actuales que coadyuven a obtener una alta tasa de germinación.

Una alternativa es la germinación *in vitro*, la cual es una herramienta de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Por medio de ésta, la germinación de muchas especies puede ser mucho mayor comparado con técnicas convencionales (Fay, 1992). Esta técnica también tiene sentido cuando se utiliza semilla elite o para ganar información preliminar sobre el comportamiento de una especie bajo condiciones *in vitro* (George *et al*, 2008).

La germinación *in vitro* tiene ventajas respecto a la producida en condiciones naturales ya que puede solucionar casos de inhibición total de germinación, permitir la germinación de semillas con intermediario obligado, aumentar la tasa de germinación, evitar el aborto embrionario, reducir el tiempo necesario y sincronizar la germinación (López y González, 1996).

La ventaja de las técnicas *in vitro* sobre la convencional se debe al ambiente controlado donde se desarrolla siendo posible cultivarlas sin la cubierta seminal, mientras que en campo no es del todo apropiado ya que se expone el embrión a patógenos.

En el género *Dioon* se reportan dos estudios en condiciones *in vitro*. En *D. edule*, en el que se formaron brotes a partir de megagametofitos y de embriones cigóticos (Chávez y Litz, 1999), mientras en *Dioon merolae* se hizo un estudio de morfogénesis a partir de explantes de embriones cigóticos y megagametofitos a partir de los cuales se obtuvo la inducción de callos y en algunos la formación de brotes adventicios (Cabrera, 2008). Sin embargo no existe reporte de desarrollo de plántulas completas. Por otro lado, la germinación *in vitro* a partir de megagametofitos maduros completos con la formación de raíces y hojas no se ha reportado en este grupo de plantas.

Por lo anteriormente expuesto, sobresale la importancia de hacer estudios de germinación que ayuden a la propagación de la especie para la restauración y conservación de las poblaciones, reproducción con fines comerciales y para llevar a cabo estudios científicos. Por lo que la

presente investigación tuvo como objetivo obtener un protocolo para la germinación *in vitro* de *Dioon merolae*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad- Genética, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.

2.1 Material vegetal

Se colectaron semillas de un área de distribución natural de *Dioon merolae* en el ejido Andrés Quintana Roo municipio de Jiquipilas, Chiapas. Se identificaron plantas femeninas con conos maduros. La planta madre presentaba un aspecto vigoroso con abundantes hojas, de aproximadamente 1.80 m de altura. Los conos fueron cortados con la ayuda de un machete y se colocaron en costales de rafia para su traslado. Una vez que las semillas fueron desprendidas del cono se mantuvieron en remojo en agua por 24 horas y posteriormente se les retiró la sarcotesta (capa carnosa de la semilla).

2.2 ETAPA I. Desinfección y siembra en el medio Murashige y Skoog (1962) de semilla de *Dioon merolae* con esclerotesta, con media y sin esclerotasta

2.2.1 Medio de cultivo

Se utilizaron las sales minerales completas del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962) adicionado con mio-inositol (100 mg L^{-1}), tiamina (0.4 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}) y agar (Sigma[®], 8.5 g L^{-1}). Se adicionaron soluciones MS para 1 L^{-1} de medio de cultivo (Ver Apéndice 1). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N en un potenciómetro (ThermoScientific[®] Modelo Orion 3 Star) antes de agregar el agar. La esterilización se hizo en autoclave vertical (AESAS[®] 300) a 121 °C y 1.5 kg cm^2 de presión durante 20 min.

2.2.2 Desinfección superficial de las semillas y tratamientos de escarificación

Las semillas libres de sarcotesta (Figura 26 A) se colocaron en un recipiente de 1 L de capacidad y se lavaron durante cuatro minutos con agua corriente, después se adicionó detergente y se agitaron continuamente durante 15 minutos; enseguida se colocaron en el chorro de agua corriente hasta retirar el detergente (Figura 26 B), luego se enjuagaron con agua destilada esterilizada cinco veces.

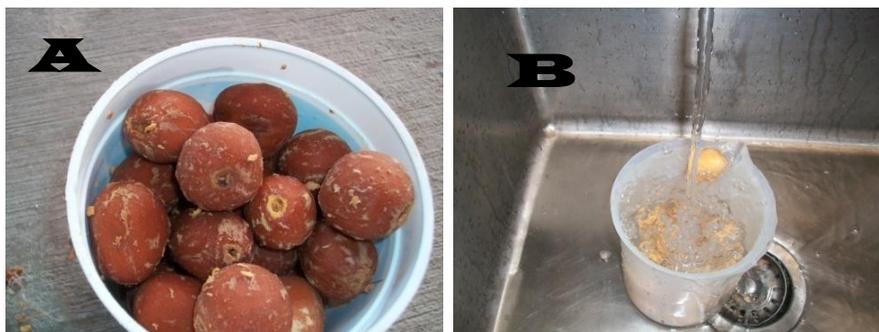


Figura 26. Limpieza y lavado de las semillas. A) Semillas libres de sarcotesta, B) Lavado de semillas.

Las semillas libres de sarcotesta se sumergieron en una mezcla de fungicidas compuesta por Benlate (8 g L^{-1}) y Captán (8 g L^{-1}) durante 30 minutos en agitación continua. Una vez cumplido el tiempo, se enjuagaron con agua destilada estéril hasta retirar todo el fungicida (cinco veces) y se llevaron a la campana de flujo laminar (marca VECO ®) donde se enjuagaron una vez más con agua destilada estéril.

Se aplicaron tres tratamientos de escarificación con ayuda de pinzas y navajas estériles. El primero consistió en la siembra de un tercio de las semillas con la esclerotesta; el segundo, se les retiró una parte de la esclerotesta; y, el tercer tratamiento, se les retiró completamente la esclerotesta.

A continuación, las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 50 % comercial (HC1O) (cloralex®) más plata coloidal estable al 5 % (microdyn®) y Tween® (20 gotas por cada 100 mL de solución) durante 30 minutos (Figura 27). Después se aplicaron

cinco enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente se secaron las semillas en papel estéril y se procedió a la siembra.



Figura 27. Desinfección superficial de semillas

2.2.3 Siembra de las semillas y condiciones de incubación

Dentro de la campana de flujo laminar y con ayuda de pinzas esterilizadas, las semillas se sembraron en el medio de cultivo en posición horizontal ligeramente sumergidas. Se usaron frascos de vidrio de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio de cultivo. En la etiqueta del frasco se incluyó fecha y tratamiento respectivo. Los cultivos se mantuvieron a 26 ± 2 °C en condiciones de oscuridad durante 15 días.

2.3 ETAPA II. Desinfección y siembra en el medio Schenk & Hildebrandt (SH, 1972) de semillas sin esclerotesta (gametofitos)

Con la finalidad de obtener el método óptimo para el establecimiento del cultivo aséptico se retomaron los resultados de la etapa I. Se sembraron las semillas sin la esclerotesta (gametofitos), utilizando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como parte de la desinfección aumentando las dosis del bactericida y la siembra en un medio de cultivo diferente. Se

aplicaron dos tratamientos de desinfección. El primero consistió en sumergir los gametofitos en la solución de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3% en agitación por 20 horas; y en el segundo, se omitió este paso.

2.3.1 Obtención de gametofitos

Las semillas de *D. merolae* libres de sarcotesta (parte blanda de la semilla) totalmente secas se colocaron de manera individual en un tornillo de banco en posición horizontal y se les aplicó la fuerza necesaria hasta fracturar la esclerotesta (Figura 28A), se abrió esta capa cuidadosamente para obtener los gametofitos de cada semilla (Figura 28B). Se obtuvieron seis gametofitos el primer día y seis el siguiente que correspondió al día de la siembra.

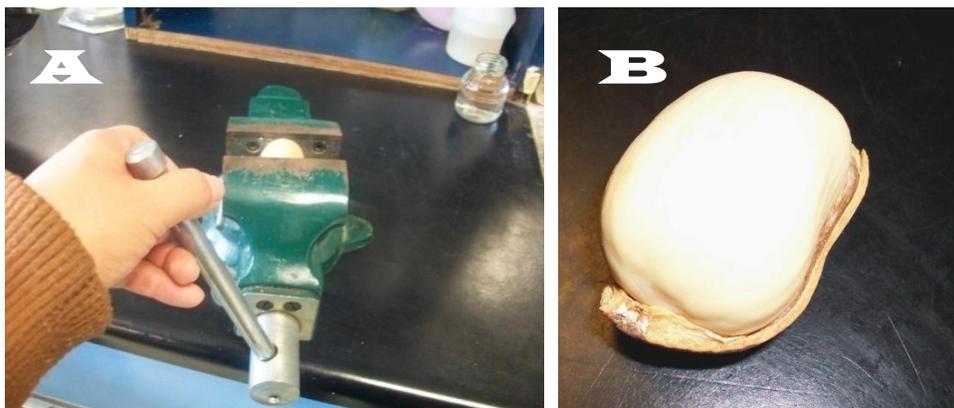


Figura 28. Obtención de gametofitos A) ruptura de la esclerotesta B) gametofito femenino

2.3.2 Medio de cultivo

Se utilizaron las sales minerales completas del medio de cultivo Schenk & Hildebrandt (SH, 1972) adicionado con mio-inositol (100 mg L^{-1}), tiamina (0.4 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}) y agar (Sigma[®], 8.5 g L^{-1}). Se adicionaron soluciones SH (1972) para 1 L^{-1} de medio de cultivo. El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N en un potenciómetro (ThermoScientific[®] Modelo Orion 3 Star) antes de agregar el agar. La esterilización se hizo con autoclave vertical (AESAS[®] 300) a 121 °C y 1.5 kg cm^{-2} de presión durante 20 min.

2.3.3 Desinfección superficial de los gametofitos

La desinfección de los gametofitos se hizo como en el apartado 2.2.2 de la primera etapa con los ajustes que se describen a continuación. Después de retirar totalmente el fungicida de los gametofitos se llevaron a la campana de flujo de laminar (marca VECO ®) donde se sumergieron en una solución de H₂O₂ al 3 % y se colocaron en un agitador orbital durante 20 horas, y a su término se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril.

A continuación, las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 50 % (cloralex®) más plata coloidal estable al 10 % (microdyn®) y Tween® (20 gotas por cada 100 mL de solución) durante 30 minutos. Después se aplicaron cinco enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente se secaron las semillas en papel estéril y se procedió a la siembra. Para que ambos tratamientos coincidieran en la fecha de siembra, el tratamiento con H₂O₂ se inicio 24 horas antes que el tratamiento sin peróxido.

2.3.4 Siembra de los gametofitos y condiciones de incubación

Dentro de la campana de flujo laminar y con ayuda de pinzas estériles, los gametofito de ambos tratamientos se sembraron en el medio de cultivo SH (1972) (Figura 29A-B), siguiendo el mismo método y condiciones de incubación que en el apartado 2.2.3. Después del periodo de oscuridad se pasaron a condiciones de fotoperiodo de 16 horas e intensidad luminosa de 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

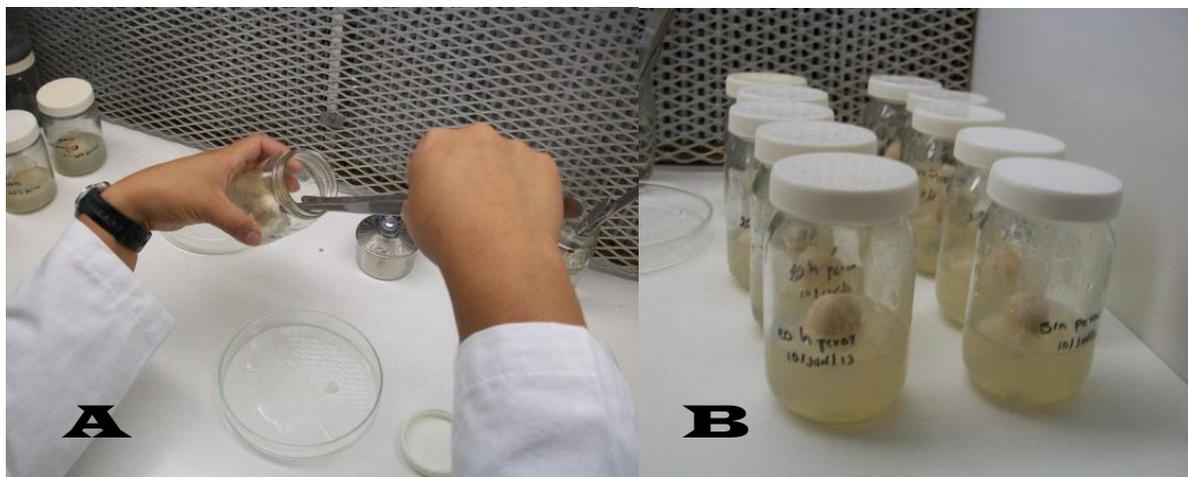


Figura 29. Siembra de gametofitos de *Dioon merolae* en campana de flujo laminar A) siembra de gametofitos; B) tratamientos de la etapa II.

2.3.5 Subcultivo

Con ayuda de pinzas estériles se hizo un subcultivo en la campana de flujo laminar al mismo medio (SH, 1972) a los 30 días después de la siembra. Se etiquetaron con fecha y su tratamiento respectivo. Se colocaron en el cuarto de incubación a 26 ± 2 °C en condiciones de fotoperiodo de 16 horas e intensidad luminosa de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.4 ETAPA III. Efecto de las concentraciones de sales minerales del medio Schenk & Hildebrandt (SH, 1972) en la germinación de gametofitos en tres edades fisiológicas de la semillas de *Dioon merolae*.

2.4.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Dioon merolae* provenientes de campo de tres diferentes edades fisiológicas. La edad fisiológica 1 (EF1) correspondió a semillas inmaduras cortadas aproximadamente un mes antes de la dehiscencia del cono, la edad fisiológica 2 (EF2) correspondió a semillas maduras cortadas cuando el cono empezó abrir; en tanto que la edad fisiológica 3 (EF3) consistió de semillas maduras con un año de almacenamiento. Los gametofitos se extrajeron como se indica en el apartado 2.2.3.1

2.4.2 Medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo Schenk & Hildebrandt (SH, 1972) como se indica en el inciso 2.2.3.2. Se hicieron tres tratamientos en los que se modificó la concentración de sales minerales (macronutrientes, micronutrientes y hierro) en el medio.

Cuadro 8. Concentración de sales minerales del medio de cultivo SH (1972)

TRATAMIENTO *(Núm.) (Clave)	CONCENTRACIÓN DE SALES (Medio SH %)
1 (M1)	100 (Testigo)
2 (M2)	50
3 (M3)	25

*Se establecieron siete repeticiones por tratamiento

2.4.3 Desinfección superficial de gametofitos

La desinfección de los gametofitos de las tres edades fisiológicas se llevó a cabo como en el apartado 2.2.3.3 de este capítulo utilizando H₂O₂ al 3% y por separado cada grupo de semilla según su edad fisiológica.

2.4.4 Siembra de gametofitos y condiciones de incubación

Dentro de la campana de flujo laminar y con ayuda de pinzas esterilizadas, los gametofitos se sembraron en el medio de cultivo en posición horizontal ligeramente sumergidos sobre. Se usaron frascos de vidrio de 500 mL de capacidad con 180 mL de medio de cultivo. En la etiqueta del frasco se incluyó fecha y tratamiento respectivo.

Cuadro 9. Edad fisiológica del gametofito y concentraciones de las sales minerales del medio evaluados en la germinación *in vitro* de *Dioon merolae*

Gametofito	Tratamiento (Núm.)	Concentración de sales (%)
EF1	1	100
	2	50
	3	25
EF2	4	100
	5	50
	6	25
EF3	7	100
	8	50
	9	25

Los cultivos se mantuvieron condiciones de oscuridad por 15 días a 26 ± 2 °C posteriormente se cambiaron a condiciones de fotoperiodo de 16 horas e intensidad luminosa de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Se realizó un subcultivo en la campana de flujo laminar al mismo medio SH (1972) respetando los mismos tratamientos, 30 días después de la siembra. Cada tercer día se contabilizó el número de semillas contaminadas por bacterias (%), número de semillas

contaminadas por hongos (%), inicio de germinación (días), número de semillas germinadas (%), número de raíces por plántula, número de hojas por plántulas, altura de plántula y presencia de callos.

Los datos obtenidos se analizaron por medio de un diseño con arreglo factorial de 3X3= 9 tratamientos totales, completamente al azar. Se establecieron 7 repeticiones para cada tratamiento y la unidad experimental fue de un explante por frasco. Para el análisis de la varianza se utilizó el paquete estadístico InfoStat (InfoStat, 2014) por medio de tablas de contingencia para el análisis de poblaciones homogéneas debido a que los resultados fueron similares. Además se aplicó la prueba X^2 con valor de p simulado basado en unas 10000 unidades debido a que la muestra fue muy pequeña.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ETAPA I. Desinfección y siembra en el medio Murashige y Skoog (1962) de semilla de *Dioon merolae* con esclerotesta, con media y sin esclerotesta

Los resultados de la Etapa I del establecimiento de cultivo aséptico fueron negativos ya que se obtuvieron niveles altos de contaminación (Figura 31).

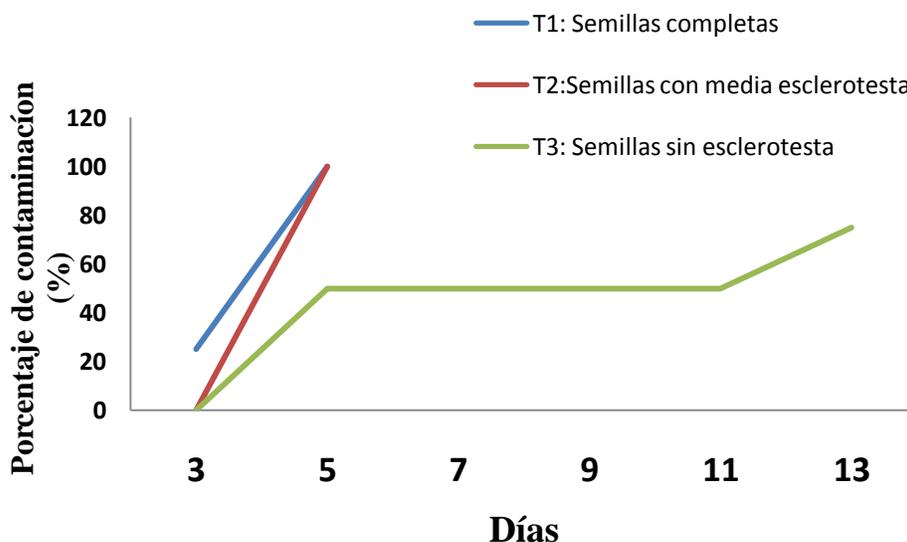


Figura 30. Porcentaje de contaminación por bacterias en el cultivo *in vitro* de *Dioon merolae* en el establecimiento de cultivo aséptico.

La contaminación en los tratamientos correspondientes a la siembra de semillas completas (T1) y semillas con media esclerotesta T2) fue del 100 % (Figura 33 A-B) en los primeros 5 días mientras en el tratamiento de semillas sin esclerotesta o gametofitos (T3) (Figura 31 C-D) fue de 50 % en el día 5; se mantuvo así hasta el día 13 que aumentó a 75 % en total. El 25 % restante no se contaminó y germinaron a partir del día 11.

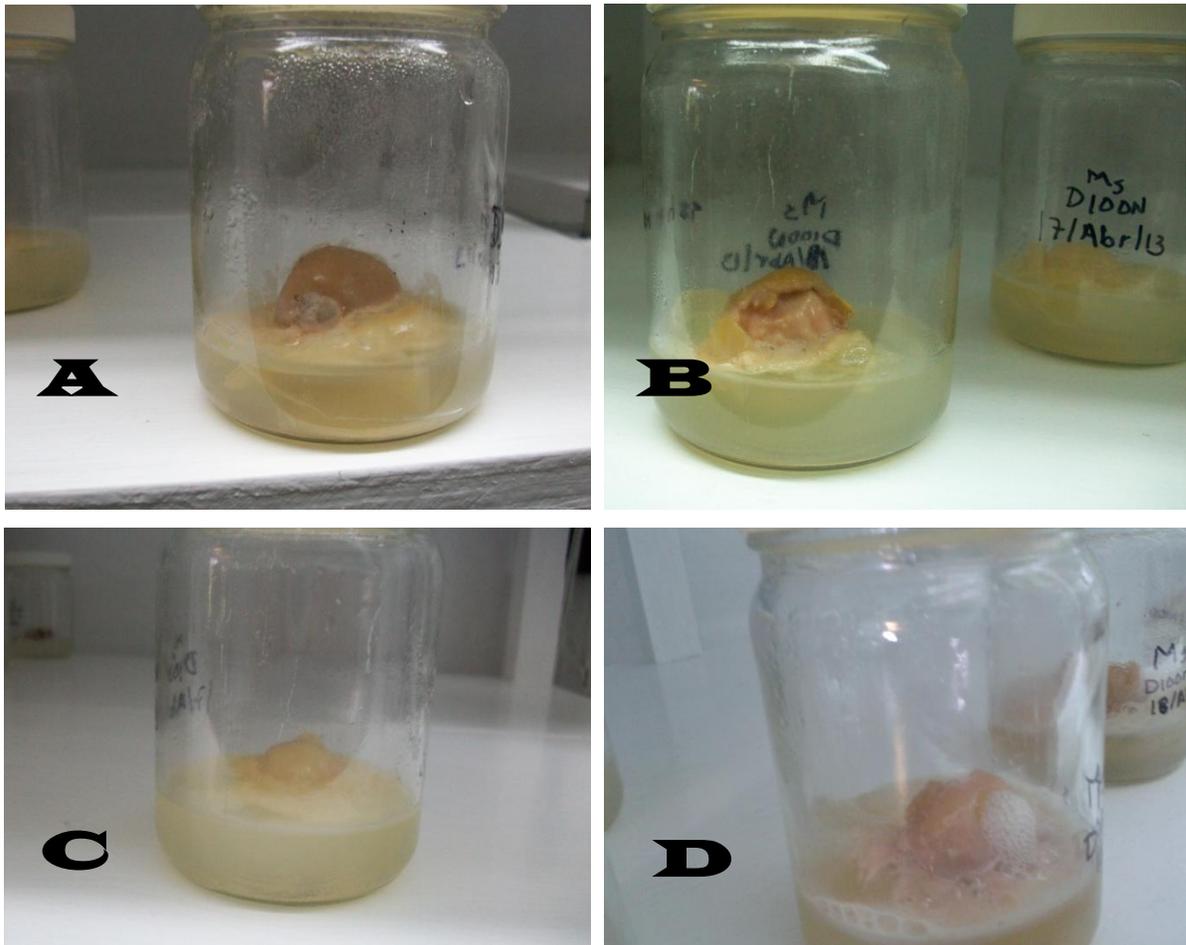


Figura 31. Respuesta obtenida en el primer experimento de establecimiento de cultivo aséptico de *Dioon merolae*. A) semilla completa contaminada por bacterias B) semilla con la mitad de esclerotesta contaminada por bacterias C) y D) semilla sin esclerotesta contaminada por bacterias.

La germinación del único ejemplar de la Etapa I que correspondió al tratamiento de la semilla sin esclerotesta (T3) tuvo un crecimiento normal hasta llegar a plántula.

En esta Etapa I en la que se buscaba el establecimiento del cultivo aséptico de *D. merolae* se tuvo la pérdida de casi todo el material por contaminación; principalmente por bacterias. Los métodos de desinfección utilizados en la fase de establecimiento no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociadas a los tejidos de las plantas *in vivo*. Algunos son capaces de permanecer en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y así quedan protegidos de los agentes químicos. De esta forma se introducen en el cultivo *in vitro*, se propagan con el material vegetal y pueden manifestarse sobre los medios de cultivo en la fase de establecimiento o permanecer sin expresarse por largos períodos de tiempo (Hernández y González, 2010).

Muchas veces la presencia de microorganismos es detectada en la fase de establecimiento *in vitro*, sobre todo cuando la planta donante crece directamente en el campo y está expuesta a plagas y enfermedades, polvo y otros agentes, sin ningún tipo de control ambiental (Ramírez y Salazar, 1997). Estos contaminantes se limitan principalmente a las superficies exteriores de la planta, aunque, algunos microorganismos y los virus pueden ser sistémicos dentro de los tejidos (George *et al.*, 2008)

Entre las principales fuentes de contaminación bacteriana están el explante mismo, el ambiente de los locales de trabajo, el personal y las técnicas deficientes de desinfección (Hernández y González, 2010). En esta fase es posible que la gran cantidad de bacterias que se presentaron en el cultivo *in vitro* se deban a la procedencia de los explantes, ya que fueron colectados de campo.

Para eliminar las fuentes de contaminación es necesario aplicar una doble desinfección o incrementar las dosis de los agentes desinfectantes o en su caso cambiarlos por otros que ayuden a eliminar los microorganismos presentes en el explante (semilla) y extremar la asepsia al momento de la siembra.

El único ejemplar que no se contaminó provenía de la siembra de la semilla sin esclerotesta; esta capa podría ser una fuente importante de contaminantes. Por lo que es recomendable eliminarla desde antes del proceso de desinfección ya que no solo facilita la acción de los agentes desinfectantes sino que la optimiza.

La selección de medio de cultivo adecuado es también esencial para el éxito de siembras en las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Diferentes medios de cultivo y las concentraciones del mismo se han utilizado para cultivos *in vitro* de acuerdo al objetivo que se busca y a la especie en estudio puesto que cada una tiene diferentes requerimientos y no responden de la misma manera.

Después de una revisión sobre el medio de cultivo favorable para la germinación de *Dioon merolae* se encontró que el potencial osmótico del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962) es de -2.27 bares de macronutrientes y -2.20 bares en azúcares, mientras el medio Schenk & Hildebrandt (SH, 1972) su potencial osmótico es de -0.67 bares de macronutrientes y -1.46 bares en azúcares (Yoshida *et al.*, 1973). Como puede verse el potencial osmótico del medio MS es mucho más negativo que el medio SH (1972). Este valor puede afectar directamente el proceso de germinación por lo que se decidió continuar con la inducción en el medio SH (1972).

3.2 ETAPA II. Desinfección y siembra en el medio Schenk & Hildebrandt (SH, 1972) de semillas sin esclerotesta (gametofitos)

En esta Etapa se obtuvieron resultados favorables ya que se redujo significativamente la tasa de contaminación y se observaron las primeras respuestas de germinación.

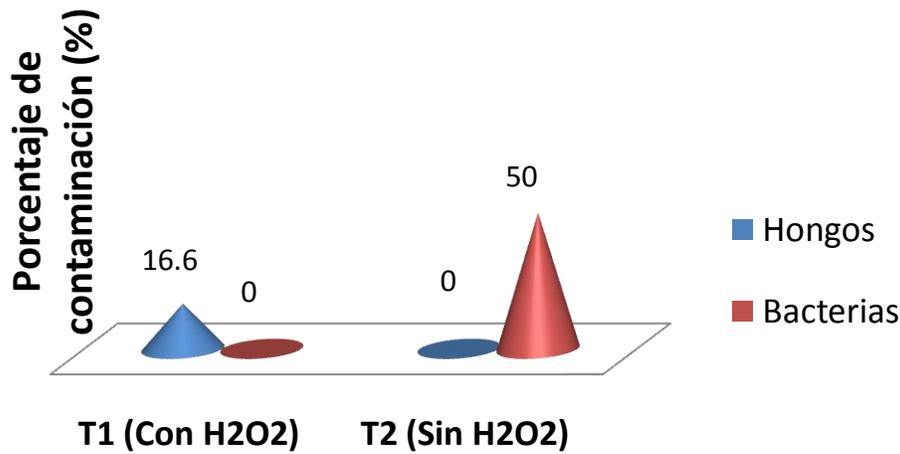


Figura 32. Porcentaje de contaminación en el establecimiento de cultivo aséptico de gametofitos de *Dioon merolae*

En la Figura 32 se puede observar que al sembrar la semilla sin esclerotesta, es decir, sembrando solamente los gametofitos se redujo considerablemente la contaminación con respecto al primer experimento. El tratamiento T1 al cual se le trato con 20 horas en H₂O₂ se obtuvo una contaminación equivalente al 16 % teniendo como principal contaminante los hongos que se presentaron a partir del día 13 después de la siembra. Mientras que el tratamiento T2 el cual no fue tratado con H₂O₂ tuvo una contaminación de equivalente a 50 % del tratamiento, teniendo a su vez como principal agente contaminante las bacterias, las cuales fueron observadas a partir del día 7 después de la siembra (Figura 33).

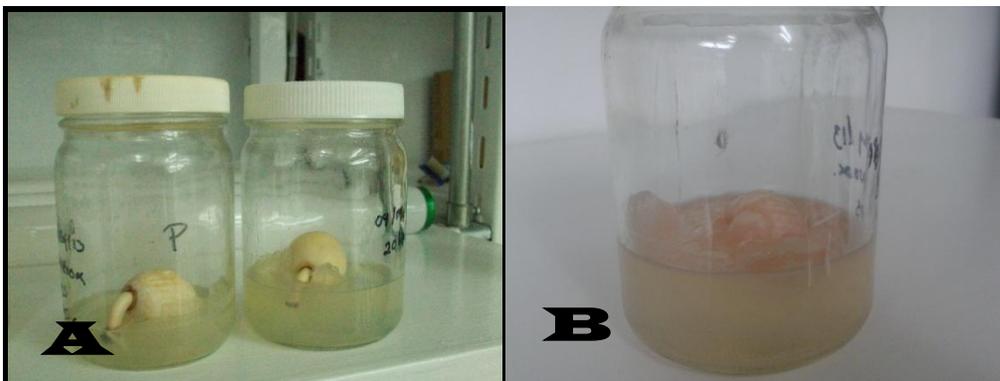


Figura 33. Establecimiento de cultivo aséptico de *D. merolae*. A) tratamiento con peróxido de hidrogeno B) tratamiento sin peróxido de hidrogeno

Al reducir favorablemente la contaminación se pudo establecer el cultivo *in vitro* y el proceso de germinación inició en ambos tratamientos. En la Figura 34 se puede observar el comportamiento de la germinación en días después de la siembra.

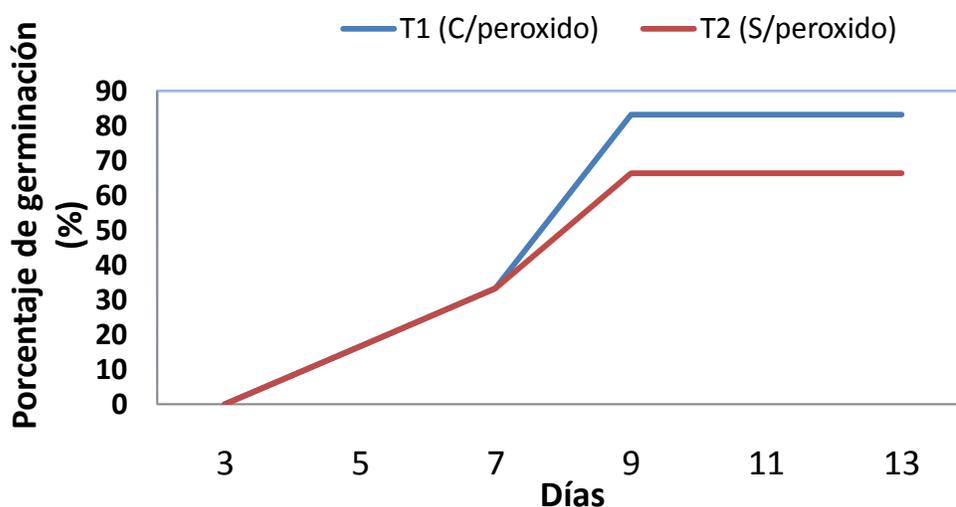


Figura 34. Porcentaje de germinación de gametofitos de *Dioon merolae* en medio Schenk & Hildebrandt (SH, 1972)

En esta segunda etapa el inicio de la germinación se presentó en el día cinco en ambos tratamientos aunque fue más rápida en el tratamiento donde se utilizó peróxido de hidrógeno para la desinfección, pues todos los frascos dieron respuesta en los primeros nueve días, mientras tanto el tratamiento sin peróxido dio respuesta en los primeros 13 días (Figura 35 A-B). El tamaño de la radícula fue creciendo gradualmente, desafortunadamente algunos ejemplares se contaminaron por lo que no se pudo continuar su observación. El desarrollo de la radícula fue más rápido en el tratamiento T1. El porcentaje de germinación fue el mismo para ambos tratamientos con un 83.3% el cual es muy representativo. Pocos ejemplares presentaron el cambio de coloración en la radícula antes de los 30 días, en la mayoría se presentó después del subcultivo que se hizo a los 30 días (Figura 35 C-D).

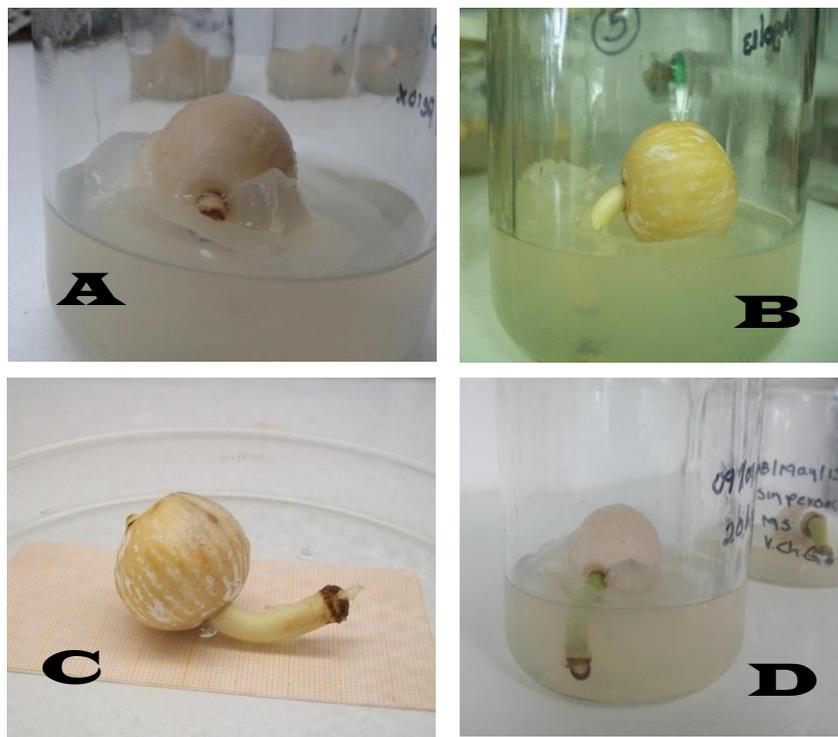


Figura 35. Germinación de *Dioon merolae*. A) inicio de germinación a los 5 días B) crecimiento de la radícula C) semilla germinada antes del subcultivo D) cambio de coloración en la radícula después del subcultivo

A diferencia de la primera etapa, al retirar completamente la esclerotesta se elimina una fuente importante de contaminantes provenientes de campo. Existen reportes de obtener mejores resultados en el cultivo de tejidos *in vitro* cuando se elimina completamente la testa de la semilla o cuando se trabaja únicamente con embriones cigóticos (Rinaldi y Leva 1995; Gómez-Merino *et al.* 2010). Con este proceso, complementado con el uso de H_2O_2 durante 20 horas en agitación se logró establecer el cultivo aséptico y observar el inicio de la germinación.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un agente oxidante que se descompone vigorosamente y exotérmicamente con el oxígeno y el agua en la presencia de la mayoría de los metales, en solución alcalina y en presencia de la enzima catalasa. Se utiliza en una serie de productos para el hogar, incluyendo desinfectantes de uso general, blanqueadores libres de cloro, quitamanchas tela, desinfectantes de lentes de contacto y tintes para el cabello, y es un

componente de algunos productos de blanqueamiento dental. En la industria, el uso principal de peróxido de hidrógeno es como agente blanqueador en la fabricación de papel y pulpa. El peróxido de hidrógeno se ha empleado medicinalmente para el lavado de heridas y para la esterilización de instrumentos oftálmicos y endoscópicos (Watt *et al.*, 2004). Su uso dentro de cultivos vegetales *in vitro* ha sido muy favorable para reducir los niveles de contaminación en el cultivo de muchas especies.

Flores *et al.* (2008) mencionan haber obtenido los mejores resultados con el uso de H₂O₂ comparado con otros agentes desinfectantes como el etanol y el hipoclorito de sodio en la germinación de la palma *Nolina parviflora* puesto que no sólo ayudó a reducir la contaminación sino que produjo un mayor efecto en el desarrollo de la raíz. Este efecto también se manifestó en semillas de oleaginosas como el cártamo y el girasol (Dolatabadian y Modarres Sanavy, 2008) al estimular la tasa de crecimiento.

También se ha demostrado que el H₂O₂ mejora la germinación del pino de hoja larga (*Pinus palustris* P. Mill) mediante la reducción de los hongos patógenos transmitidos por semilla (Barnett y Varela, 2004). En tanto que si se combina con NaOCl los resultados pueden ser aun más favorables (Duarte *et al.* 2014), por lo que es muy útil en casos severos de contaminación. Para establecer un protocolo de germinación *in vitro* de *Dioon merolae* el uso peróxido de hidrógeno en agitación resultó fundamental.

Rodríguez *et al.*, 2014 sugieren que las macrosales son el componente del medio MS (1962) que afecta más negativamente la germinación de *Ugni molinae* disminuyendo de 42 a 18 % respecto al tratamiento agar-agua. Al respecto, Cárdenas y Villegas (2002) señalan que de las macrosales NH₄NO₃ y KNO₃ poseen un potencial osmótico muy negativo, causando desordenes fisiológicos y, por tanto, la germinación se ve afectada.

3.3 ETAPA III. Efecto de las concentraciones de sales minerales del medio Schenk & Hildebrandt (SH, 1972) en la germinación de gametofitos en tres edades fisiológicas de semillas de *Dioon merolae*

Con la metodología utilizada en esta etapa los resultados obtenidos en la germinación *in vitro* de *Dioon merolae* fueron favorables ya que se obtuvieron plántulas con raíces y hojas. El análisis estadístico aplicado a los datos recabados en esta etapa, reveló que la edad fisiológica de la semilla si interviene de manera significativa en la germinación de *Dioon merolae*, puesto que al utilizar gametofitos inmaduros existió una nula germinación.

La contaminación que se presentó en el experimento se muestra en dos etapas, la primera es la que ocurrió en los primeros 30 días después de la siembra y la segunda la que ocurrió después del subcultivo (después de 30 días) (Figura 36).

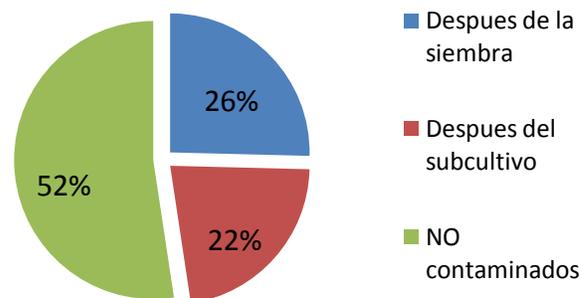


Figura 36. Tasa de contaminación en la germinación de *Dioon merolae*

La contaminación que se presentó en los primeros 30 días después de la siembra afectó un 26 del total del experimento, después del subcultivo la contaminación se elevó a un 48 % siendo los hongos el principal agente contaminante (Figura 37).

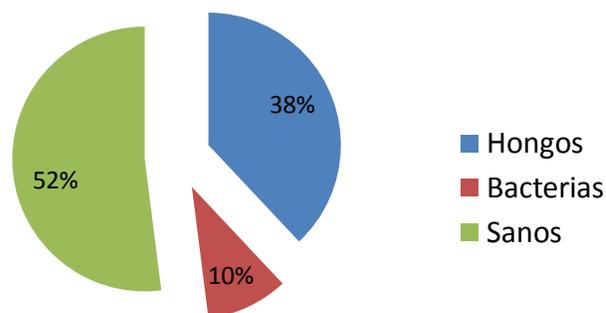


Figura 37. Agentes contaminantes en la germinación *in vitro* de *Dioon merolae*

La contaminación por bacterias que se presentó dentro de los primeros 30 días en el experimento fue de un 10 %, la cual fue muy baja comparada con la obtenida en la etapa I en la que fue del 100 % por este agente contaminante. La contaminación por bacterias en toda esta etapa ya no se vio modificada después del subcultivo por lo que se puede decir que el porcentaje de contaminación fue bajo y el protocolo de desinfección del material vegetal fue el adecuado para esta especie.

El porcentaje de contaminación por hongos del experimento fue bastante elevado siendo un factor muy importante en la pérdida de material en la germinación de esta especie.

La contaminación presentada en los primeros 30 días después de la siembra en todos los tratamientos evaluados fue muy similar como se puede observar en la figura 38, siendo después del subcultivo cuando hubo pequeñas diferencias (Figura 39).

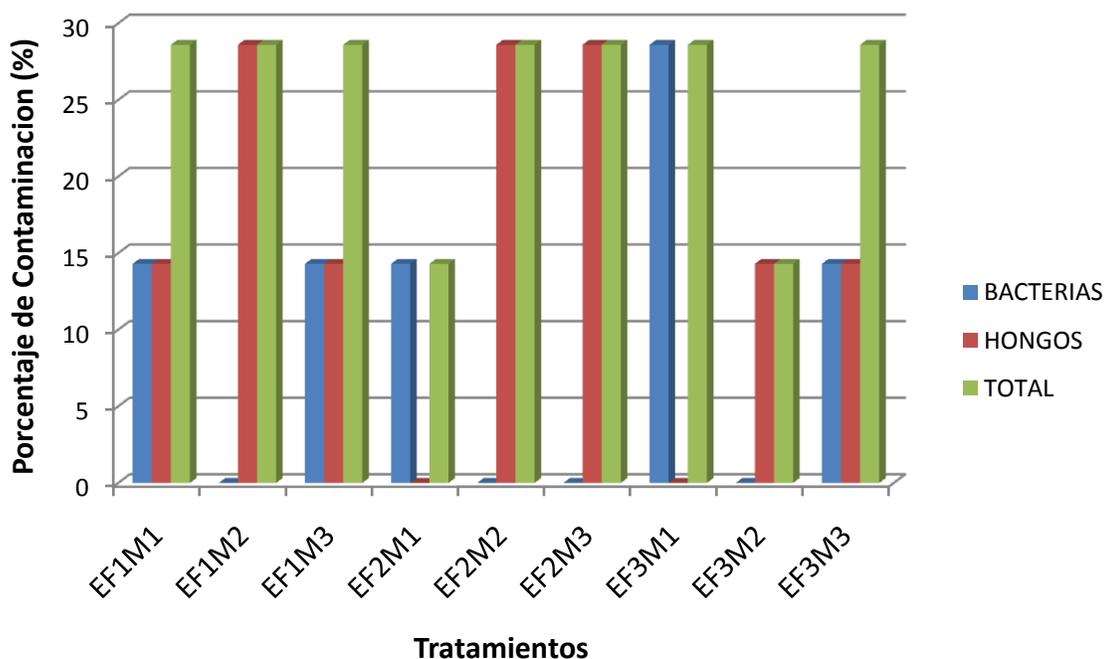


Figura 38. Contaminación por tratamientos en la germinación *in vitro* de *Dioon merolae* según el agente contaminante en los primeros 30 días después de la siembra

El tratamiento más afectado fue el que correspondió a la interacción de la semilla madura almacenada 12 meses y el medio de cultivo SH (1972) con la concentración de 50 % de las sales minerales (EF3M2) quien perdió un 71.5 % de su total por contaminación principalmente por hongos. Es posible que la contaminación presentada se ha atribuida principalmente por el manejo más que por la contaminación proveniente del material vegetal silvestre con que se trabajó.

Observando la contaminación que afectó a los factores principales estudiados sin combinar, edad fisiológica de la semilla y concentración de sales en el medio, no se observan diferencias significativas entre ellos (Figura 40).

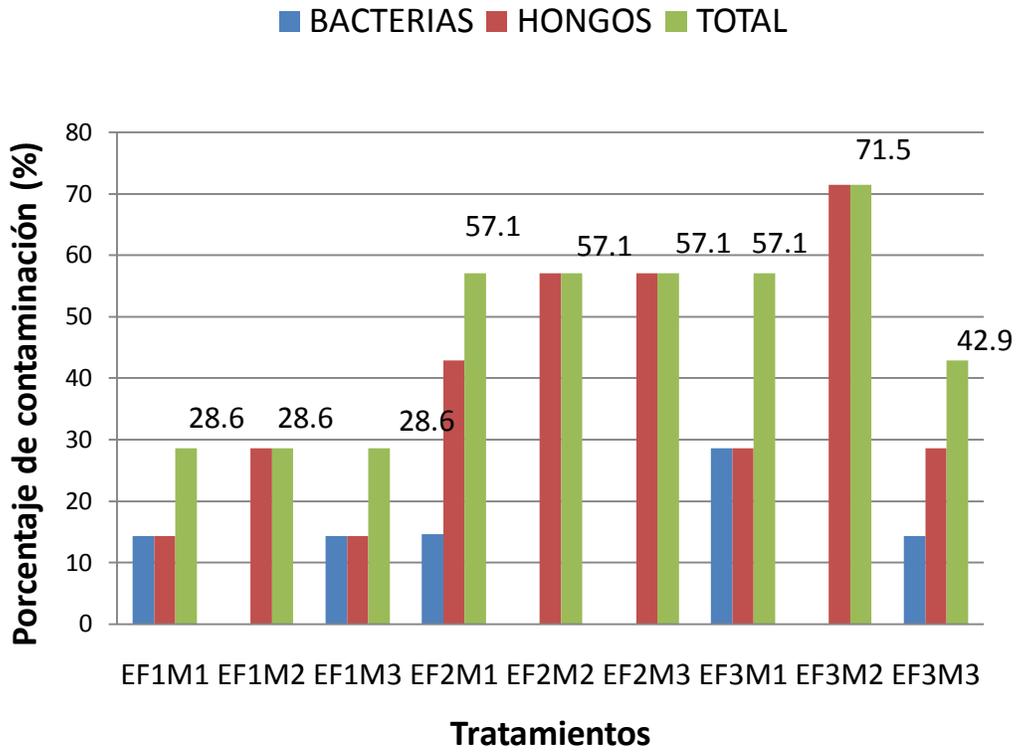


Figura 39. Contaminación por tratamientos en la germinación *in vitro* de *Dioon merolae* según el agente contaminante durante todo el experimento.

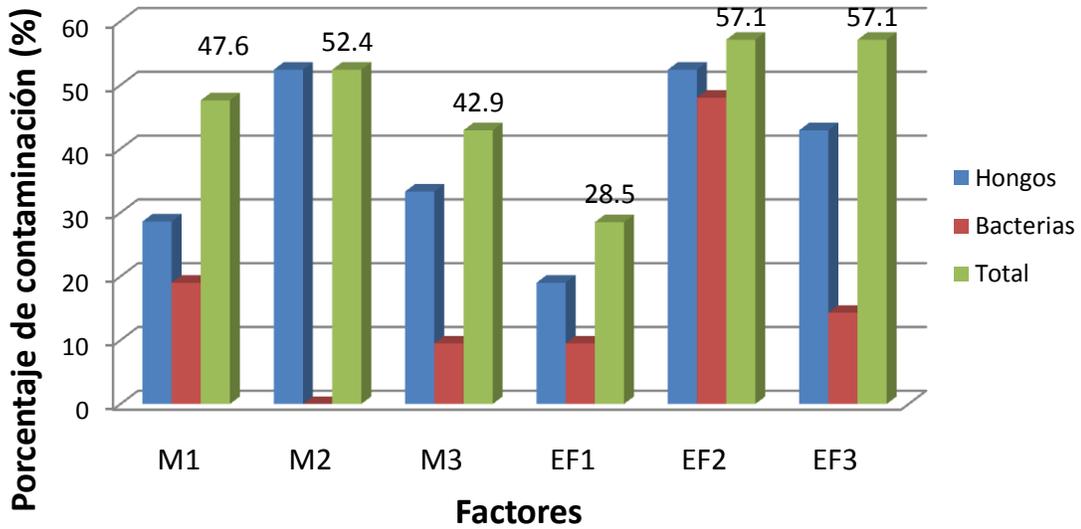


Figura 40. Porcentaje de contaminación por bacterias y hongos según los factores evaluados

En general los tratamientos registraron la emergencia y crecimiento de la radícula (Figura 41 A) que puestas en luz fueron cambiando de color de un tono blanquecino a un color verde (Figura 41 B-C). La raíz primaria creció en longitud y en grosor (Figura 41D-E), posteriormente se fueron observando pelos radicales muy gruesos y la emergencia de una o dos hojas primarias (Figura 41 F).

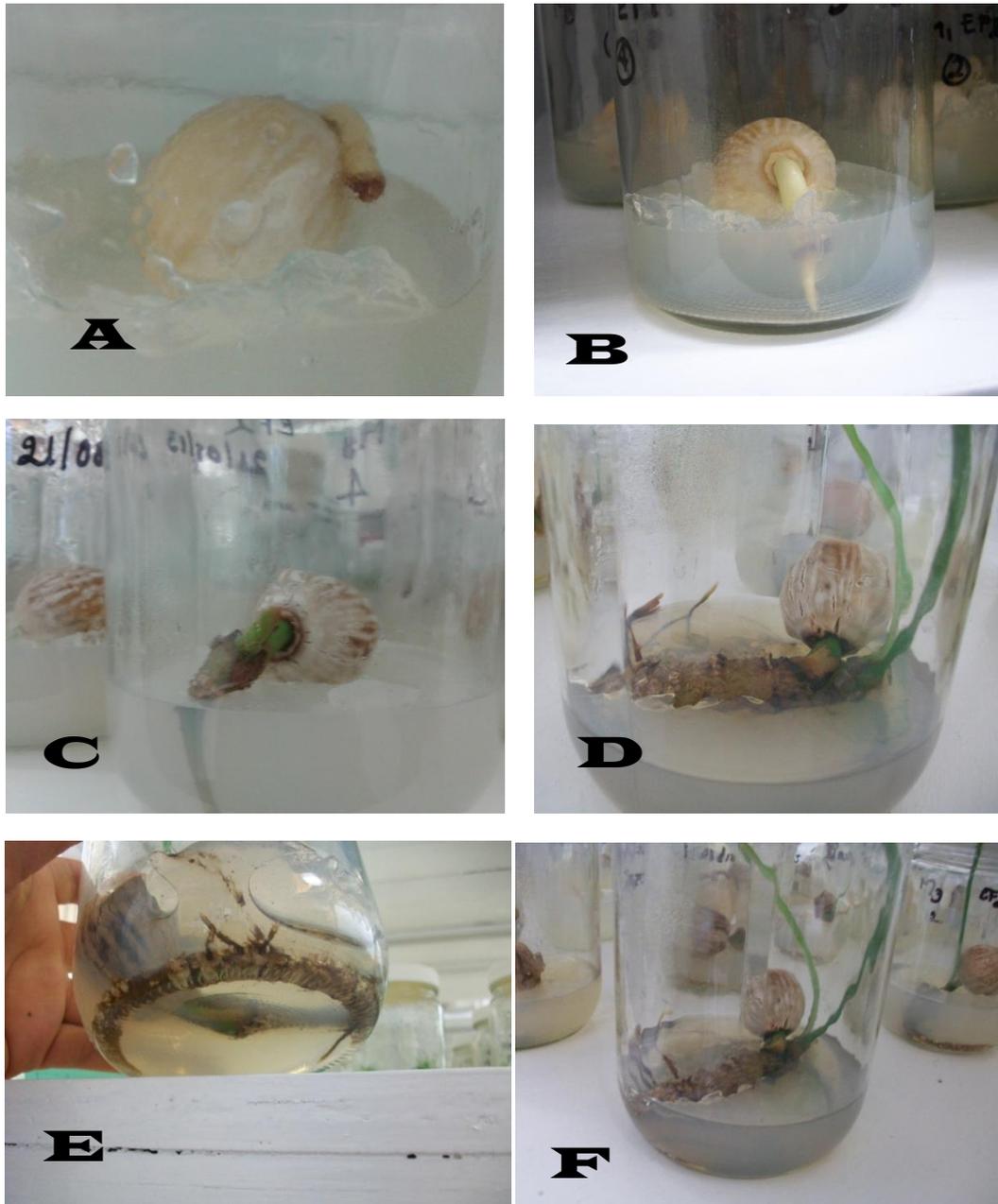


Figura 41. Proceso de germinación *in vitro* de *Dioon merolae*. A) inicio de la emergencia B) alargamiento de la raíz. C) cambio de coloración de la radícula. D y E) Engrosamiento y alargamiento de la raíz. D y F) crecimiento de las hojas primarias.

El crecimiento de la radícula, se inició entre el día tres y 12 después de la siembra en seis de los nueve tratamientos. Los gametofitos sin germinar en los primeros 30 días ya no emergieron aun cuando se subcultivaron. El porcentaje de germinación por tratamiento se muestra en la Figura 44.

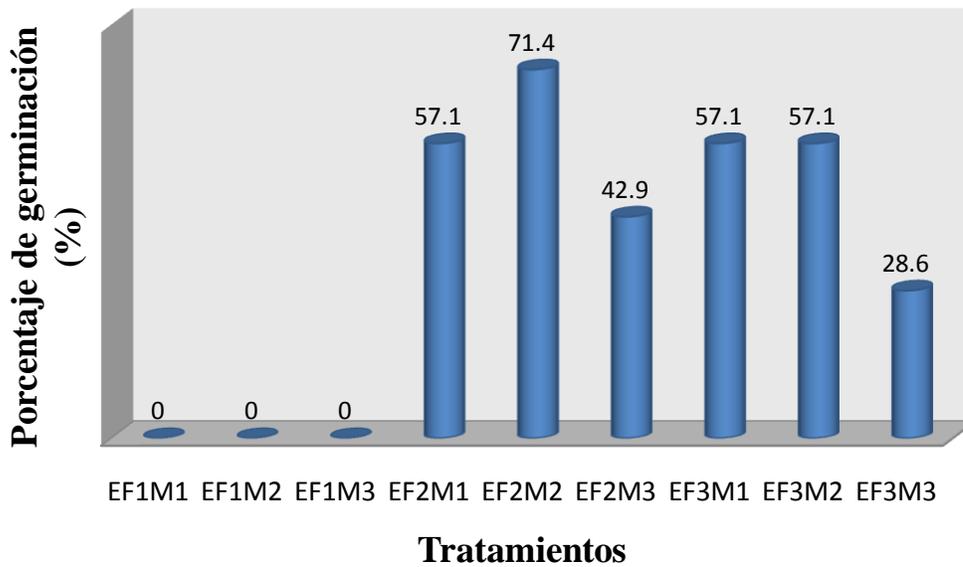


Figura 42. Porcentaje de germinación total en los primeros 30 días después de la siembra por tratamiento

En los tratamientos EF1M1, EF1M2 y EF1M3 no se logró obtener la germinación, la mayoría de los gametofitos tuvieron un ligero ennegrecimiento y no mostraron ninguna otra respuesta (Figura 43), por lo que este resultado se atribuye a la condición de la edad fisiológica de la semilla. En esta especie no es recomendable usar gametofitos de semillas inmaduras para promover la germinación *in vitro* a diferencias de otros trabajos en los que se reporta el uso de gametofitos inmaduros.

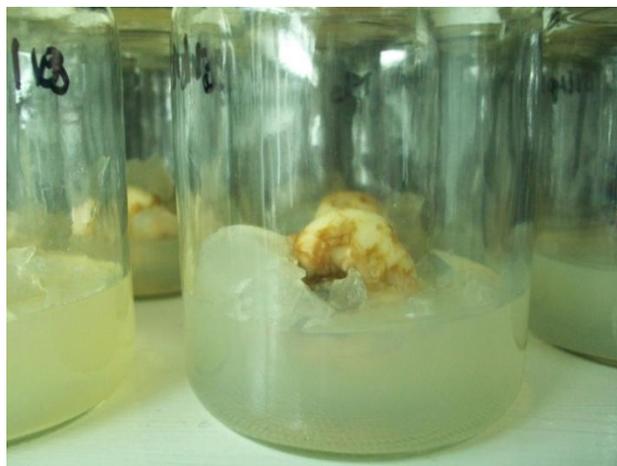


Figura 43. Semilla de la edad fisiológica 1 (EF1) con un ligero oscurecimiento en la superficie.

Al analizar todos los tratamientos hay diferencias significativa ($p=0.0043$) entre estos, siendo diferentes los tratamientos que corresponden a las semillas inmaduras (EF1M1, EF1M2 y EF1M3) con el resto. Esto es lógico ya que en esta edad fisiológica no existió la germinación.

Al comparar los seis tratamientos (EF2M1, EFM2M2, EF2M3, EF3M1, EFM3M2, EF3M3) donde si hubo germinación, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0.55$) incluso al aplicar la prueba de X^2 con valor de p simulado ($p=0.69$)

La germinación que se presentó en el experimento fue muy favorable en dos de las tres edades fisiológicas que se evaluaron, aun cuando no hubieron diferencias estadísticas, si se observa una diferencia porcentual importante entre algunos tratamientos. El tratamiento que correspondió a la interacción de la semilla madura sin almacenar y el medio de cultivo SH (1972) con la concentración de 50 % de las sales minerales (EF2M2) tuvo el porcentaje más alto de germinación, mientras que el tratamiento que consistió de la semilla madura almacenada 12 meses y medio de cultivo SH (1972) con la concentración de sales minerales al 25 % (EF3M3) alcanzó 28 % de germinación siendo el resultado más bajo.

Si se compara la germinación por los factores analizados (edad fisiológica de la semilla y medio de cultivo) (Figura 44) se observa que las semillas cortadas un mes antes de la dehiscencia del cono no son capaces de germinar *in vitro* mientras las semillas maduras sin

almacenar y almacenadas 12 meses tuvieron una germinación de 57 % y un 47.6 % respectivamente. En cuanto al tratamiento de los medios de cultivo, el que consistió de una concentración de 50% de sales minerales del medio SH (1972) fue el que más favoreció la germinación con un 42.9% mientras el que tenía una concentración de 25% de sales minerales sólo alcanzó un 23 % de germinación siendo el más bajo.

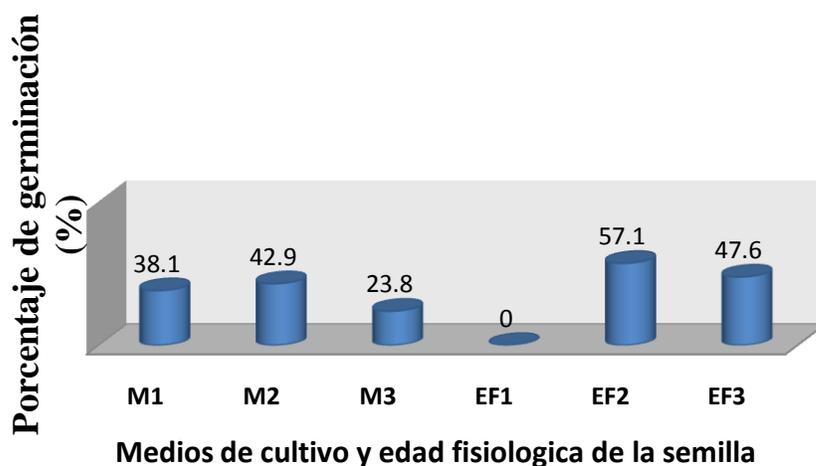


Figura 44. Tasa de germinación de *Dioon merolae* por concentración de sales del medio de cultivo (M1,M2, M3) y por edad fisiológica de la semilla (F1, F2, F3).

La edad fisiológica EF1 (semilla inmadura) no fue capaz para lograr la germinación por el método *in vitro*. De manera natural la semilla fertilizada de *Dioon merolae* es retenida en el megastrobilo por un año adicional mientras que se desarrollan los embriones, y así el embrión cubre su periodo de maduración dentro de una semilla todavía retenida en el megastrobilo, y este mismo depende de la planta madre. Los megastrobilos se desarticulan al finalizar el segundo año, y los embriones ya están lo suficientemente maduros para que la semilla germine durante un periodo relativamente corto que va de dos a seis semanas (Sanchez-Tinoco *et al*, 2000). Por esta razón no se recomienda el uso de las semillas que no estén completamente maduras porque puede desperdiciarse material muy valioso sin obtener resultados favorables.

Las semillas de las cícadas son recalcitrantes por ello es recomendable no almacenar más de seis meses este tipo de semillas debido a que pierden su viabilidad (Pérez y Vovides, 1997). En *Dioon merolae* se obtuvieron tasas de germinación muy similares entre semillas maduras sin almacenar que las semillas almacenadas durante 12 meses después de su maduración en el cono, con una tasa levemente superior en semillas sin almacenar. Por lo tanto aunque se puede perder ligeramente la viabilidad al almacenar la semilla, es posible almacenarla hasta 12 meses si es necesario. Aunque lo recomendable es que una vez hayan madurado completamente en la planta se preparen para la germinación *in vitro*. Ya que la edad del explante tiene gran influencia en la capacidad de respuesta para el desarrollo o adaptación de sistemas de cultivo *in vitro*.

Es importante mencionar que en todos los tratamientos donde se inicio la germinación se obtuvieron plántulas completas (con raíces y hojas) (Figura 45 A-B), pero en el tratamiento M3F3 fue mucho más lento ya que primero se formó una masa callosa en la raíz.



Figura 45. Plántulas de *Dioon merolae* germinadas *in vitro*. A) plántula con dos hojas con los folíolos enroscados B) plántula con muchas raíces secundarias y hoja expandida.

Cuadro 10. Germinación y crecimiento después de seis meses *in vitro*

Tratamiento EF2**	Número	Raíz (Núm)	Raíces secundarias	Raíz (cm)	Hojas (Núm)	Altura (cm)	Callo (Inducción)
M1	1	1	0	15	1	28	NO
	4	1	0	5	0		NO
	5	1	0	7	0		NO
	<i>Promedio</i>	<i>1</i>		<i>9.6</i>	<i>0.33</i>		
M2	2	1	> 15	15	1	8	NO
	3	1	0	5	0		NO
	5	1	0	24	2	12	NO
M3	2	1	2	5	1	5	NO
	3	NO GERMINÓ					
	4	1	>20	18	1	18	
Tratamiento EF3**	Número	Raíz Núm)	Raíces secundarias (Núm)	Raíz (cm)	Hojas (Núm)	Altura (cm)	Callo (Inducción)
M1	2	NO GERMINÓ					
	6	1	2	20	1	16	
	7	1	1	17	1	25	
M2	4	1	2	20	2	25	
	5	1	8	15	1	28	
M3	1	1	0	3	0	0	SI
	2	NO GERMINÓ					
	4	1	0	4	0	0	SI
	6	NO GERMINÓ					

*EF2: Edad fisiológica 2; semillas maduras cortadas cuando el cono empezó abrir.

**EF3: Edad fisiológica 3; semillas maduras con un año de almacenamiento

En la formación de raíces y hojas los tratamientos fueron muy similares con excepción del tratamiento que correspondió a la semilla madura almacenada 12 meses y el medio de cultivo con 25 % de concentración de sales minerales (EF3M3) debido a que sólo en este tratamiento se observó la formación de una masa callosa en la zona del meristemo apical de la raíz (Figura 48B) de algunos ejemplares, éste se inicio después del subcultivo, tiempo en el que su crecimiento en grosor fue mayor y menor en longitud (Figura 46A). Se observó la emergencia de una hoja pequeña que después de una semana se secó.

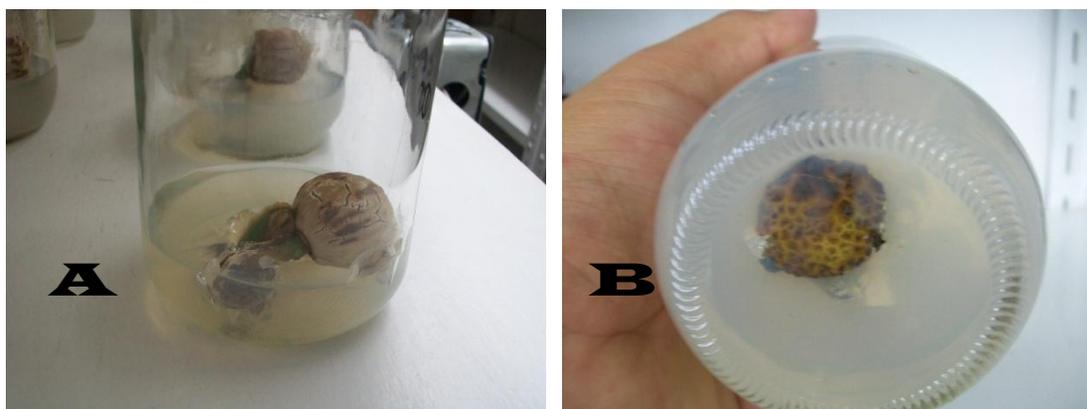


Figura 46. Formación de callo en la raíz. A) raíz corta y gruesa B) masa callosa en la base de la raíz

Un callo corresponde a un conjunto de células procedentes de la desorganización de un tejido o de una suspensión de células. El callo tiene la peculiaridad de presentar células no diferenciadas para su última función pero que conservan el poder de dividirse (célula meristemático o embriogénica) (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994). En las plantas silvestres, el tejido calloso se forma en respuesta a daños mecánicos sufridos por influencia del ambiente, por invasión de tejidos por ciertos microorganismos (Calva y Pérez, 2005) o como resultado del estrés (George *et al.*, 2008). Sin embargo, en cultivos *in vitro*, el tejido calloso se induce bajo el estímulo de hormonas adicionados al medio de cultivo; el metabolismo de las células, que se encontraban en un estado de reposo, se cambia, y comienzan una división activa (George *et al.*, 2008)

Dos autores reportaron la formación de callo subapical en raíces secundarias de *Cycas revoluta*, *Zamia furfuracea* (Webb *et al.* 1944) y *Dioon edule* (Webb, 1982) y con raíces

primarias de *Cycas revoluta*. Las raíces cultivadas en la oscuridad emergieron del agar, dejaron de crecer y se desarrolló un callo subapical. Después de la exposición a la luz en un fotoperiodo de 16 horas, los ápices de las raíces se transformaron en nódulos de raíz típicos de las cícadas. En estos trabajos utilizaron como medio de cultivo las sales minerales de White (White, 1963) más hierro de Murashige y Skoog (1962) y 2 % de sacarosa solidificados con agar.

Cabrera *et al.* (2008) mencionan haber obtenido la germinación de *Dioon merolae* a partir de embriones cigóticos y la formación de callo a partir de gametofitos pero sólo con la presencia de 2,4-diclorofenoxiacético(2,4-D) y cinetina. De los embriones germinados algunos generaron brotes adventicios, sin embargo, no generaron raíces, aún cuando fueron subcultivados a medio basal. Por su parte Chávez *et al.* (1992a) trabajaron en la organogénesis de *D. edule* utilizando como explantes embriones cigóticos y gametofitos, obteniendo callos a partir de estos últimos y la formación de brotes adventicios, todo esto haciendo uso de cinetina y 2,4-D.

Los resultados de la germinación en un medio de cultivo sin hormonas obtenidos en el presente trabajo indica la buena afinidad de la especie con este medio. El éxito de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* como un medio de propagación de la planta está muy influenciado por la naturaleza del medio de cultivo utilizado (George *et al.*, 2008).

Debido a que en los medios de cultivo de plantas se añaden nutrientes inorgánicos en forma de sales, la captación de éstos es generalmente proporcional a la concentración en el medio, para los elementos específicos esto puede ser diferente (George *et al.*, 2008). Aunque la concentración de sales del medio SH (1972) no afectó de manera significativa la germinación de semillas de *Dioon merolae* sí intervino en el tiempo de respuesta de este fenómeno.

Muchos medios se han desarrollado especialmente para el cultivo de embriones y algunos fueron los precursores de los medios que ahora se utilizan para el cultivo de tejidos *in vitro* en general. Comúnmente, los embriones maduros requieren sólo sales inorgánicas suplementado con sacarosa, mientras que para embriones inmaduros tienen un requisito adicional para las

vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento y a veces leche de coco o algún otro extracto de endospermo (George *et al.*, 2008)

El tipo de medio de cultivo así como la concentración o ausencia de algunos componentes en ellos, como sales minerales u hormonas desencadenan diferentes respuestas que pueden determinar el éxito o fracaso en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

4 CONCLUSIONES

La germinación *in vitro* de *Dioon merolae* es posible utilizando gametofitos femeninos como explantes en el medio de cultivo SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) adicionado con vitaminas E, inositol sin necesidad de hormonas. El inicio de la germinación (emergencia de la radícula) se presenta en los primeros 30 días después de la siembra.

La eliminación de la esclerotesta es esencial para favorecer la germinación *in vitro* de *Dioon merolae* puesto que no sólo es una barrera física para la germinación sino además es una fuente de contaminantes. El uso de peróxido de hidrógeno en la etapa de desinfección contribuye a reducir en gran medida la contaminación

La edad fisiológica de semilla es de suma relevancia para lograr la germinación *in vitro*. Es recomendable utilizar semillas que hayan madurado completamente en el cono de la planta ya que si se desprenden antes pueden interrumpir su maduración sin obtener semillas viables.

La concentración de sales en el medio de cultivo SH (1972) no afecta significativamente la germinación *in vitro* de *Dioon merolae*. Sin embargo, la concentración de sales minerales al 25% si puede bajar los porcentajes de germinación y prolongar el tiempo de respuesta en la germinación.

5 LITERATURA CITADA

- Abdelnour-Esquivel, y A., Escalant, J.V. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CEE-CATIE-CIRAD. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 38p.
- Barnett J. P., y S. Varela 2004. Chemical treatments to improve germination of longleaf pine seeds. NPJ Spring vol. 5 no. 118-24
- Cabrera, H. S.L. 2008. Morfogénesis *in vitro* de *Dioon merolae* de Luca, Sabato & Vázquez-Torres (zamiaceae, cycadales) a partir de Megagametofitos y embriones cigóticos. *Interciencia* 33, 12: 929-934
- Calva C. G., y Pérez V. J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria* Vol. 6 Núm. 11. 16 pág.
- Cárdenas M, y A. Villegas. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25: 213-217.
- Chávez V. M., y Litz R.E. 1999. Organogenesis from megagametophyte and zygotic embryo explants of the gymnosperm *Dioon edule* Lindley (Zamiaceae, Cycadales). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 58: 219-222.
- Dolatabadian, A., and S. A. M. Modarres Sanavy. 2008. Effect of the Ascorbic Acid, Pyridoxine and Hydrogen Peroxide Treatments on Germination, Catalase Activity, Protein and Malondialdehyde Content of Three Oil Seeds. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 36 (2): 61-66
- Duarte E., M. Acevedo, P. Sansberro y C. Luna. 2014. Detección de daño del coleóptero *Amblycerus longesuturalis* para la selección y germinación *in vitro* de semillas de Peteribí (*Cordia trichótoma* [Vell.] Arrab. ex Steudel). *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* Vol. 113 (1): 18-27
- Fay M. F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In vitro cellular & developmental biology - Plant*. Volume 28, Issue 1, pp 1-4
- Flores G. A., Álvarez M. J. G., Rodríguez De La O J. L., y Corona A. A. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana*, vol. 10, (2): 27-33
- George E. F., M.A. Halland G-J. De Klerk (eds.). 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition. Springer. pp. 65-113.
- Gómez-Merino F. C., Vidal-Morales B., Trejo-Téllez L.I., y C. Molinos Da Silva 2010. Escarificación y germinación *in vitro* de semillas de Heliconias. *Uciencia* 26(3):293-297

- Gorelicka R., and R. Osborn. 2002 Inducing sex change and organogenesis from tissue culture in the endangered African cycad *Encephalartos woodii* (Cycadales, Zamiaceae). *South African Journal of Science* 98: 14-17
- Hernández Y., y M.E. González. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos tropicales* vol.31 no.4
- López E. C.; y P. I. González 1996. A propósito de semillas. *Encuentros en la Biología*. Núm. 33.
- Murashige T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. Vol. 15, (3), pp. 473-497
- Pérez F. M. A., y P. A. Vovides 1997. Manual para el cultivo y propagación de cícadas, CONABIO. 47 p.
- Ramírez, M.; E. Salazar, 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, vol. 14, p. 497-506.
- Rinaldi L.M.R., y A.R. Leva 1995. *In vitro* organogenesis from diploid tissues of *Cycas revoluta* Thunb. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 43: 37-41
- Rodríguez M., Chacón M., y Carrillo R. 2014. Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de *Ugni molinae*. *Bosque* Vol. 35 (1): 119-122
- Sánchez T. M., E. M. Engleman y A. P. Vovides. 2000. Cronología reproductora de *Ceratozamía Mexicana* (Cycadales). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, núm. 66, pp. 15-23
- Schenk R. U., and A. C. Hildebrandt 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1): 199-204
- Watt B.E., Proudfoot A. T., and V. J. Allister 2004, Hydrogen peroxide poisoning. *Toxicological Reviews* Vol. 23,(1): 51-57
- Webb D. T. 1982. Light induced callus formation and root growth inhibition of *Dioon edule* Lindl. seedlings in sterile culture. *Z. Pflanzenphysiol.* Vol. 106, 223-228.
- Webb D. T., Nevarez M., and De Jesús S. 1984. Further *in vitro* studies of light-induced root nodulation in the cycadales. *Environmental and Experimental*. Vol. 24(1), pp. 37-41

Yoshida F., T Kobayashi, and T. Yoshida (1973) The mineral nutrition of cultured chlorophyllous cells of tobacco I. Effects of π salts, π sucrose, Ca, Cl and B in the medium on the yield, friability, chlorophyll contents and mineral absorption of cells. Plant Cell Physiol. Vol. 14:329-339.

CAPÍTULO III

DESCRIPCIÓN MORFO- ANATÓMICA DE SEMILLA Y LA PLÁNTULA DE *Dioon merolae* DE LUCA, SABATO Y VÁZQUEZ-TORRES

**CAPÍTULO III. DESCRIPCIÓN MORFO- ANATÓMICA DE SEMILLA Y
PLÁNTULA DE *Dioon merolae* DE LUCA, SABATO Y VÁZQUEZ-TORRES**

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los grupos actuales de espermatofitas, plantas con semilla, las cícadas cuentan con el registro fósil más antiguo. México es uno de los 3 centros de diversidad del orden Cycadales, con 54 especies pertenecientes a 3 de los géneros que constituyen la familia Zamiaceae: *Ceratozamia*, *Dioon* y *Zamia*. En este sentido, México es la región más diversa y con el mayor número de endemismos (88.9%) de la familia Zamiaceae en el Neotrópico (Nicolalde-Morejón *et al*, 2013).

Dioon merolae es una cícada en peligro de extinción (INE, 1994) comúnmente conocida como espadaña, fue descrita y clasificada como especie en 1981 (De Luca *et al*, 1981). Es endémica de Chiapas y Oaxaca, sus poblaciones son escasas y muy reducidas (Lázaro-Zermeño *et al*, 2012).

Los trabajos anatómicos son de gran importancia en las especies puesto que permite conocer aspectos que a simple vista es imposible identificarlos. En muchas ocasiones la anatomía se ha utilizado para clasificar taxonómicamente un grupo, puesto que en especies, géneros o incluso familias muy semejantes, es la única manera de separarlos. O bien se ha utilizado para establecer posibles relaciones filogenéticas entre taxa cercanas como se ha suscitado en algunas especies del genero *Zamia* (Acuña y Marín, 2013a) o posibles relaciones entre sus características anatómicas y los ambientes que estas especies habitan (Acuña y Marín, 2013b).

Dada la importancia de la especie y siendo pocos los estudios que existen sobre ella es importante conocer más a detalle sus características morfo-anatómicas que puedan servir como base para otros trabajos de investigación o para la conservación de la especie. Por lo que en este estudio se realizó un descripción morfo-anatómica de la semilla y plántula de la especie *Dioon merolae*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Histoquímica del Postgrado de botánica y en el laboratorio de Morfología de insectos del Postgrado de Fitosanidad, del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, México.

Para realizar la descripción anatómica se realizaron preparaciones histológicas de diferentes cortes de semilla (sarcotesta, esclerotesta, gametofito, embrión) y plántula (raíz, tallo y hoja).

Fijación y deshidratación. De la muestra original se tomó una sección de 0.5 cm y se colocó en un recipiente con fijador FAA (5 % ácido acético, 10 % formaldehído, 52 % alcohol isopropílico y 33 % agua destilada por 12 horas). Después se lavaron con agua de la llave por 10 minutos. Posteriormente se procedió a la deshidratación en los siguientes disolventes respetando la secuencia: Alcohol (30, 50, 70, 80, 100 y 100 %) y tres cambios en xileno absoluto durante 6 horas en cada uno.

Inclusión en parafina. Las muestras se colocaron en parafina fundida entre 60°C y 65°C por 12 horas. Luego se colocaron en un recipiente de aluminio se vertió parafina líquida y se orientaron en el plano transversal o longitudinal según cada corte. La parafina se dejó solidificar por 4 horas.

Cada muestra se pegó a un bloque de madera calentando un poco la parafina y el bloque de madera después con un metal delgado se calentó y se introdujo entre la madera y la parafina en los cuatro costados y se cortó haciendo una pirámide.

Microtomía. La muestra se colocó en un micrótopo rotatorio (American optical®) y se procedió a hacer los cortes a 12 µm. Los cortes se adhirieron con adhesivo de cromo (1% de grenetina, 0.2 % fenol y 0.1 % alumbre de cromo) y se extendieron sobre una platina caliente (50 °C) durante 1 min. Después se dejaron escurrir por 20 min y se colocaron en la platina caliente por 12 h.

Desparafinación. Los cortes se desparafinaron en una serie de tres cambios en xileno al 100% seguido de cinco en alcohol etílico (100, 100, 85, 70 y 50 %) por 3 min en cada cambio.

Tinción. Para la tinción se usó safranina-verde fijo, inicialmente los cortes se tiñeron en safranina (0.05 % safranina, 2 g de sal de mar, 100 mL agua destilada) por 24 h. Después los cortes se enjuagaron tres veces con agua destilada y se deshidrataron en una serie de alcohol isopropílico (50, 70, 80 y 100 %) con 1 min en cada cambio. En seguida se sumergieron en una solución de verde rápido al 0.12 % por 1 min, luego se eliminó el exceso de éste y se paso por alcohol isopropílico (100%) y tres cambios de xileno al 100% con 1 min por cada cambio. Los cortes se montaron en resina sintética y se dejaron secar sobre la platina caliente por 12 h.

Disociación. Para la disociación de la esclerotesta se utilizó el reactivo de Jeffrey (trióxido de cromo al 10% y ácido nítrico concentrado) por 24 h. y se montó con gelatina glicerinada.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Semilla madura

Las semillas de las cícadas se producen en una amplia variedad de tamaños, formas, color y textura de su superficie. La mayoría de las semillas es ovoide, pero también puede ser globular o cilíndrica. Algunas semillas son puntiagudas y otras hacia la cicatriz donde la semilla estaba unida al esporofilo (cálaza). La superficie de la esclerotesta es variable y puede ser lisa, rugosa, lagunar, fibrosa o crestada. Las semillas se dividen en dos grupos: las que son aplanadas y en forma de disco y las que son redondas u ovoides. Las semillas aplanadas y en forma de disco se restringen al género *Cycas*, donde la esclerotesta se divide a lo largo en dos partes iguales, hasta el extremo más ancho. Al ensancharse la abertura, se expone al gametofito femenino y poco después emerge la radícula. Los otros géneros de cícadas tienen semillas radiospermáticas, las cuales tienen un poro redondo que se fractura en el extremo con el micrópilo, al germinar la semilla, la radícula que se encuentra directamente atrás del poro, presiona hasta brotar (Yáñez, 2006)

Las semillas de *Dioon merolae* son de la más grandes que existen entre las gimnospermas y son consideradas como de las más grandes del género. La cubierta seminal de la semilla consta de una capa externa carnosa o sarcotesta; una capa gruesa o esclerotesta; y una capa parenquimatosa interna de la testa que se fusiona con la nucela, formando la paquicálaza. Todos estos rodean el gametofito (Sánchez-Tinoco y Engleman, 2004), donde se encuentra inmerso el embrión.

El óvulo de la semilla es ortótropo porque el hilo, la cálaza, y el micrópilo están en una línea recta. Sin embargo, si se considera la orientación del micrópilo con respecto al eje central del estróbilo, la semilla puede ser descrito como invertida (Sánchez-Tinoco y Engleman, 2004).

3.1.1 Morfología externa

La sarcotesta de *D. merolae* es amarilla al madurar y posteriormente va adquiriendo un color café muy brillante, la textura es carnosa y al madurar está cubierta de mucílago. Al secarse, las semillas quedan lisas al tacto. La forma de la semilla es regularmente redondeada aunque algunas pueden ser de forma ovoide. Suelen medir hasta 3 cm de diámetro aproximadamente. Se puede observar perfectamente la región del micrópilo y la región del hilio (Figura 47 A-C).



Figura 47. Morfología externa de la semilla. A) Vista lateral de la semilla madura y seca B) Vista externa de la sarcotesta lisa y brillante. C) Vista del hilio. Rm: región del micrópilo, Rh: Región del hilio

3.1.2 Anatomía de la sarcotesta

Anatómicamente la sarcotesta se compone de una epidermis que puede estar formada por dos o tres estratos, el parénquima presenta grandes espacios celulares y se pueden encontrar cristales. Las células parenquimáticas son más pequeñas que las epidérmicas, además se observan estomas.

Los cromosomas y núcleos se encuentran en diferentes etapas de la mitosis intensa. Se observa tejido vascular en la sarcotesta, xilema y floema, con laticíferos y parénquima perivasculares (Figura 48-50).

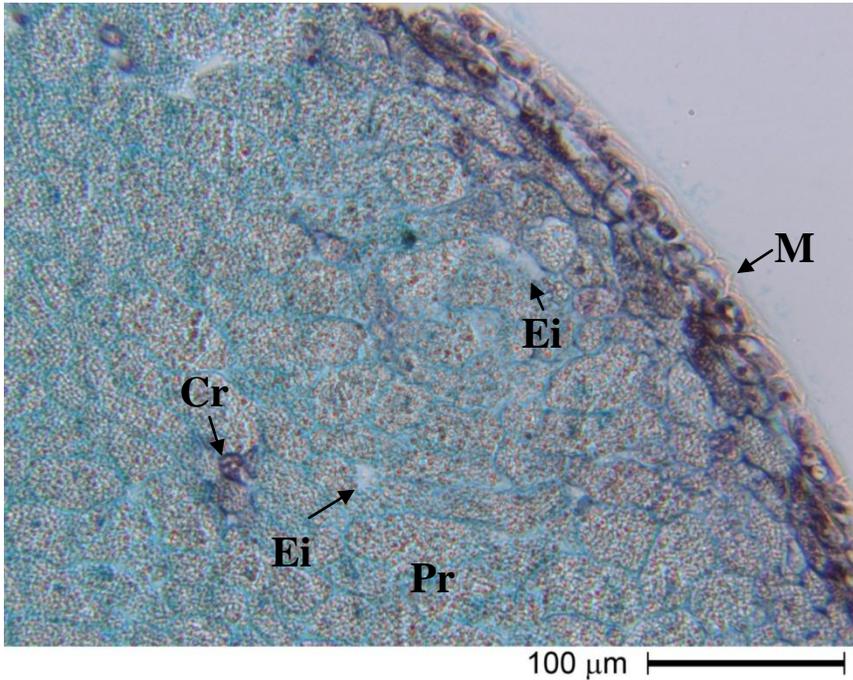


Figura 48. Sarcotesta anatomía general. A) Vista de región media: Epidermis con mucilago seco (Ms) y parénquima de reserva (Pr). B) Acercamiento hacia la epidermis

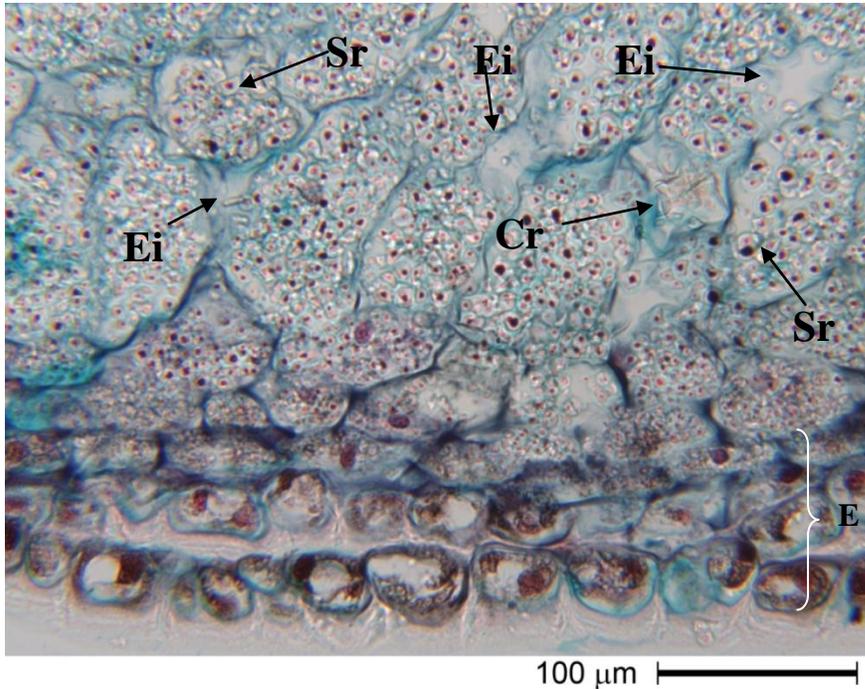


Figura 49. Sarcotesta: acercamiento hacia la epidermis (E). Epidermis (E) de la sarcotesta con dos a tres estratos y parénquima con grandes espacios intercelulares (Ei), cristales estrellados (Cr) y sustancias de reserva (Sr).

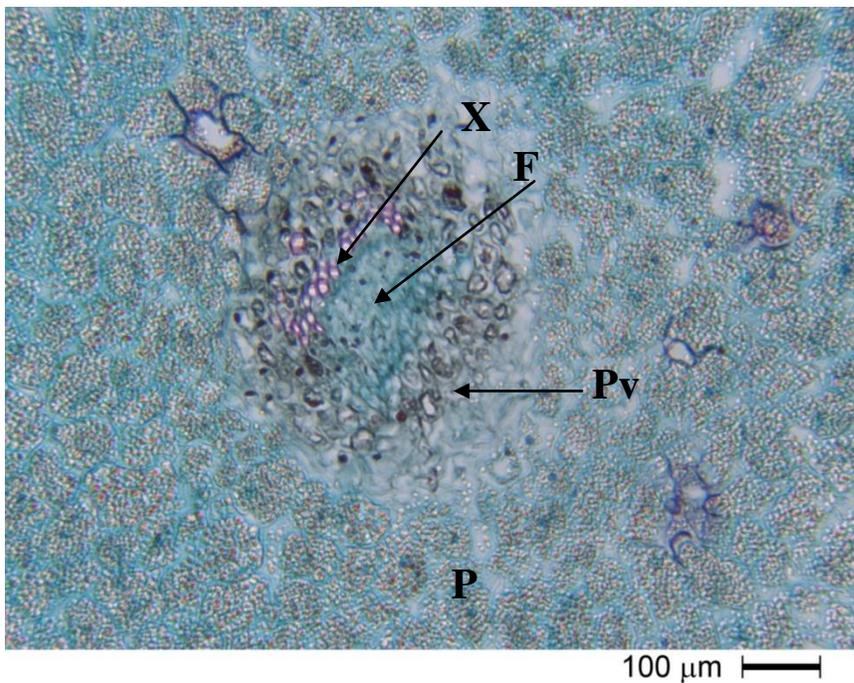


Figura 50. Haz vascular en la sarcotesta hacia la región de la esclerotesta; X: Xilema primario mostrando principalmente los elementos traqueales con pared lignificada (rojo). F: Floema primario rodeando al haz vascular. (Pv):

Parénquima perivascular conformando la vaina del haz vascular. Pr: parénquima de reserva.

Sánchez-Tinoco y Engleman (2004) reportaron una epidermis de una sola capa compuesta de células aplanadas tangencialmente en *Ceratozamia mexicana* con presencia de tricomas unicelulares que se encuentran en una base de 1-3 células y estomas en la epidermis con una densidad de 3,5 por milímetro cuadrado, o más cerca del hilio.

3.1.3 Esclerotesta

La esclerotesta es la siguiente capa de la cubierta seminal que se encuentra después de la sarcotesta y se caracteriza principalmente por ser una capa muy dura, es de color café claro y su forma es principalmente ovoide y lisa (Figura 51).

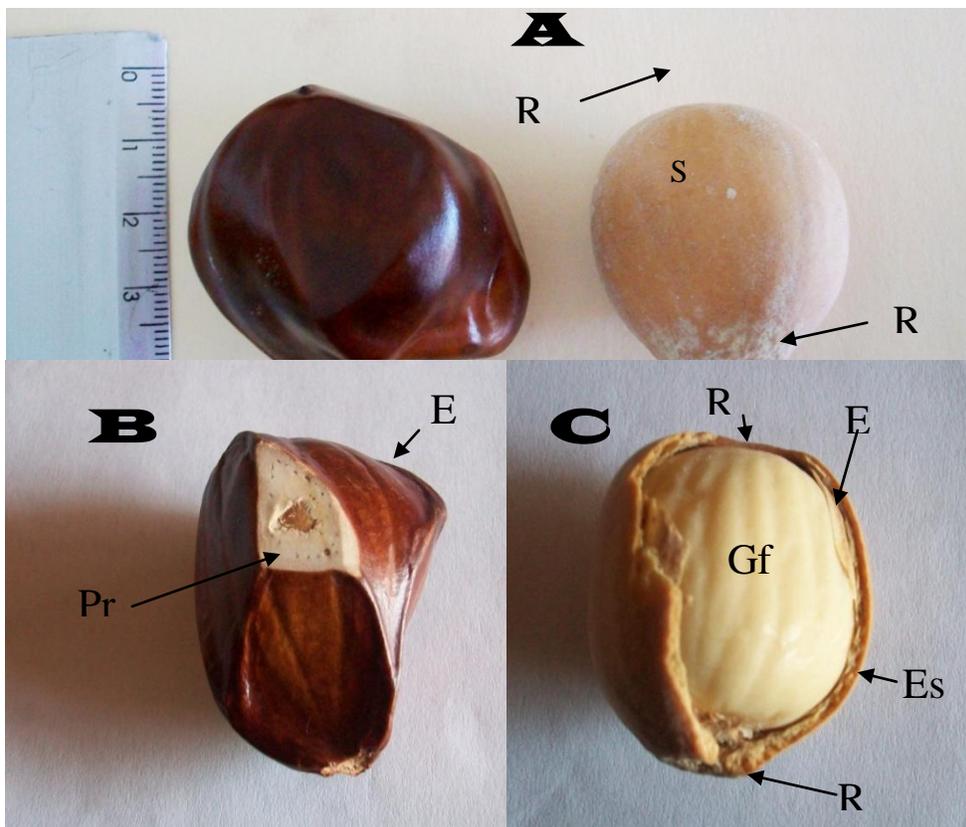


Figura 51. Morfología general de la semilla en los estratos que conforman la testa A) Semilla con (Izquierda) y sin (derecha) sarcotesta. B) Vista de un corte paradermal de la sarcotesta. C) Estructura de la esclerotesta fracturada a presión. E: Epidermis, Ed: Endotesta, Es: Esclerotesta, Gf: Gametofito femenino de reserva, Pr: Parénquima de reserva, Rh: región del hilio, Rm: Región del micrópilo

Anatómicamente la esclerotesta de *D. merolae* está compuesta de esclereidas y fibroesclereidas de diferentes tipos. Este último término se utiliza cuando resulta difícil clasificar a una célula como fibra o como esclereida.

El término esclerénquima se refiere al tejido compuesto de células con paredes secundarias, a menudo lignificadas, cuya función principal es mecánica o de sostén. Se supone que estas células permiten que los órganos vegetales resistan tensiones diversas como estiramientos, torceduras, pesos y presiones sin que las células blandas de paredes delgadas sufran daños.

Las células del esclerénquima se denominan esclerenquimáticas las cuales suelen dividirse en dos categorías: fibras y esclereidas. Las fibras son células largas y las esclereidas, células relativamente cortas. Las esclereidas, sin embargo, pueden ser desde cortas a notablemente largas, no sólo en plantas diferentes sino en una misma planta. Así mismo las fibras pueden ser más cortas o más largas (Evert, 2008).

Las esclereidas son células cortas con gruesas paredes secundarias muy lignificadas y provistos de numerosas punteaduras simples. Basándose en las formas se pueden distinguir varios tipos de esclereidas, las clases que más se acostumbra son: Las braquiesclereidas o células pétreas, células aproximadamente isodiamétricas o un poco alargadas y ampliamente distribuidas en el córtex, el floema, y la médulas de los tallos y carne de los frutos. Las Macroesclereidas, células alargadas y columnares como varillas, por ejemplo las esclereidas que forman la capa epidérmica como en empalizada del episperma (cubierta seminal externa) de las leguminosas. Las osteoesclereidas, células osiformes, también columnares pero con los extremos alargados y las astroesclereidas, células estrelladas con lobulos y brazos que divergen en una masa central. Además, las tricoesclereidas que son esclereidas de paredes delgadas semejantes a pelos y las esclereidas filiformes, células largas y delgadas semejantes a fibras (Evert, 2008).

En la disociación de la esclerotesta se encontraron diferentes tipos de fibroesclereidas, solitarias (Figura 52), ramificadas (Figura 54) y en paquetes (Figura 53 y 55).



Figura 52. Principales componentes celulares de la esclerotesta disociada con reactivo de Jeffrey. A) Fibroscleireida con algunas ramificaciones



Figura 53. Diversidad celular en la esclerotesta. Eca: Esclereida alargada, Eci: esclereida isodiamétrica, Fe: Fibroesclereida, Fr: Fibra

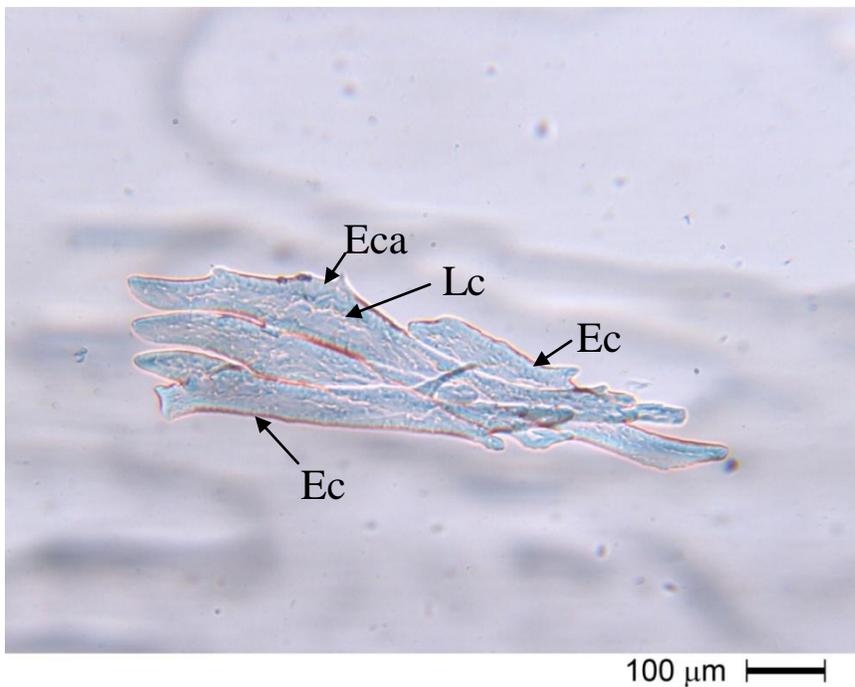


Figura 54. Esclereidas ramificadas con punteaduras y canales de punteaduras. Eca: Esclereida alargada, Lc: Región del lumen celular

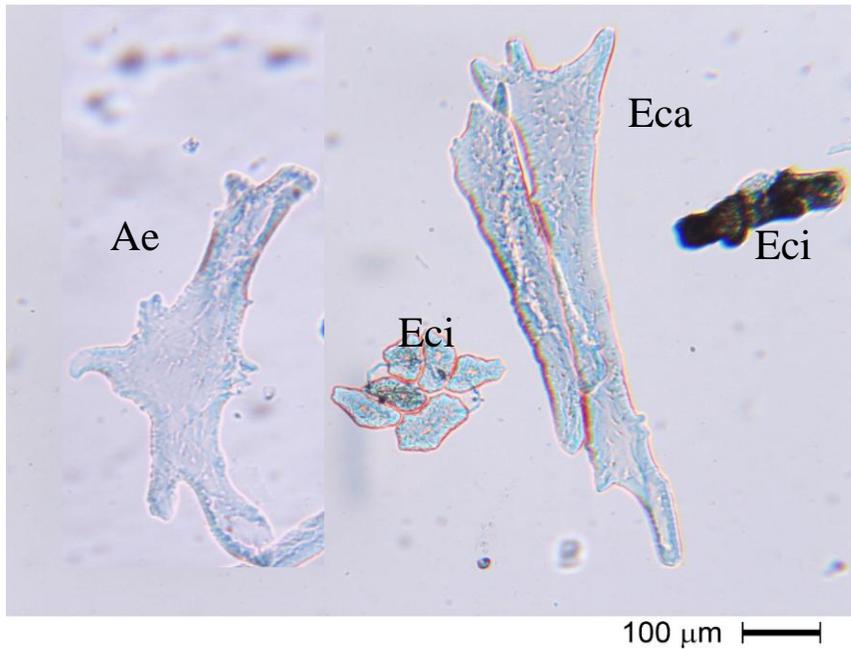


Figura 55. Tipos de Esclereidas, unas alargadas y ramificadas (Eca) y otras pequeñas isodiamétricas (Eci) y astroescleridas (Ae)

3.1.4 Anatomía del gametofito femenino

El gametofito femenino maduro también conocido como gametofito femenino vegetativo es un tejido de reserva que servirá para la futura alimentación de la plántula durante la germinación. En cícadas los gametofitos femeninos son bastantes grandes. En *Dioon merolae* llegan a medir alrededor de 2 cm de diámetro de color blanco o crema (Figura 56 A).

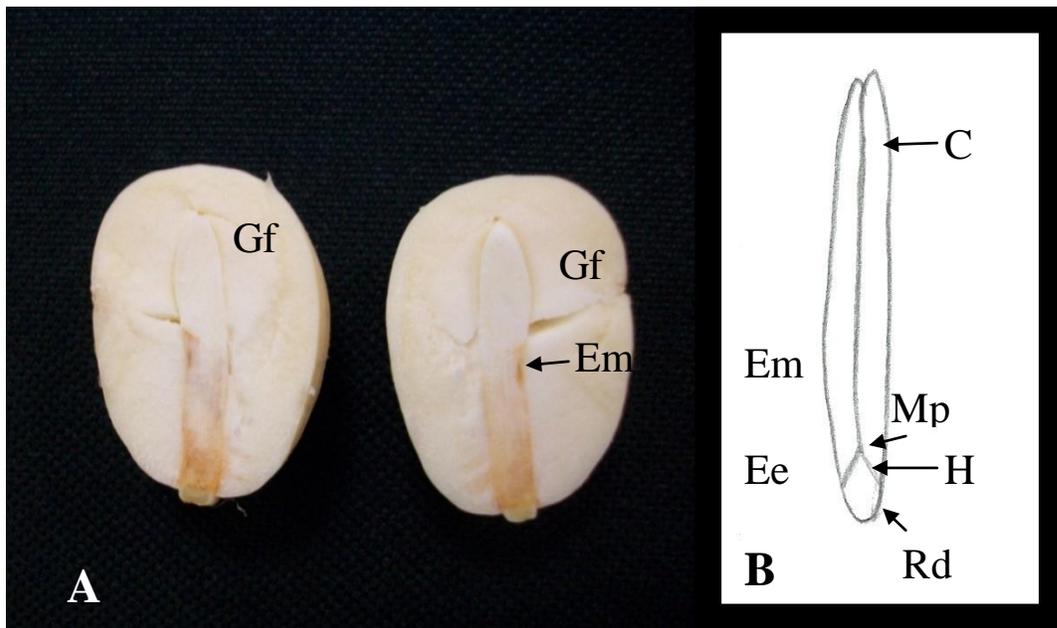


Figura 56. Gametofito y embrión. A) Vista general del gametofito femenino en corte longitudinal. B) Esquema general del embriónC:Cotiledón, Gf: Gametofito femenino de reserva, Em: Embrión, Ee: Eje embrionario, H: Región del hipocótilo, Mp: Meristemo apical de la plúmula, Rd: Radícula

Anatómicamente el gametofito femenino tiene una epidermis monoestratificada, con gránulos de reserva de dos tipos posiblemente proteínicos, otros posiblemente de almidón y canales de mucílago.

Las células mucilaginosas se encuentran en una gran cantidad de familias dicotiledóneas. Pueden aparecer por todas las partes de las plantas y suelen diferenciarse muy cerca de las regiones meristemáticas. Sus paredes celulósicas acostumbran a ser delgadas sin lignificar. Sólo las vesículas provenientes del dictiosoma intervienen en la secreción de mucílago y dicho mucílago pasa a través de la membrana plasmática por exocitosis (Evert, 2008). El mucílago se caracteriza por su elevado contenido en polisacáridos y su capacidad de absorber y retener agua.

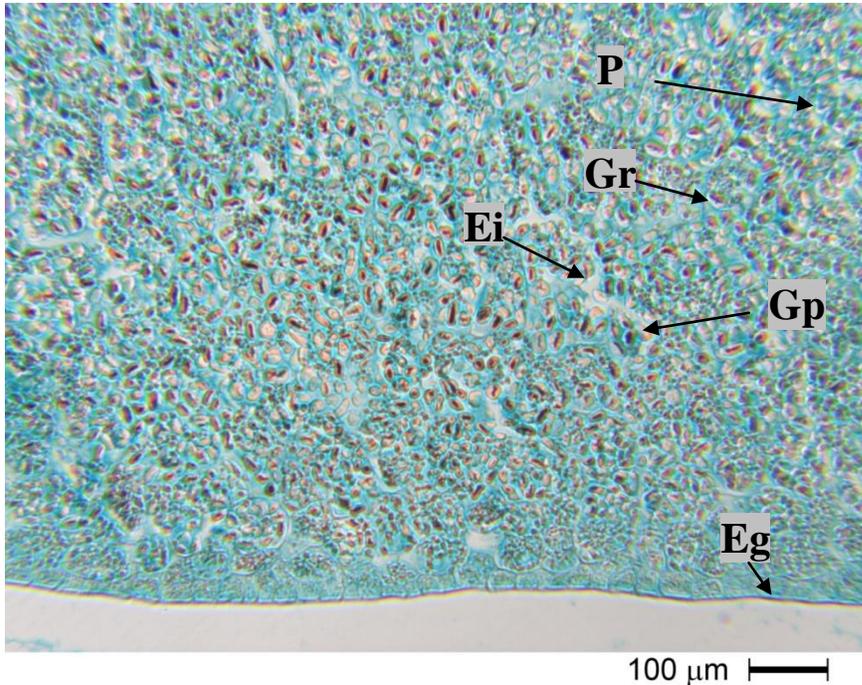


Figura 57. Gametofito femenino de reserva. A) Desde la esclerotesta hacia el interior. Ei: Espacio intercelular, Eg: Tejido epidermal del gametofito, Gp: Gránulos de reserva posiblemente proteínicos, Gr: Gránulos de reserva posiblemente almidón, Ps: parénquima de reserva del gametofito.

En la Figura 57 se observa el parénquima de reserva, las células se encuentran en diferentes etapas de la mitosis, el cromosoma se tiñó en color negro, se observan gránulos de almidón. Los canales de mucílago lo rodea un endotelio (Figura 58).

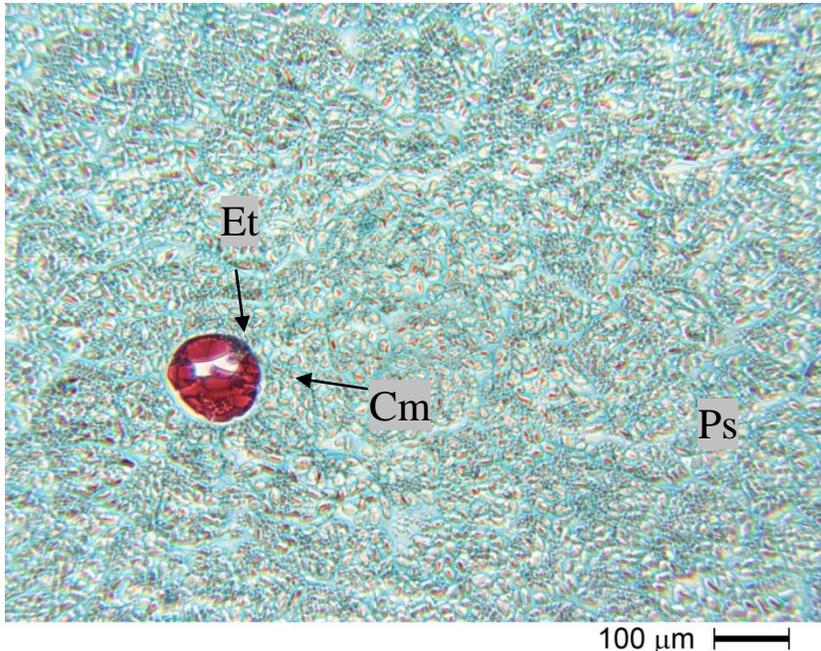


Figura 58. Canal de mucílago en el gametofito femenino de *D. merolae*. Se observan canales de mucílago que lo rodea un endotelio. Et: Endotelio, Ps: parénquima de reserva del gametofito.

3.1.5 Estructura del embrión

El embrión maduro tiene un número limitado de partes, a menudo sólo es un eje semejante a un tallo con uno o más apéndices filiformes, los cotiledones.

A dicho eje por estar situado por debajo de los cotiledones se llama hipocótilo. En el extremo inferior (polo radical) el hipocótilo presenta una raíz incipiente y en el extremo superior (el polo caulinar) el brote incipiente. La raíz puede estar constituida por un meristemo o por una raíz primordial: la radícula. Del mismo modo, el meristemo apical del brote puede haber comenzado a desarrollar el brote o no, si hay brote recibe el nombre de plúmula (Evert, 2008).

En las cícadas el embrión está constituido por dos cotiledones, entre los cuales se encuentra la plúmula (Figura 56 B). El eje consiste de hipocótilo, que se extiende del nudo cotiledonar hasta la radícula, la cual está cubierta por la coleoriza (Foster y Gifford, 1974) (Figura 60).

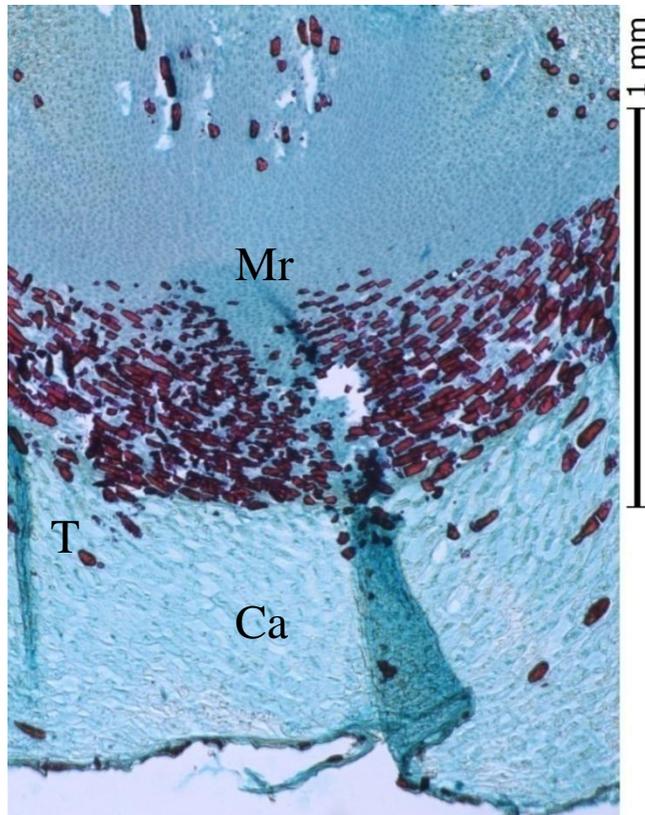


Figura 59. Embrión A) región de la caliptra y meristemo apical de la radícula. Ca: Caliptra, T: células con taninos

La región de la caliptra posee gran cantidad de taninos (Figura 59). El tanino es un metabolito secundario habitual en las células parenquimáticas, pero en algunas células lo contienen en abundancia. Estas células pueden haber aumentado notablemente su tamaño (Evert, 2008).

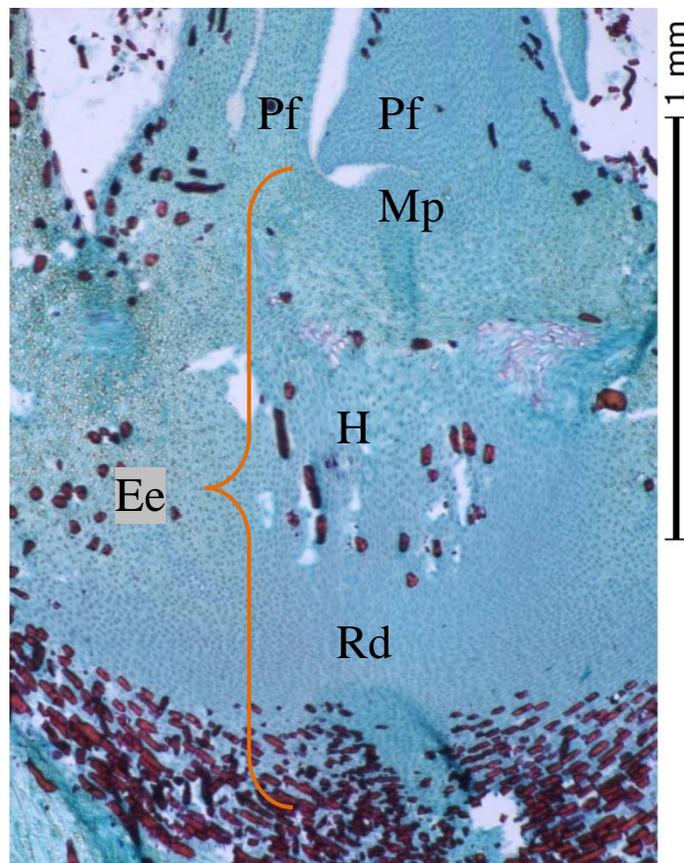


Figura 60. Meristemo apical plúmula. Ee: Eje embrionario, H: Región del hipocótilo, Mp: Meristemo apical de la plúmula Pf: Primordio foliar, Rd: Radícula

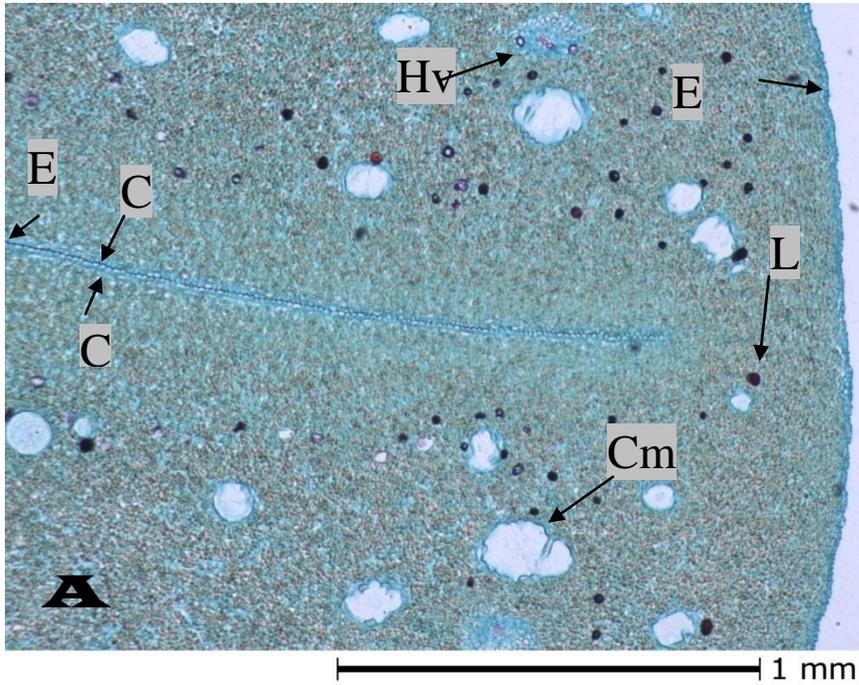


Figura 61. Anatomía del embrión hacia la región de los cotiledones. C: Cotiledón, Cm: Canal de mucílago, E: Epidermis, Hv: Haz vascular, L: Laticíferos

En la región del hipocótilo se observa una epidermis monoestratificada, hay presencia de numerosos canales de mucílago con endodermis y probablemente laticíferos. También se observa un haz vascular.

En la región del cotiledón (Figura 61) se aprecia una epidermis monoestratificada, parénquima con grandes espacios intercelulares y tejido vascular, hay canales de mucílago pero son más grandes (Figura 62) y menos abundantes que en el hipocótilo.

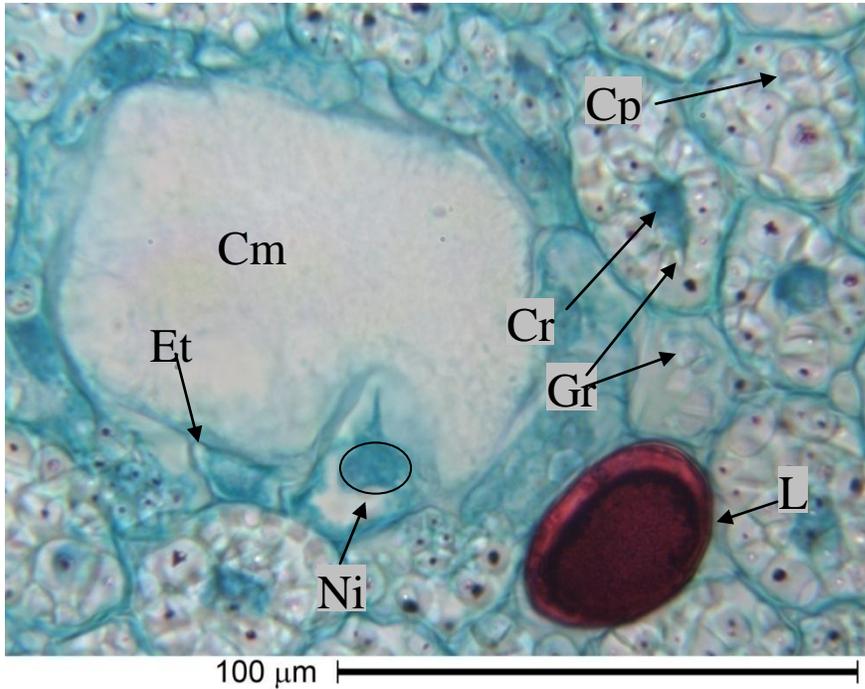


Figura 62. Acercamiento de un canal de mucílago. Cm: canal de mucílago, Cp; cristal proteico, Crm: cromosoma en metafase, Et: endotelio, Gr: Gránulos de reserva probablemente almidón, L: Laticífero, Ni: Núcleo en interfase

3.1.6 Primordios foliares

Los primordios foliolares en el embrión se encuentran con numerosos tricomas y células con taninos (Figura 63).

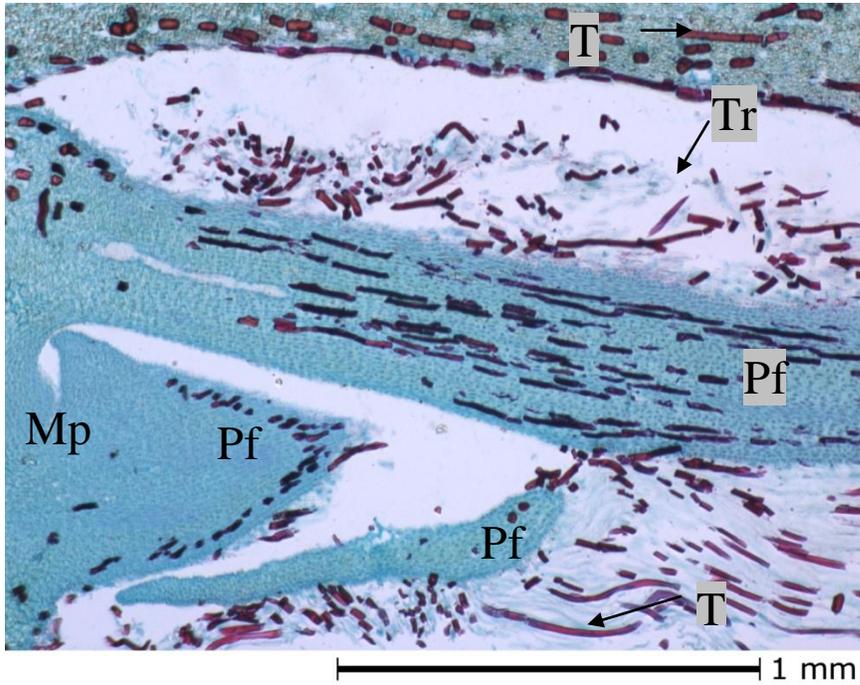


Figura 63. Primordios Foliare (región de tricomas) en el embrión.
Mp: meristemo apical de la plúmula, Pf: Primordio foliar,
Tr: Tricomas, T: Células con taninos

3.2 Plántula

En plantas vasculares, se denomina plántula a cierta etapa del desarrollo del esporófito, que comienza con la germinación y termina cuando el esporófito desarrolla sus primeras hojas verdaderas u hojas no cotiledonares. Una plántula típica (Figura 64) consiste de tres partes principales: la radícula o raíz embrionaria, el hipocótilo o tallo embrionario y los cotiledones además de una o dos de sus hojas verdaderas, por encima de los cotiledones.

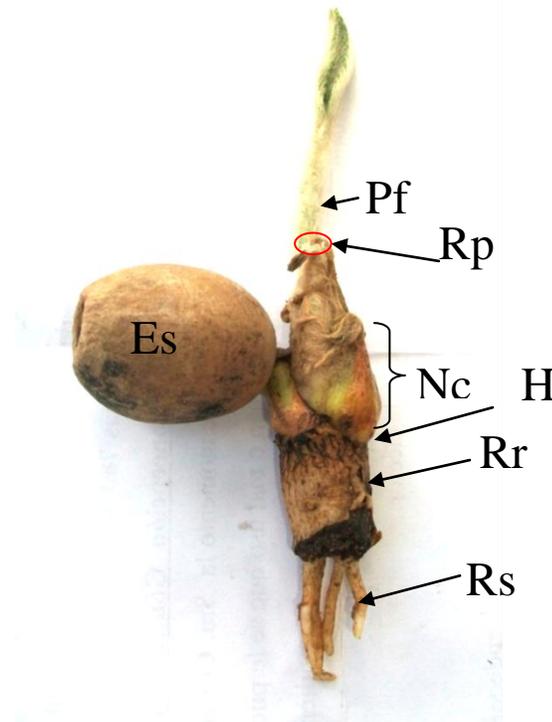


Figura 64. Plántula de *Dioon merolae* con restos de la semilla. Es: Esclerotesta, H: región del Hipocótilo, Nc: Nudo coltilledonar, Pf: Primordio foliar, Rp: Región de la plúmula, Rr: Raíz primaria, Rs: Raíz secundaria

3.2.1 Estructura de las raíces secundarias

El sistema radical primario de las cícadas es equivalente al sistema radical pivotante que se encuentra en la mayoría de las plantas. La raíz primaria de una plántula se desarrolla para formar la gran raíz principal que frecuentemente alcanza varios metros. La raíz principal de todas las cícadas es contráctil, lo cual parece ser de gran importancia para el establecimiento exitoso de las plántulas. En la etapa inicial, las plántulas son suculentas y susceptibles a ser depredadas, al fuego y a la desecación (Yáñez, 2006).

Dioon merolae se compone de una raíz primaria pivotante comúnmente muy grande, sin embargo, será tan profunda de acuerdo a las condiciones donde se desarrolle. Esta raíz es común a todos los tallos puesto que puede haber más de uno en una planta adulta. También desarrolla raíces adventicias o secundarias rápidamente durante el primer año de vida.

Además poseen un tercer tipo de raíces común en las cícadas que son apogeotrópicas o coraloides las cuales se desarrollan cuando el tallo alcanza 5 cm de longitud, crecen de modo dicotómico y también se encuentran casi expuestas a la superficie del suelo (Lázaro-Zermeño *et al.* 2012)

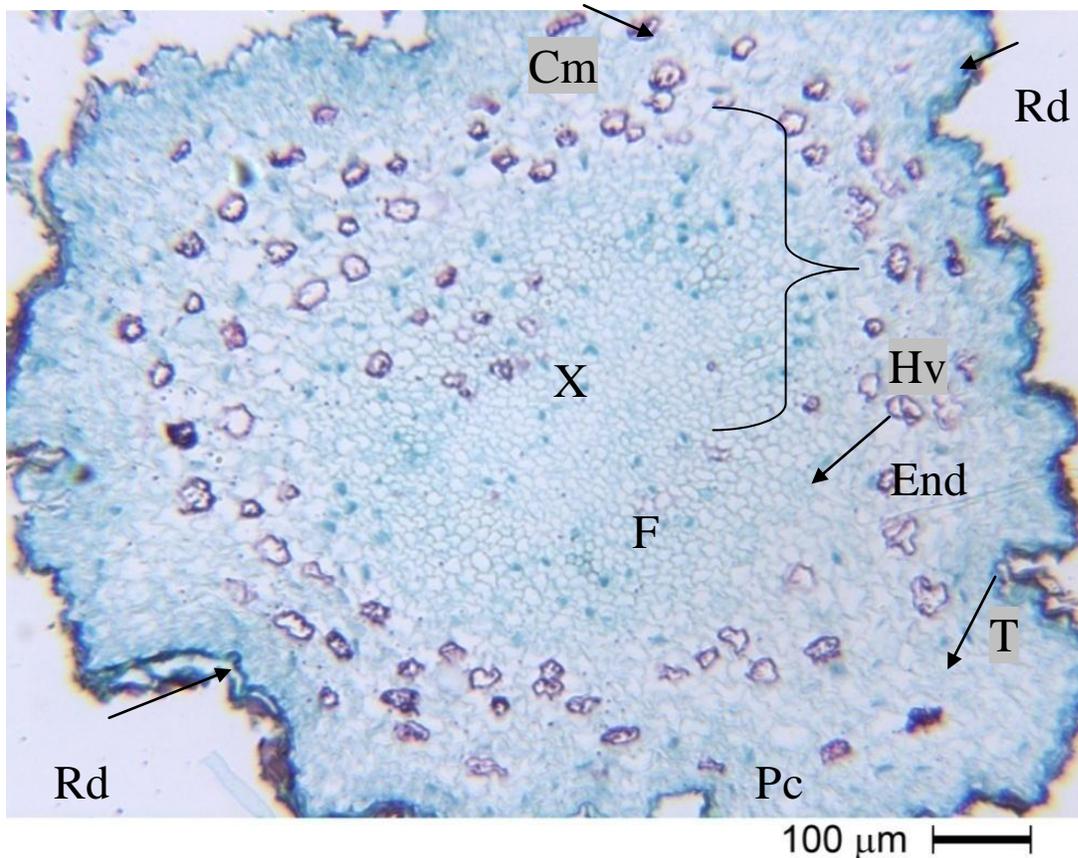


Figura 65. Sección transversal de raíz secundaria. Cm: Canal de mucílago, Hv: Haz vascular, End: Endodermis, F: Floema, Pc: Parénquima cortical en la raíz, Rd: Rizodermis, T: Células con taninos, X: Xilema primario

En la raíz secundaria (Figura 65) se observa una rizodermis delgada, corteza primaria con gran cantidad de taninos y en la zona central se observa el haz vascular.

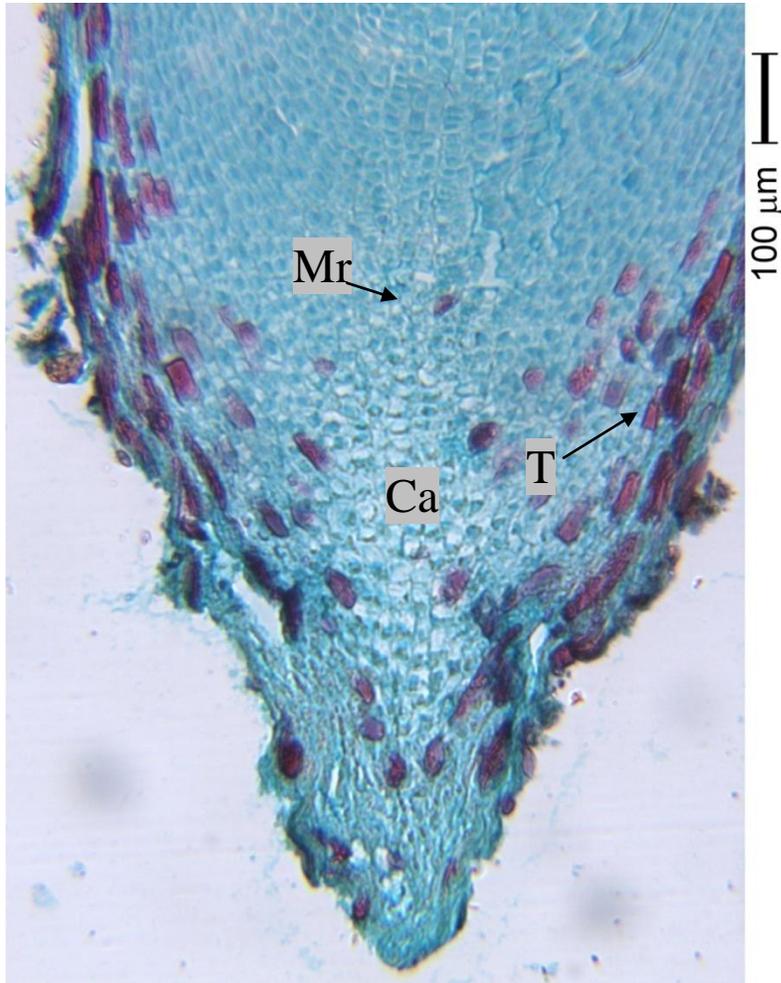


Figura 66. Región de la caliptra y del meristemo apical en una raíz secundaria. Ca: Caliptra, Mr: meristemo apical de la radícula, T: Células con taninos

La región de la caliptra (Figura 66) de la raíz secundaria con presencia de taninos y en la región de diferenciación el haz vascular (Figura 67)

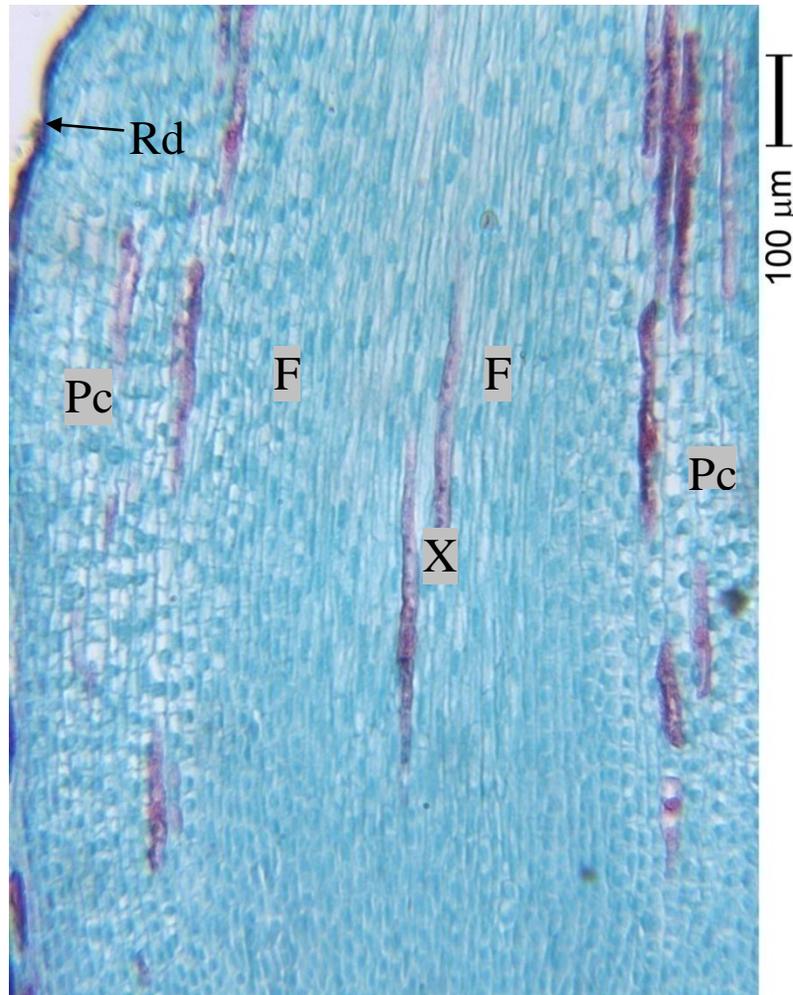


Figura 67. Región de diferenciación en una raíz secundaria. F: Floema Pc: Parénquima cortical, Rd: Rizodermis, X: Xilema primario

3.2.2 Estructura de la raíz primaria

Las raíces presentan una peridermis típica y las raíces más antiguas muestran cambium y peridermis. El primer cambium aparece apartado del xilema, de modo que en una raíz vieja él xilema primario y secundario aparecen separados. El xilema secundario es manoxilemático con abundantes radios multiseriados. Las traqueidas presentan punteaduras escalariformes y areoladas. Algunas traqueidas en la madera de la raíz tienen delicados engrosamientos en espiral peculiares (Greguss, 1955). El tejido vascular está rodeado por un periciclo con

abundante almidón en las células. Le sigue hacia afuera la endodermis con bandas de Caspari típicas, un córtex parenquimatoso amplio y una epidermis. Células con contenido café oscuro (taninos) están dispersas por todas partes. También se encuentran drusas o cristales romboidales aisladas o en series longitudinales (Bisswas y Johri, 1997)

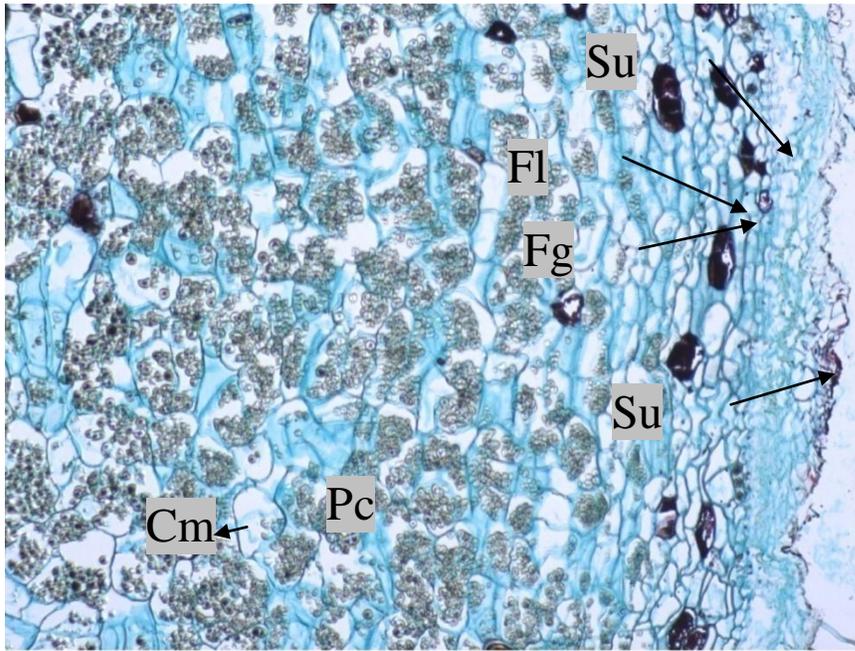


Figura 68. Sección longitudinal de raíz primaria con corteza secundaria.
Cm: canal de mucílago, Fg: Felógeno, Fl: Felodermis, Pc: parénquima cortical, Su: Suber

La raíz primaria (Figura 68) presenta una rizodermis gruesa, parénquima cortical con grandes espacios celulares y tejido vascular central (Figura 69) con canales de mucílago.

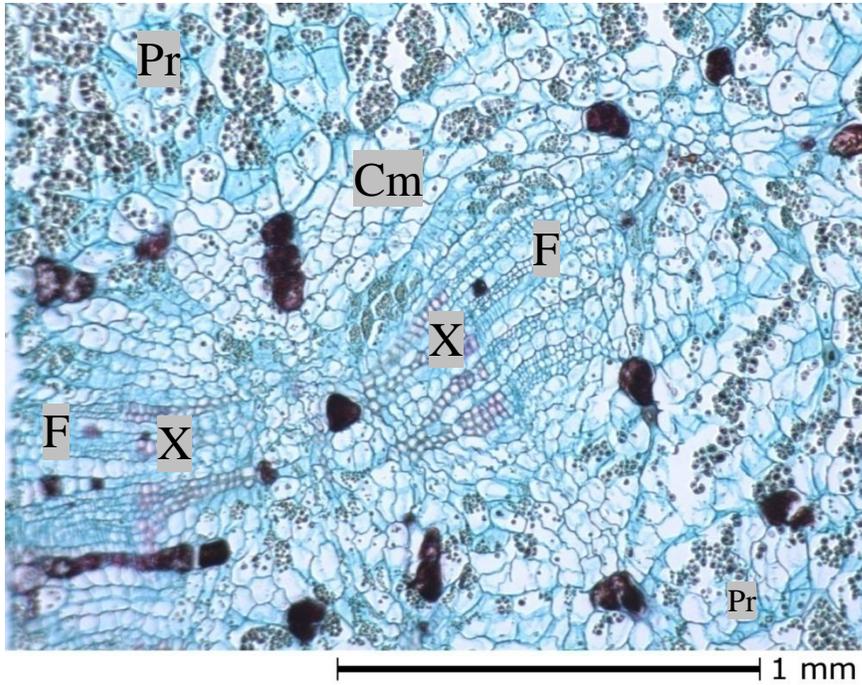


Figura 69. Tejido vascular central de raíz primaria de *Dioon merolae*.
Cm: canal de mucílago F: Floema primario, Pr: parénquima de reserva, X: Xilema primario

3.2.3 Tallo de la plántula (Hipocótilo)

Las cícadas poseen un tallo leñoso que debido a su escaso crecimiento secundario por lo general, tienen el mismo ancho desde el ápice hasta la base (Yáñez, 2006). *Dioon merolae* es una especie de madera blanda con radios amplios, llamada manoxilemática, muy longeva, arborescente, con uno o varios troncos (González-Espinosa *et al.* 2012)

Las cícadas que desarrollan tallos columnares presentan el mismo ancho desde el ápice hasta la base, en forma parecida al crecimiento de las palmas. El desarrollo del crecimiento radial es un meristemo de engrosamiento primario en la región estelar del nodo cotiledonar de la plántula que produce derivados principalmente centrífugos. Este se desarrolla en sentido acropetal y llega a ser continuo en la zona periférica del ápice. Al principio es un cilindro vertical, pero conforme la planta continúa su crecimiento hasta ser planta adulta, demuestra una orientación horizontal (como un paraguas abierto) y produce un córtex amplio hacia el exterior. Los elementos del cambium vascular que se diferencian subsecuentemente en tejidos vasculares de las trazas foliares también se originan en esta área. El crecimiento secundario

genera un cambium vascular que produce el xilema secundario al interior y el floema secundario al exterior. La médula se origina de los derivados del meristemo apical (Stevenson, 1980).

El tallo es paquicaule, es decir grueso y esponjoso, constituido de un medula central grande y córtex grueso, con poco xilema. Los canales de mucílago son abundantes en el córtex grueso, con poco xilema (Figura 70). Los canales de mucílago son abundantes en el córtex y en la médula. Las trazas foliares están situados en el córtex. La cantidad producida de tejidos vasculares secundarios es pequeña y el xilema es atravesado por numerosos radios medulares anchos que conectan la médula con el córtex (Stevenson, 1980).

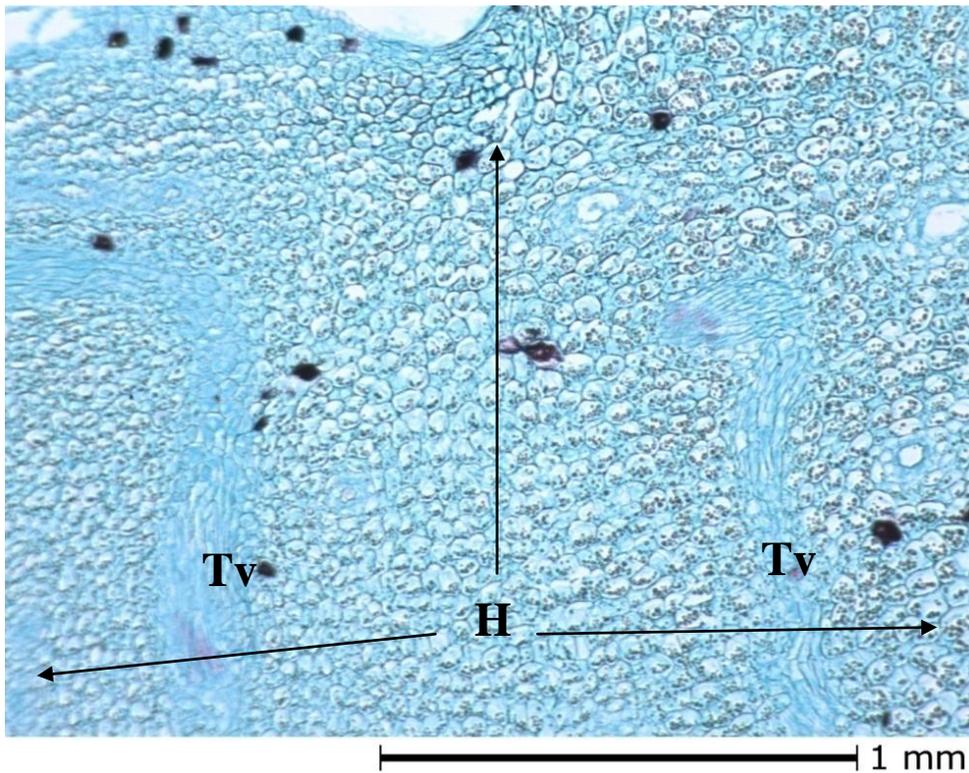


Figura 70. Tejido vascular hacia las hojas en el hipocótilo. H: Región hacia el hipocótilo. Tv: Tejido Vascular

3.2.4 Estructura de la hoja

Las hojas de *Dioon merolae* son pinadas de color verde oscuro, pueden alcanzar más de 1.5 m de longitud cuando están maduras. La primera hoja cuando esta joven puede llegar a medir hasta 25 cm (lamina de 15 cm y peciolo de 10 cm) con 22 a 25 pares de foliolos (Figura 71 y 72).

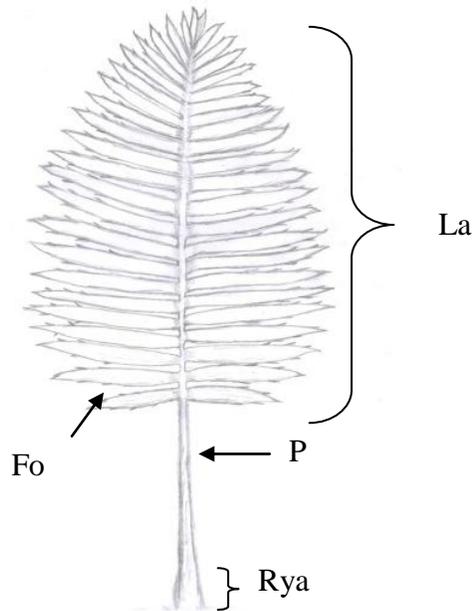


Figura 71 Esquema de una hoja joven de *Dioon merolae* (Por J. M. Chamé G.) Fo: Foliolo, La: Lamina, P: Peciolo, Rya: Región de la yema axilar

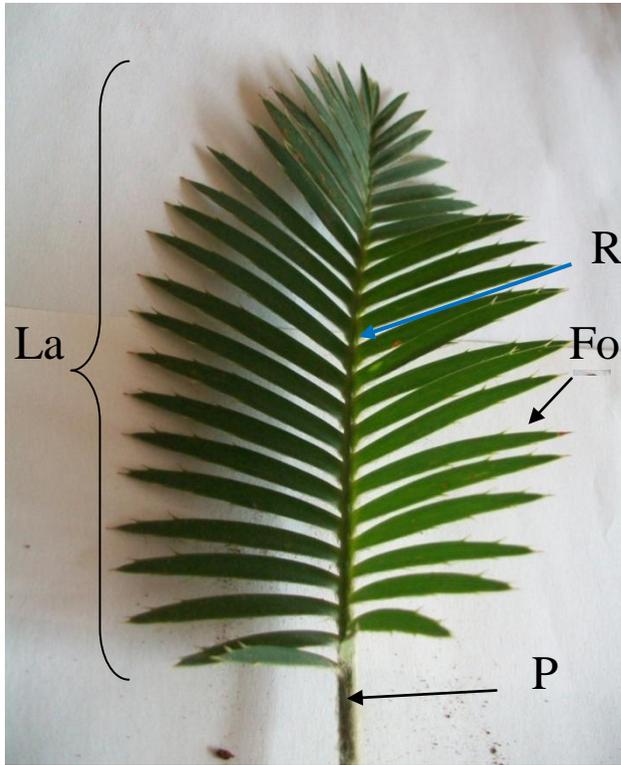


Figura 72. Hoja joven de *Dioon merolae* (un año de edad), región apical. Fo: Foliolo, La: Lamina, P: Pecíolo, R: Raquis.

La hoja tiene una cutícula fuerte, epidermis y la hipodermis bajo la epidermis superior, ambas con paredes engrosadas y esclerificadas. El mesófilo consiste de un estrato superior de parénquima en empalizada y uno inferior de parénquima esponjoso.

La vaina del haz vascular (endodermis) está formada por estratos compactos de células con paredes engrosadas que rodean a los haces vasculares. El haz vascular presenta un área casi triangular de xilema centripeto con una región de protoxilema y un arco de traqueidas o xilema primario centrifugo asociado con el floema (Yáñez, 2006).

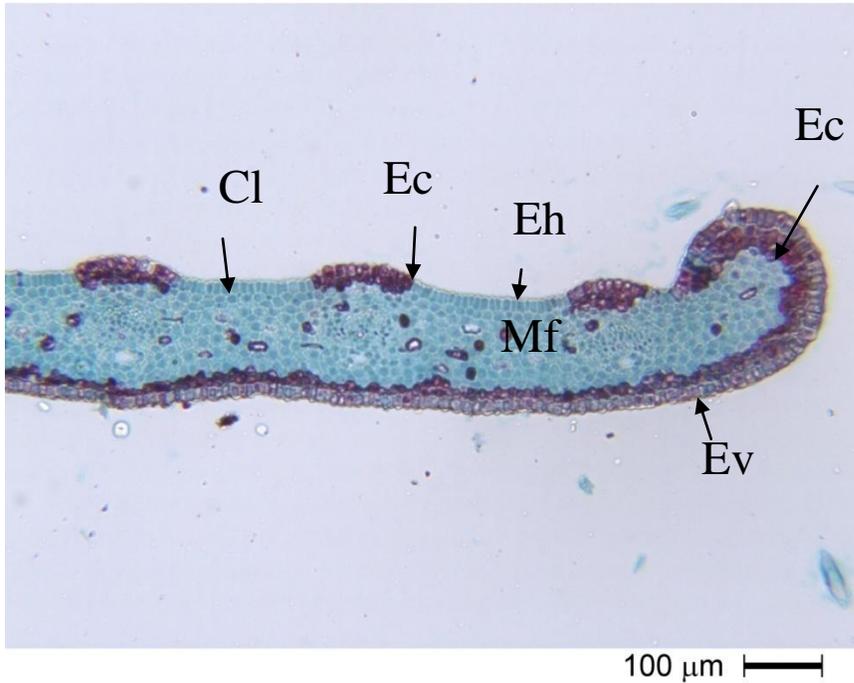


Figura 73. Corte transversal de foliolo joven. Cl: clorénquima, Ec: Esclerénquima, Eh: Epidermis de la haz, Ev: Epidermis del envés, Mf: Mesófilo de la hoja

En el foliolo joven se observa una epidermis cubierta por una gran cantidad de taninos en la haz y en el envés. No se distinguen el parénquima en empalizada y parénquima esponjoso, se generaliza como el mesófilo de la hoja (Figura 73 y 74).

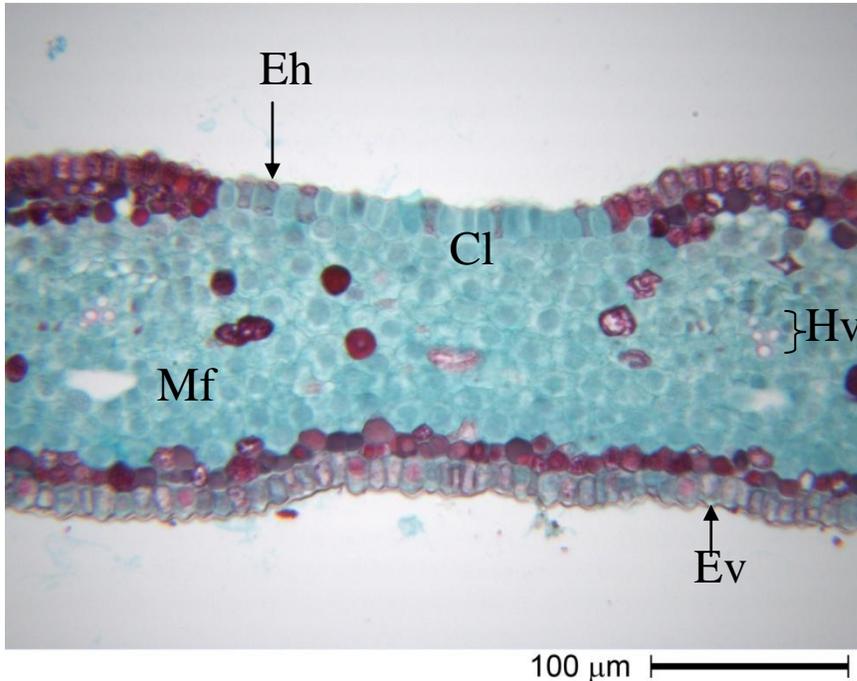


Figura 74. Acercamiento de foliolo joven. Cl: clorénquima, Ec: Esclerenquima, Eh: Epidermis de la haz, Ev: Epidermis del envés, Hv: Haz vascular, Mf: Mesófilo de la hoja

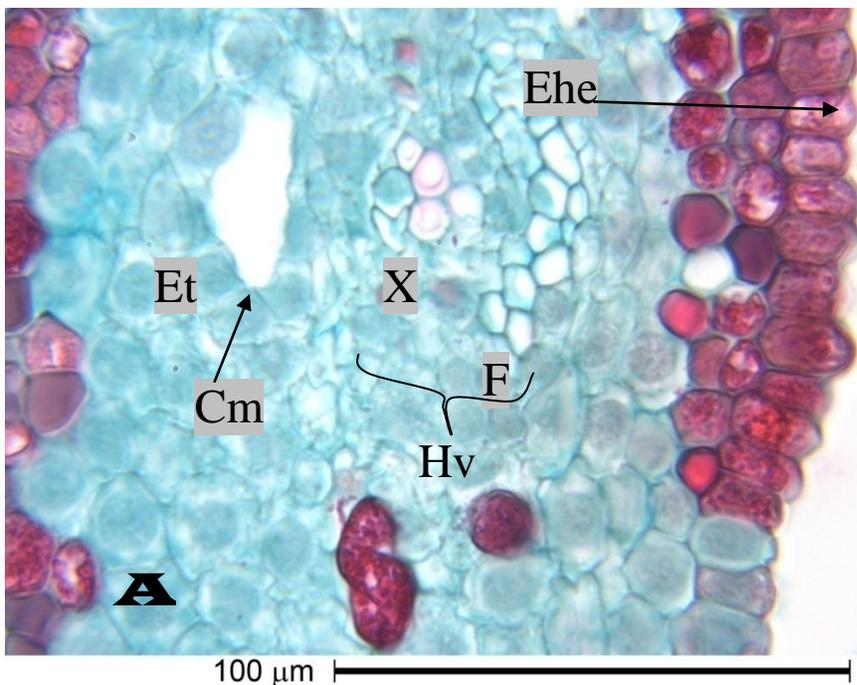


Figura 75. Tejido vascular de un foliolo de *Dioon merolae*. Floema hacia la haz. Cm: Canal de mucilago, Et: endotelio, Ehe; Epidermis de haz esclerificada, F: Floema primario, H: Haz vascular, Mf: Mesófilo de la hoja, X: Xilema primario.

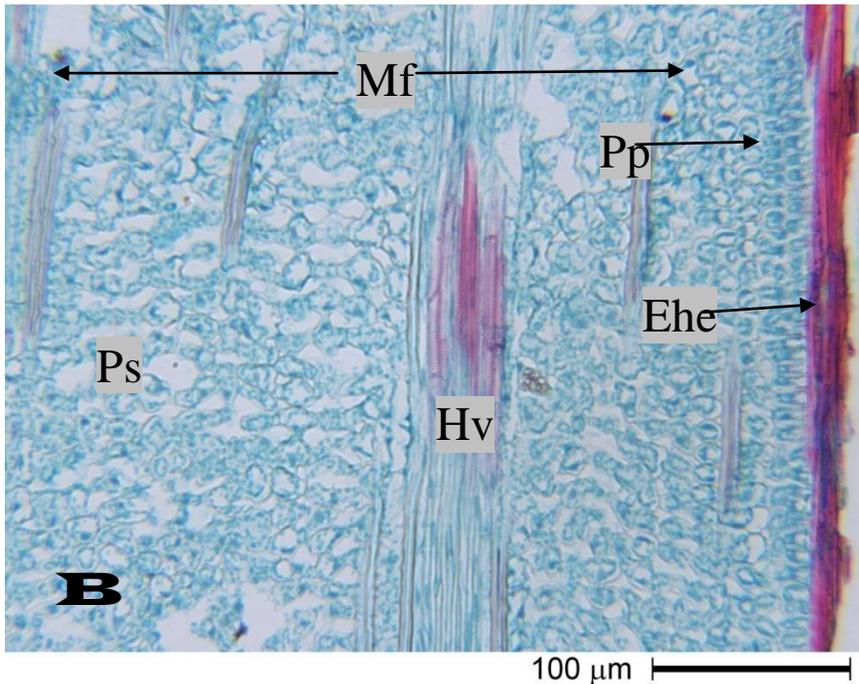


Figura 76. Epidermis de la has esclerificada, Parénquima en empalizada y parénquima esponjoso de foliolo maduro. Ehe; Epidermis de haz esclerificada, H: Haz vascular, Mf: Mesófilo de la hoja Pp: parénquima en empalizada, Ps: Parénquima esponjoso

En el foliolo maduro se distinguen el parénquima en empalizada y parénquima esponjoso entre el mesófilo de la hoja con canales de mucílago con endotelio y una epidermis esclerificada y gruesa (Figura 75 y 76). En estos cortes no se detectó la presencia de estomas.

La mayoría de los representantes existentes de cícadas se observan estomas hundidos por lo general sólo en la parte inferior de las láminas (Acuña y Marín, 2013a), sin embargo se ha reportado en *Zamia disodon* y *Z. restrepoi* la presencia de estomas tanto en la superficie abaxial como en la adaxial posiblemente puede deberse a la elevada humedad del hábitat donde se encuentran. (Acuña y Marín, 2013b).

4 CONCLUSIONES

La sarcotesta de *Dioon merolae* es amarilla al madurar y posteriormente va adquiriendo un color café muy brillante, la textura es carnosa y al madurar está cubierta de mucilago. Al secarse, las semillas quedan lisas al tacto. La forma de la semilla es regularmente redondeada aunque algunas pueden ser de forma ovoide. Suelen medir hasta 3 cm de diámetro aproximadamente. Se puede observar perfectamente la región del micrópilo y la región del hilio. Anatómicamente la sarcotesta se compone de una epidermis que puede estar formada por dos o tres estratos, el parénquima presenta grandes espacios celulares y se pueden encontrar cristales. Las células parenquimáticas son más pequeñas que las epidérmicas, además se pueden encontrar estomas.

La esclerotesta se compone de una diversidad de esclereidas y fibroesclereidas, solitarias, ramificadas y en paquetes. Mientras el gametofito femenino tiene una epidermis monoestratificada, con gránulos de reserva de dos tipos posiblemente proteínicos, otros posiblemente de almidón y canales de mucílago.

El embrión consta de dos cotiledones. La región de la caliptra posee gran cantidad de taninos mientras en la región del hipocótilo se observa una epidermis monoestratificada, hay presencia de numerosos canales de mucílago con endodermis y probablemente laticíferos. También se observa un haz vascular. Los primordios foliolares en el embrión se encuentran con numerosos tricomas y células con taninos.

La raíz primaria posee una rizodermis gruesa, parénquima cortical con grandes espacios celulares. En la raíz secundaria se observa una rizodermis delgada, corteza primaria con gran cantidad de taninos y en la zona central se observa el haz vascular. El tallo es leñoso de madera manoxilemática.

Las hojas de *Dioon merolae* son pinadas de color verde oscuro, pueden alcanzar más de 1.5 m de longitud cuando están maduras. La primera hoja cuando esta joven puede llegar a medir hasta 25 cm (lamina de 15 cm y peciolo de 10 cm) con 22 a 25 pares de foliolos. La cutícula

es fuerte, epidermis y la hipodermis bajo la epidermis superior, ambas con paredes engrosadas y esclerificadas. El mesófilo consiste de un estrato superior de parénquima en empalizada y uno inferior de parénquima esponjoso. En el foliolo cuando joven se observa una epidermis cubierta por una gran cantidad de taninos en la haz y en el envés. El parénquima en empalizada y parénquima esponjoso, se generaliza como el mesófilo de la hoja y sólo se distinguen cuando está maduro, en este momento se diferencian entre el mesófilo con canales de mucílago con endotelio y una epidermis esclerificada y gruesa. En estos cortes no se detectó la presencia de estomas.

5 LITERATURA CITADA

- Acuña C. R. and W. Marin M. 2013a. Comparative anatomy of leaflets of *Zamia acuminata* and *Z. pseudomonticola* (Zamiaceae) in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.)* Vol. 61 (2): 539-546
- Acuña C. R. y W. Marin M. 2013b. Leaflet anatomy of *Zamia disodon* d.w. Stev. & sabato and *Z. Restrepoi* (d.w. Stev.) A. Lindstr. *Caldasia* Vol. 35(1):1-9
- Bisswas C. and B.M Johri. 1997. The gymnosperms. Springer-verlag. Narosa publishing house. Berlin, Germany. 494 p.
- Bold H. C., C.J. Alexopoulos, y T. Delevoryas. 1989. Morfología de las plantas y los hongos. Ed. Omega Barcelona, España. 911 p.
- Dehgan B., and C.R Johnson. 1983. Improved seed germination of *Zamia floridana* (sensu lato) with H₂SO₄ and GA₃ *Scientia Horticulturae, Vol. 19, Issues 3–4: 357-361*
- Dehgan, B., and B. Schutzman, (1989). Embryo development and germination of *Cycas* seeds. *Journal of the American Society for Horticultural Science* Vol 114(1):125-129.
- Evert R. F. 2008. Esau anatomía vegetal meristemas, células y tejidos de las plantas: Su estructura, función y desarrollo. Editorial: OMEGA. Barcelona, España. 614 pag.
- Foster A. S., and Gifford E.M., 1974. Comparative morphology of vascular plants. Second edition, Freeman and company. San Francisco, CA, USA. pp. 406- 440
- González-Espinosa M., B.A. Pérez-Espinosa, y N. Ramírez-Marcial. 2012. Distribución espacial y respuesta fototrópica de *Dioon merolae* (Zamiaceae) en poblaciones relictuales del centro de Chiapas, México. *Botanical Sciences* 90 (1): 63-72

- Greguss P. 1955. Identification of living gymnosperms on the basis of xyotomy. Akadémiai Kiadó, Budapest. 260 p.
- Instituto Nacional de Ecología (INE) 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994. SEDESOL, México. 66 p.
- Nicolalde-Morejón F., J. González-Astorga, F. Vergara-Silva, D. W. Stevenson, O. Rojas-Soto, y A. Medina-Villarreal. 2013. Biodiversidad de Zamiaceae en México. Revista Mexicana de Biodiversidad 84: 1-12
- Sánchez-Tinoco, M. Y. y E. M. Engleman, 2004. Seed coat anatomy of *Ceratozamia mexicana* (Cycadales). The Botanical Review. Vol: 70 (1): 24-38
- Stevenson D. W. 1985. Radial growth in the cycadales. American Journal of Botany 67: 465-475
- Stevenson, D. W. 1990. Morphology and systematics of the Cycadales. Memoirs of the New York Botanical Garden. 57: 8-55.
- Yáñez E. L. 2006. Las cycadas: Biología y conservación en México. División de ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo. 208 p

CONCLUSIONES GENERALES

Para mejorar la tasa de germinación de *Dioon merolae* es importante eliminar la latencia de la semilla provocada principalmente por la esclerotesta de la semilla para ello el método de escarificación más eficaz es la fractura de la esclerotesta. La aplicación de la hormona brasinoesteroide CIDEF-4 disuelta en una dosis 100 mg L^{-1} en remojo durante 48 horas, no influye significativamente en la germinación de esta cícada.

Por el método *in vitro* la germinación de *Dioon merolae* es posible utilizando gametofitos femeninos completamente maduros como explantes en el medio de cultivo SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) adicionado con vitaminas e inositol). La concentración de sales en el medio de cultivo SH no afectan significativamente la germinación *in vitro* pero en una concentración del 25 % puede prolongarse el tiempo de respuesta. El inicio de la germinación (emergencia de la radícula) se presenta en los primeros 30 días después de la siembra.

A partir de estudios morfo-anatómicos realizados a *Dioon merolae* se observó que la esclerotesta se compone de una diversidad de esclereidas y fibroesclereidas, solitarias, ramificadas y en paquetes. Mientras el gametofito femenino tiene una epidermis monoestratificada, con gránulos de reserva de dos tipos posiblemente proteínicos, otros posiblemente de almidón y canales de mucílago.

El embrión consta de dos cotiledones. La región de la caliptra posee gran cantidad de taninos mientras en la región del hipocótilo se observa una epidermis monoestratificada, hay presencia de numerosos canales de mucílago con endodermis y probablemente laticíferos. Los primordios foliolares en el embrión se encuentran con numerosos tricomas y células con taninos.

La raíz primaria posee una rizodermis gruesa, parénquima cortical con grandes espacios celulares. En la raíz secundaria se observa una rizodermis delgada, corteza primaria con gran

cantidad de taninos y en la zona central se observa el haz vascular. El tallo es leñoso de madera manoxilemática.

Las hojas de *Dioon merolae* son pinadas de color verde oscuro, pueden alcanzar más de 1.5 m de longitud cuando están maduras. La primera hoja cuando esta joven puede llegar a medir hasta 25 cm (lamina de 15 cm y peciolo de 10 cm) con 22 a 25 pares de foliolos. La cutícula es fuerte, epidermis y la hipodermis bajo la epidermis superior, ambas con paredes engrosadas y esclerificadas. El mesófilo consiste de un estrato superior de parénquima en empalizada y uno inferior de parénquima esponjoso. En el foliolo cuando joven se observa una epidermis cubierta por una gran cantidad de taninos en la haz y en el envés. El parénquima en empalizada y parénquima esponjoso, se generaliza como el mesófilo de la hoja y sólo se distinguen cuando está maduro, en este momento se diferencian entre el mesófilo con canales de mucílago con endotelio y una epidermis esclerificada y gruesa.