



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
División de Estudios de Posgrado**

**EMBRIOGENESIS SOMATICA A PARTIR DE FOLIOLOS JO-  
VENES DE PLANTAS MADURAS DE CERATZAMIA  
MEXICANA VAR. ROBUSTA (MIQ.) DYER (ZAMIACEAE)  
ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCION.**

**T E S I S**  
que para obtener el grado académico de  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
( Biología )  
p r e s e n t a  
**VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA**

Director de Tesis:  
**DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS**

México, D. F.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Somatic Embryogenesis from young pinnae of mature plants of Ceratozamia mexicana var. robusta (Miq.) Dyer (Zamiaceae)  
Endangered Species.

Victor Manuel Chávez Avila

Embryogenic callus was induced from explanted pinnae of newly emerged leaves of mature plants of Ceratozamia mexicana var. robusta (Gymnospermae, Cycadales) on a modified B5 formulation with 1 mg/l Kinetin and 1 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Proembryos developed on induction medium, but they were more numerous after subculture onto phytohormone-free medium, which also enabled suspensors to elongate. Somatic embryos with two cotyledons developed at the distal end of the suspensors, and germinated on phytohormone-free medium. In histological sections the bipolarity of the somatic embryos was confirmed, there was an apical meristem, a radicular pole and vascular tissue without connection with the callus. In order to determine whether a relationship exists between ethylene emanation and somatic embryogenesis of this species, measurements of ethylene were made in flasks containing differentiating tissue. Lower concentrations of ethylene were observed in embryogenic cultures on media without Kinetin and 2,4-D than in cultures on media with these growth regulators. This study contains the first report of somatic embryogenesis from adult material of any gymnosperm. The procedure has potential for propagation, conservation and improvement of cycads, species in great danger of extinction.

V. M. C. A.



## INDICE

ABREVIATURAS	
RESUMENES	
I. INTRODUCCION	1 PAG.
1. Diversidad Biológica	2
2. Pérdida de la Diversidad Biológica	4
3. Cícadas	8
4. Protección de la Diversidad Biológica	17
5. Cultivo de Tejidos Vegetales	18
6. Embriogénesis Somática	21
a) Coníferas	33
i) desarrollo del embrión somático	38
ii) desarrollo del embrión cigótico	40
7. Morfogénesis <u>in vitro</u> en Cícadas	41
i) desarrollo del embrión cigótico	46
8. OBJETIVOS	49
II. MATERIALES Y METODOS	50
III. RESULTADOS	59
IV. DISCUSION	86
V. FIGURAS	120
APÉNDICE	132
<u>Ceratozamia</u> Brongn.	
<u>Ceratozamia mexicana</u> Brongn.	
VI. BIBLIOGRAFIA	136

#### ABREVIATURAS

ABA	Acido abscísico
ANA	Acido naftalenacético
BA	6-Bencilaminopurina
B5	Medio de cultivo Gamborg, Miller y Ojima, 1968
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora  Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
2,4-D	Acido 2,4 - Diclorofenoxiacético
IUCN	International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources  Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales.
K	Kinetina, 6-Furfurilaminopurina
MS	Medio de Cultivo Murashige y Skoog (1962)
NAS	National Academy of Sciences

Embriogénesis Somática a partir de Folíolos Jóvenes de Plantas Maduras de Ceratozamia mexicana var. robusta (Miq.) Dyer (Zamiaceae) Especie en Peligro de Extinción.

En este estudio se logró inducir callo embriogénico a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de Ceratozamia mexicana var. robusta en medio nutritivo B5 modificado, adicionado de 1 mg/L de Kinetina (K) y de Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Se desarrollaron proembriones en este medio de inducción pero fueron más numerosos después del subcultivo a medio sin hormonas, lo cual permitió el crecimiento de los suspensores y en el extremo distal de éstos se desarrollaron embriones con dos cotiledones. Los cuales germinaron en el medio sin reguladores del crecimiento. Mediante cortes histológicos se comprobó la identidad de los embriones al identificarse un meristemo apical, uno radicular y tejido vascular sin conexión con el callo. Debido a que se ha encontrado que existe una relación entre el etileno y las respuestas morfogénicas de tejidos cultivados in vitro se efectuaron mediciones de este gas en los frascos de cultivo de C. mexicana hallándose una menor concentración de éste en cultivos embriogénicos en medios sin K ni 2,4-D que en aquellos donde estuvieron presentes. Hasta donde sabemos, este trabajo es el primer informe de regeneración por embriogénesis somática a partir de una planta adulta de una especie de gimnosperma. La técnica tiene el potencial para la propagación, conservación y aprovechamiento de las cícadas, especies en gran riesgo de extinción.

Somatic Embryogenesis from young pinnae of mature plants of Ceratozamia mexicana var. robusta (Miq.) Dyer (Zamiaceae) Endangered Species.

Embryogenic callus was induced from explanted pinnae of newly emerged leaves of mature plants of Ceratozamia mexicana var. robusta (Gymnospermae, Cycadales) on a modified B5 formulation with 1 mg/l Kinetin and 1 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Proembryos developed on induction medium, but they were more numerous after subculture onto phytohormone-free medium, which also enabled suspensors to elongate. Somatic embryos with two cotyledons developed at the distal end of the suspensors, and germinated on phytohormone-free medium. In histological sections the bipolarity of the somatic embryos was confirmed, there was an apical meristem, a radicular pole and vascular tissue without connection with the callus. In order to determine whether a relationship exists between ethylene emanation and somatic embryogenesis of this species, measurements of ethylene were made in flasks containing differentiating tissue. Lower concentrations of ethylene were observed in embryogenic cultures on media without Kinetin and 2,4-D than in cultures on media with these growth regulators. This study contains the first report of somatic embryogenesis from adult material of any gymnosperm. The procedure has potential for propagation, conservation and improvement of cycads, species in great danger of extinction.

## INTRODUCCION

La conservación de la biodiversidad - la suma total de genes, especies y ecosistemas - es una meta urgente de alcanzar para frenar la pérdida que está ocurriendo de miles de especies silvestres antes de que a consecuencia de esta situación el hombre mismo se convierta también en especie en peligro de extinción.

La demanda mundial de productos vegetales se incrementará en las próximas décadas así como las necesidades ecológicas de reforestación por lo que es necesario producir plantas en suficiente cantidad y con las características que respondan a tal demanda.

La propagación vegetativa a través del cultivo de tejidos ha permitido propagar especies agrícolas y agronómicas, sin embargo aún hay muchas variedades de éstas y grupos vegetales como las gimnospermas donde el éxito ha sido limitado.

La embriogénesis somática tiene el potencial para convertirse en un método eficiente para la multiplicación y el estudio del desarrollo de los vegetales. Sin embargo, a pesar de la intensa experimentación con gimnospermas (coníferas), a la fecha sólo se han logrado inducir cultivos embriogénicos derivados de tejidos embrionarios, por lo que resulta necesario obtener un método aplicable a partir de estructuras somáticas que permitirían la propagación clonal de genotipos selectos y la conservación de especies como las cícadas, con atributos botánicos únicos, pero con enormes problemas de sobrevivencia en la naturaleza y limitada capacidad de propagación.



**DIVERSIDAD BIOLÓGICA**

Actualmente se considera que han sido catalogadas 1.4 a 2 millones de especies de organismos de una cantidad usualmente estimada en 4 - 30 millones de distintas formas de vida con las que compartimos el planeta, (Cloud, 1983; Anónimo, 1988; Wilson, 1989).

En las regiones tropicales las cuales cubren sólo el 6-7% de la superficie de la Tierra habitan aproximadamente 50 - 80% de los organismos del mundo (Myers, 1979 citado por Wilson, 1989; Janzen citado por Linden, 1989; Wilson, 1989). Este ecosistema es el más rico en diversidad biológica, el más complejo pero también el más frágil en cuanto al mantenimiento de su equilibrio entre poblaciones y comunidades que lo integran.

En México debido a su posición geográfica, a su topografía, climas y sus cambios en tiempo geológico se ha desarrollado una gran diversidad biológica (Lot y Toledo, 1980, citados por Davis *et al.*, 1986; Toledo, 1988), considerada cuarto lugar en el mundo (WWF, 1987, citado por Vovides, 1989), con 20,000 a 30,000 especies de plantas vasculares (Rzedowski, 1978; Rzedowski, 1978 citado por Toledo, 1988), que incluyen 3,573 especies endémicas (IUCN citado por Toledo, 1988) muchas de ellas de las regiones tropicales entre las que se encuentran más de la mitad de las especies de cícadas que existen en nuestro país.

La flora de México sobrepasa la de países mayores que el nuestro, las 18,000 especies reportadas en los Estados Unidos; las 20,000 en la ex-Unión Soviética; las 26,000-30,000 en China (Lawesson, 1987; Toledo, 1988). Tan sólo en Veracruz se han estimado 8,000-

9,000 especies de plantas vasculares en tanto que en Gran Bretaña reportan 1,600; en Chiapas se han inventariado 8,248 mientras que toda la flora de Europa llega a 12,000 especies (Toledo, 1988; Vovides, 1989) y el archipiélago de Japón reporta 4,000 (Milliken, 1987).

Pero la misma notoriedad que el país alcanza por su potencial florístico también lo distingue el volumen y ritmo de destrucción del mismo. Y al igual que en la mayoría de los países no obstante que hay interés por preservar la diversidad biológica, en el proceso de aprovecharla la estamos destruyendo.

Por desgracia las alteraciones y la pérdida del equilibrio en la naturaleza están ocurriendo a una gran velocidad, que rebasa la capacidad de los sistemas biológicos para restablecer su orden natural. En forma lamentable son distintas actividades del hombre las que han puesto en serio peligro de extinción, prácticamente a todas las formas de vida del planeta (Ehrlich y Wilson, 1991).

Entre tales actividades las más directas y dañinas están:

- El incremento poblacional.
- Deforestación debida a la tala y quema desmedida de bosques y selvas para ampliar las áreas agrícolas, ganaderas y urbanas.
- Contaminación de suelos, cuerpos de agua y atmósfera por desechos industriales y la quema de combustibles fósiles
- Aprovechamiento de un número muy limitado de cultivos de uso alimenticio, medicinal y en otras industrias.
- Desconocimiento de las propiedades y beneficios que se podrían obtener de las plantas hasta ahora consideradas sólo malezas y parte del paisaje.

- Saqueo y tráfico ilegal de plantas y animales colectados de poblaciones silvestres.

**- Pérdida de la Diversidad Biológica.**

Grandes áreas de la vegetación natural están desapareciendo en todos los biomas, sin embargo, la deforestación es por mucho más devastadora sobre los bosques tropicales, los cuales ya han sido disminuidos a un 55% de su extensión original (Wilson, 1989). Reid (1992) señala que la deforestación tropical alcanza 17 millones ha/año, es decir, más de 30 ha/min, con lo cual 5-10% de las especies en los bosques tropicales se habrán extinguido en 30 años. Otras proyecciones señalan que para el año 2100 habrán desaparecido casi todos los bosques tropicales fuera de las áreas protegidas de la naturaleza (Houghton, 1990 citado por Soulé, 1991). En México, de acuerdo a cifras oficiales, se destruye una hectárea/min (Vovides, 1989).

El comercio ilegal es una amenaza mayor para muchas especies a pesar de las legislaciones nacionales e internacionales como son las regulaciones de CITES. Vovides (1989) cita el caso en que un millón de plantas entre orquídeas, cactáceas y cícadas fueron exportadas ilegalmente desde nuestro país (Tabla 1), esta situación por desgracia es muy común en México no obstante que las especies animales y vegetales están sujetas a un régimen de preservación, restauración y protección ordenada por la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección del Medio Ambiente (SEDUE, 1991c); además de las disposiciones de CITES, de la cual nuestro país ya es miembro a partir de 1991 (SEDUE,

1991b).

Tabla 1. Exportaciones ilegales de cícadas y otras plantas, desde México

Año	Cantidad	Referencia
1977 a 1982	ca. 130,000	Vovides, 1989
1978	1,000,000 Orquídeas	"
	Cactáceas, Cícadas	"
1979	6,503	"
1980	12,391	"
1980	30,000 c/mes	Gilbert, 1984
1981	30,000 c/mes	Tang, 1985a*
1981	102,126	Vovides, 1989
1982	7,199	Fuller, 1985
1983	25,000	Tang, 1983*
1985 a 1986	5,000	Vovides, 1989
1985 a 1986	200,000	
	+ 10 tn semillas	Sánchez-Mejorada com. pers.
1985 a 1986	100,000 Orquídeas, Cactáceas, Agaves y Cícadas	"
---	22,000	Vovides, 1989
1989-91 (Febrero)	Decomisados 640,000 individuos (Zamiáceas, Cactáceas, Agavaceas, Orquídeas, Liliáceas, Bromeliáceas.	SEDUE, 1991a

\* citado por Osborne, 1988.

Se considera que existen unas 250,000 especies de plantas superiores y que el hombre a través de su historia ha utilizado 3000 a 7000 en su alimentación, de las cuales, al menos 150 han sido cultivadas en forma intensiva, pero la tendencia ha sido utilizar cada vez un número menor, hoy la mayor parte de la gente en el mundo se alimenta de sólo unos 20 cultivos (NAS, 1975; Moore, 1988; MacKnight, 1988) no obstante que al menos 75,000 especie tienen partes comestibles y algunas son demostrablemente superiores a las especies en uso. Se considera que tan sólo en

México existen más de 600 especies no cultivadas que tienen valor alimenticio (Caballero y Sarukhan, 1982, citados por Toledo et al., 1991), se estima que en general cuenta con unas 5000 especies de plantas útiles para distintos propósitos que podrían ser aprovechables para resolver necesidades presentes y futuras. Nuestra sociedad se beneficia de especies poco conocidas o ignoradas. La diversidad de organismos y su interdependencia brindan servicios ecológicos cruciales como el control natural de plagas (Wilson, 1984); evitan la acumulación excesiva de CO<sub>2</sub> en la atmósfera que respiramos y son el sostén alimenticio de todas las formas de vida en el planeta gracias al proceso fotosintético que realizan. Los beneficios posibles de lograr de cada especie silvestre en particular son razones que justifican su protección e investigación y que se suman a las ya citadas en el reporte de la National Science Foundation (1978) para buscar nuevos cultivos (Hinman, 1986).

Raven a nombre del IUCN/WWF Plant Advisory Group, dió a conocer que más de 60,000 especies vegetales de trópicos y subtrópicos (1 de cada 4 o 1 de cada 5), lo que representa más de la cuarta parte de la diversidad total en el mundo están en riesgo de extinción y posiblemente se habrán extinguido al llegar el año 2050 si las tendencias actuales no cambian (Raven, 1986). Raven (citado por Linden, 1989) señaló que durante las próximas 3 décadas el hombre llevará a la extinción un promedio de 100 especies cada día lo cual representa una tasa de extinción actual 1000 veces mayor a la de la prehistoria.

Entre las especies en mayor peligro de desaparecer en poco tiempo

de sus habitats, debido a la destrucción de éstos y a la sobrecolecta se encuentran las cícadas las cuales son las espermatofitas vivientes más primitivas que han llegado hasta nuestros días (Norstog, 1987).

## CICADAS

Las cícadas pertenecen a la clase Gymnospermae, orden Cycadales, que incluye a las espermatofitas vivientes más primitivas de la tierra (Vovides y Peters, 1987). Las especies que han llegado hasta nuestros días sólo habitan en los trópicos y subtropicos y son remanentes de un grupo más grande y diverso que floreció en la era Mesozoica, y que alcanzó su zenit en el período Jurásico hace unos 160 millones de años (Osborne, 1990; 1990a). Por ello esta era es conocida como la "edad de los dinosaurios y las cicadofitas" (Gilbert, 1984). Una opinión popular sobre las cícadas existentes es que son sobrevivientes relativamente sin cambios respecto a las formas prehistóricas, pero, quizá un dictamen mejor informado es que estas plantas constituyen un grupo que está evolucionando y podría responder a condiciones medioambientales cambiantes. En los últimos años, estudios biosistemáticos señalan que aunque conservan caracteres muy primitivos han mostrado cambios evolutivos recientes y que hay gran variación dentro y entre especies (Eckenwalder, 1980; Osborne, 1990a), Vovides señala un probable caso de especiación donde estarían involucradas *Zamia furfuracea* L. f. y *Z. loddigesii* Miq. como parentales de un híbrido.

Las cícadas, son plantas poco leñosas o arborescentes, de tallos gruesos, tuberosos y la mayoría parcial o completamente subterráneos como en *Zamia pumila* subsp. *pygmaea* (Sims) Eckenwalder con tallo subterráneo de sólo 25 cm de longitud; o bien con tallos columnares generalmente no ramificados, las formas arborescentes con una corona terminal de hojas tienen una

apariciencia semejante a las palmas, la especie australiana Lepidozamia hopei Regel alcanza 18 m de altura. Un caso muy particular es Zamia pseudoparasitica Yates in Seeman que vive como epífita en árboles de Panamá.

Alcanzan edades muy avanzadas (500 - 1000 años o más); son de muy lento crecimiento, por ejemplo, individuos de Dioon edule Lindley de unos 2 m de altura se les calcula una edad de más de 2000 años (Vovides y Peters, 1987; Vovides com. pers.) presentan hojas pinnadas alternas que forman una espiral en forma de corona en el ápice del tronco, las hojas son persistentes (3-10 años), en algunas especies las hojas alcanzan hasta 3 m de longitud como en Encephalartos villosus Lem., al caer permanecen las bases que brindan soporte estructural al tronco el cual está reforzado internamente por una compleja serie de trazas foliares. El crecimiento secundario es escaso en comparación con otras gimnospermas y plantas leñosas en general. Aún cuando en algunos taxa están presentes zonas definidas de crecimiento concéntrico éstas no constituyen incrementos estacionales y no se encuentran los típicos anillos de crecimiento anual de plantas leñosas. Son plantas dioicas, forman órganos reproductores en conos o estróbilos, las microsporófilas de los conos masculinos llevan abundantes microsporangios dispersos que producen grandes células espermáticas móviles como las de sus ancestrales helechos, en los conos ovulados las esporófilas llevan óvulos desnudos marginales que después de la fertilización se desarrollan en semillas en forma de drupa, algunas veces de color brillante, contienen un verdadero embrión como en las plantas con flor. Debido a que las



poblaciones de cícadas son escasas y la mayoría de éstas con pocos individuos, la producción de semillas fértiles es escasa. Las semillas son recalcitrantes y la germinación es lenta y errática (Dehgan y Schutzman, 1983). Estas plantas fructifican en un cono (Lawrence, 1951; Vovides, 1981; Vovides et al., 1983). Presentan un sistema de raíces apogeotrópicas que contienen Cyanobacterias simbiotes capaces de realizar la fijación de nitrógeno atmosférico del que se beneficia la planta y el ecosistema en general (Bergersen et al., 1965; Vovides y Peters, 1987; Osborne, 1988).

Los representantes vivientes de las cícadas están distribuidos, según Stevenson (1985, citado por Osborne, 1988) y Stevenson, Osborne y Hendricks (1990, citados por Osborne, 1990a) (Tabla 2) en cuatro familias, 11 géneros y aproximadamente 164 especies. Incluyendo el género Chigua D. Stevenson, recientemente descubierto en Colombia (Osborne, 1988; Norstog, com. pers.). Los géneros Encephalartos Lehm. y Zamia L. contribuyen con más del 60% del total de especies.

Tabla 2. Clasificación de las cícadas vivientes\*

DIVISION		Cycadophyta	
CLASE		Cycadopsida	
ORDEN		Cycadales	
SUBORDEN	FAMILIA	GENERO	No. ESPECIES
Stangerinae	Stangeriaceae	<u>Stangeria</u> T. Moore	1
	Boweniaceae	<u>Bowenia</u> Hook. ex Hook. f.	2
Cycadinae	Cycadaceae	<u>Cycas</u> L.	17
	Zamiaceae	<u>Lepidozamia</u> Regel	2
		<u>Macrozamia</u> Miq.	14
		<u>Encephalartos</u> Lehm.	46
		<u>Dioon</u> Lindley	10
		<u>Microcycas</u> (Miq.) A.D.C.	1
		<u>Ceratozamia</u> Brongn.	10
		<u>Zamia</u> L.	43
		<u>Chigua</u> D. Stevenson	2

\* Stevenson, 1985, citado por Osborne, 1988

Las cícadas tuvieron una amplia distribución y fueron abundantes en todo el mundo en la era Mesozoica como lo demuestran amplias evidencias paleobotánicas de fósiles encontrados en estratos de Siberia, Manchuria, Oregon, Alaska, en varias islas del Océano Artico, Groenlandia, Suecia, Inglaterra, Europa central, India, Australia y el continente Antártico (Arnold, 1953, citado por Osborne, 1988). Actualmente su distribución está limitada a las regiones tropicales y subtropicales, donde ocupan una amplia variedad de habitats desde los bosques de lluvia tropical de Queensland, Australia y de algunas localidades de América central a las sabanas más bien áridas de algunas partes de México y de Sudáfrica. No es sorprendente que muchas especies tengan modificaciones xéricas tipificadas por hojas coriáceas con espinas, gruesas cutículas cerosas y estomas alojados en depresiones, que de acuerdo a Vovides (com. pers.) estas características parecen compensar un sistema vascular ineficiente y pudieran no corresponder a adaptaciones al clima.

Sólo pocos de los géneros están ampliamente distribuidos.

Macrozamia, Lepidozamia y Bowenia son endémicos en Australia.

Cycas se encuentra en la costa de Africa, en las islas del Océano Indico, en el sureste de Asia, Australia y en las islas del Pacífico occidental.

Encephalartos y Stangeria endémicos de Africa.

Zamia se encuentra en Florida, en México en el Caribe, América Central y en gran parte de América del Sur.

Microcycas es endémico de Cuba.

Chigua sólo se reporta para Colombia.

Ceratozamia y Dioon tienen una distribución restringida a América central, principalmente en México.

Las más altas densidades en términos de proliferación de especies se encuentran en Queensland, Australia, 11 especies de 4 géneros; Sudáfrica, 29 especies de 2 géneros y en México donde distribuidas en 3 géneros, Ceratozamia, Dioon y Zamia se han reportado 34-35 especies (Osborne, 1988; Vovides, 1989) de las cuales en una estimación conservadora, un 75% son endémicas. Lo que hace que México sea el país con el mayor número de especies de cícadas en el mundo y cuente con el 50% de estas plantas existentes en América (Balduzzi et al., 1982 citados por Vázquez Torres, 1990). Si bien en nuestro país su distribución geográfica es amplia y ocupan las estribaciones de las Sierras Madre Oriental, Occidental y del Sur, también es cierto que las poblaciones en general son restringidas (p. ej. Z. furfuracea, endémica de Veracruz) o apenas representativas (p. ej. de C. eurphyllidia Vázquez-Torres, Sabato y D. Stevenson existen sólo 12 plantas, Vovides com. pers.).

Para la etnobotánica en México es importante conocer que en las áreas de distribución de las cícadas se desarrollaron las culturas Olmeca, Maya y Azteca donde había al menos una especie de Ceratozamia, Dioon o Zamia y no obstante que entre los más importantes códices indígenas y documentos de la época de la Colonia no se ofrecen pruebas del conocimiento de estas plantas es muy probable que éste haya sido transmitido en forma oral de generación en generación, como parece demostrarlo la información recabada con indígenas y campesinos que habitan las regiones en

las que se encuentran las cícadas, lo que ha permitido aprender y documentar distintas formas de uso: comestibles (Tabla 3), medicinales (Tabla 4), insecticidas, ornamentales (Tabla 5) (Vázquez Torres, 1990).

Tabla 3. Ejemplos de cícadas comestibles (Vázquez Torres, 1990)

Especie	Parte comestible	Localidad
<u>Ceratozamia mexicana</u> var. <u>robusta</u> (Miq.) Dyer	semillas	Chiapas *
<u>C. microstrobila</u> Vovides y Rees	semillas	SO Tamaulipas
<u>D. edule</u> var. <u>angustifolium</u> Miq.	semillas	SO Tamaulipas
<u>D. edule</u> var. <u>edule</u> Lindley	semillas	SO Tamaulipas
<u>D. spinulosum</u> Dyer	semillas	Oaxaca, Veracruz
<u>Zamia loddigesii</u> Miq.	semillas	-
<u>Z. pumila</u> L.	tallo subterráneo (harina)	Florida**

\* Vovides et al., 1983; - no cita localidad; \*\*Thieret, 1958.

Tabla 4. Ejemplos de cícadas con uso medicinal

Especie	Uso	Referencia
<u>Ceratozamia mexicana</u> var. <u>mexicana</u>	vermífugo	Vovides <u>et al.</u> , 1983
<u>C. mexicana</u> var. <u>robusta</u>	vermífugo	Vovides <u>et al.</u> , 1983
<u>Dioon edule</u>	antineurálgico	Vázquez Torres, 1990
<u>Zamia spartea</u> A. DC.	contra mordedura de serpientes	Vázquez Torres, 1990

Tabla 5. Algunos ejemplos de las especies de cícadas más apreciadas como ornamentales.

<u>C. kuesteriana</u> Regel	<u>D. spinulosum</u> Dyer
<u>C. latifolia</u> Miq.	<u>D. tomaselli</u> var. <u>tomaselli</u> De Luca <u>et al.</u>
<u>C. miqueliana</u> Wendl.	<u>Z. crammophila</u> Vovides, Schutzman y Dehgan
<u>C. matudae</u> Lundell	<u>Z. furfuracea</u> L.
<u>C. mexicana</u> Brongn.	<u>Z. inermis</u> Vovides, Rees y Vázquez-Torres
<u>C. mexicana</u> var. <u>robusta</u> (Miq.) Dyer	<u>Z. pacijuga</u> Wieland
<u>D. edule</u> Lindl.	<u>Z. splendens</u> Schutzman
<u>D. merolae</u> de Luca, Sabato y Vázquez-Torres	

-----  
\*Vázquez Torres, 1990

En México, las cícadas han sido un recurso natural menospreciado, hasta recientemente en que su popularidad como plantas ornamentales ha aumentado, lo cual aunado a la relevancia y demanda que tienen en otros países, hacen preveer una mayor colecta y destrucción de sus poblaciones silvestres (Vovides, 1989).

La mayoría de las especies se han clasificado como en peligro de extinción (E), vulnerables (V) o raras (R) por la IUCN (Gilbert, 1984; Osborne, 1990a). Debido a su crítica situación todo el orden Cycadales se ha incluido en los apéndices I y II de CITES (Collins, 1987) (Tabla 6).

Tabla 6. Todo el Orden Cycadales está protegido por CITES.

APENDICE I	APENDICE II
<u>Ceratozamia</u>	<u>Bowenia</u>
<u>Encephalartos</u>	<u>Cycas</u>
<u>Macrozamia</u>	<u>Dioon</u>
<u>Microcycas</u>	<u>Lepidozamia</u>
<u>Stangeria</u>	<u>Zamia</u>

-----

Las cícadas por el hecho de que ocupan nichos ecológicos específicos con patrones de distribución altamente restringidos

en los trópicos están en inminente peligro de desaparecer de sus habitats a consecuencia de múltiples actividades del hombre (Osborne, 1990a). Lamentablemente, los problemas de conservación son agudizados por características inherentes de estas plantas, como son: lento crecimiento, escasez de semillas viables y un limitado potencial para la propagación vegetativa. Las peores amenazas son la deforestación y la sobrecolecta de especímenes de poblaciones silvestres para un comercio ilegal a gran escala. Desde nuestro país se exportan grandes cantidades de cícadas (Tabla 1) principalmente a los Estados Unidos y a Japón (Osborne, 1988).

Vovides (1989) basado en datos de Gilbert (1984) señala que el comercio de estas plantas en México ha aumentado en forma alarmante en los últimos años. Tang (1983, citado por Osborne, 1988) menciona un embarque de 25,000 plantas de la recientemente descrita Ceratozamia norstogii D. Stevenson, de México hacia Estados Unidos, lo cual destruyó casi por completo una de las dos poblaciones conocidas de esta especie. Vovides (1989) cita que de 1985 a 1986 se exportaron de México hacia los Estados Unidos más de 5000 plantas de distintas especies de Ceratozamia y Zamia; también menciona que fué detenido un cargamento de 2000 plantas de Ceratozamia hildae Landry y Wilson, de México hacia Estados Unidos.

Gilbert (1984) demostró que México debido a incrementos sostenidos desde 1979 alcanzó el primer lugar en el mundo en 1981, respecto a la exportación ilegal de cícadas, asimismo, reportó que Japón en ese mismo año resultó el mayor importador de

cicadas provenientes de México.

Ceratozamia mexicana var. robusta, es una de las especies más atractivas (Tabla 5) y severamente amenazadas, incluida dentro del género Ceratozamia comprendido todo, por su crítica situación, en el Apéndice I, el más restrictivo de CITES (Tabla 6).

### PROTECCION DE LA DIVERSIDAD BIOLOGICA

La recomendación general es proteger el habitat natural y conservar in situ la vida silvestre (Simmons, 1976; Villalobos, 1987; Toledo, 1988; Velázquez, 1988; Myers, 1979 citado por Wilson, 1989; Wilson, 1989).

No obstante los múltiples procesos de la enorme destrucción de sus habitats naturales, México, es uno de los países mas atrasados en la conservación de sus recursos bióticos y deberá adoptar medidas para la conservación ex situ para aquellas especies en mayor peligro de extinción.

Existen dos formas básicas de tratar de conservar la biodiversidad vegetal: en reservas de la naturaleza o in situ o bien a través de colecciones ex situ, fuera del habitat natural, en jardines botánicos, bancos de semillas y en cultivos de tejidos. La biodiversidad sólo podrá ser conservada mediante la combinación de ambos métodos (BGCS).

El uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CTV) con especies nativas es una aplicación relativamente nueva de esta tecnología, que adquiere un gran valor como método de propagación particularmente para las especies amenazadas (Tabla 7).

Tabla 7. Algunas especies amenazadas que han sido regeneradas por cultivo de tejidos.

Especie	Estatus	Referencia
<u>Aztekium ritteri</u> Boedeker	E	Rodríguez-Garay y Rubluc, 1992
<u>Mammillaria san-angelensis</u> Sánchez-Mejorada	Ex	Martínez-Vázquez y Rubluc, 1989
<u>M. huitzilopochtli</u>	E	Rubluc <u>et al.</u> , 1993
<u>Bletia urbana</u> Dressler	E	Rubluc <u>et al.</u> , 1989
<u>Encyclia vitellina</u> (Lindl.) Dressler	V	Ramírez Fuentes, 1990



Tabla 7. (continuación)

<u>Encyclia citrina</u>	V	Rubluo <i>et al.</i> , 1993
(Llave & Lex.) Dressler		
<u>Laelia anceps</u> Lindl.	E	Rubluo <i>et al.</i> , 1993
<u>Lemboglossum ehrenbergii</u>	R	"
(Link, Kl. & Otto) Halbinger		
<u>Lycaste aromatica</u>	T	"
(Graham ex Hooker) Lindl.		
<u>L. skinneri</u> (Batem. ex		
Lindl.) Lindl. var. <u>alba</u>		
Dombrain	E	"
<u>L. skinneri</u> (Batem. ex		
Lindl.) Lindl. var.		
<u>skinneri</u>	-	"
<u>Oncidium stramineum</u>	E	"
(Lindl.) Batem.		
<u>Rhyncholaelia glauca</u>		
(Lindl.) Schltr.	T	"
Aprox. 100 spp de		
orquídeas amenazadas		Dixon y Bunn, 1990
<u>Coronopus navasii</u> Pau	E	Iriondo y Perez, 1990
<u>Centarium rigualii</u> Esteve	E	"
<u>Nesocodon mauritianus</u>	E	Fay y May, 1990
(I. Richardson) Thulin		
<u>Carrissa xylopicron</u>	V	Krogstrup <i>et al.</i> , 1990
Thouars		
<u>Gastonia rodriguesiana</u>	E	"
Marais		
<u>Mathurina penduliflora</u>	R	"
Balf. f.		
<u>Peperomia reticulata</u>	V	"
Balf. f.		
<u>Pittosporum balfourii</u> Cuf.	E	"
<u>Peladia coronopus</u> Balf. f.	V	"
<u>Turraea laciniata</u>	E	"
(Balf. f.) Harms		

#### CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos vegetales, es una rama de la biología que basada en la totipotencialidad celular ha establecido un conjunto de técnicas que hacen posible dividir a un organismo en sus bloques constituyentes y cultivar asépticamente *in vitro* protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones y plántulas en condiciones controladas (medio nutritivo, pH, luz, temperatura,

atmósfera, etc.) permitiendo al investigador variar las condiciones de cultivo y/o el tipo de explante y llegar a dirigir las respuestas morfogénéticas y biosintéticas de las células. En los últimos 15 años las técnicas para cultivar in vitro células, tejidos y órganos han tenido un enorme desarrollo que permite en la actualidad aplicarlas a un gran número de especies. Han permitido un gran avance en el conocimiento básico de la morfogénesis de las plantas y han encontrado una amplia aplicación para la solución de problemas en las industrias químico-farmacéutica y sobre todo en la agrícola y hortícola donde a nivel comercial se utilizan principalmente en la propagación y recuperación de plantas libres de patógenos (Thorpe, 1978; Robert y Loyola, 1985; Beversdorf, 1990) (Tablas 8, 9).

Entre los grandes beneficios que es posible lograr mediante el CTV, estos inciden directamente en:

- En investigación básica
- Biosíntesis y modificación de sustancias naturales en las células cultivadas
- Mejoramiento genético
- Conservación de germoplasma
- Micropropagación

Tabla 8. Algunas especies económicamente importantes que han sido propagadas por cultivo de tejidos (Murashige, 1974; Beversdorf, 1990).

<u>Allium cepa</u> L.	<u>Lycopersicon esculentum</u> Mill.
<u>Allium sativum</u> L.	<u>Nephrolepis exaltata</u> (L.) Schott
<u>Apium graveolens</u> L.	<u>Oryza sativa</u> L.
<u>Asparagus officinalis</u> L.	<u>Osmunda cinnamomea</u> L.
<u>Avena sativa</u> L.	<u>Philodendron selloum</u> C. Koch
<u>Bougainvillea glabra</u> Choisy.	<u>Pinus</u> spp.
<u>Capsicum annum</u> Viz.	<u>Solanum tuberosum</u> L.
<u>Carica papaya</u> L.	<u>Vitis vinifera</u> L.
<u>Crassula argentea</u> Thung.	<u>Zea mays</u> L.
<u>Daucus carota</u> L.	

---

- **Micropropagación.** Mediante la cual es posible lograr una producción clonal, rápida, masiva y libre de patógenos. La micropropagación es quizá el área más estudiada, la que más avance ha tenido, que más se aplica y que a nivel comercial permitiría el ingreso inmediato de divisas a nuestro país (Robert y Loyola, 1984; Lozoya, 1985; Villalobos, 1985). Debido a que de pequeñas secciones de tejidos es posible regenerar plantas completas, su empleo en la propagación y conservación de especies escasas en la naturaleza es una obvia e impostergable aplicación. Además es el consenso que la regeneración de vegetales es la piedra fundamental de las metodologías del CTV. Sin la regeneración de plantas la hibridación de protoplastos, los estudios de crecimiento y diferenciación, la producción de plantas genéticamente variadas, el cultivo de anteras, la clonación comercial para el propósito de multiplicación rápida de especies deseables o difíciles de propagar, la eliminación de enfermedades por medio de cultivo de meristemos y muchos estudios de reguladores de crecimiento resultarían inútiles (Litz, 1985; Tisserrat, 1985).

La regeneración de plantas se puede alcanzar a través de dos vías morfogénéticas:

- 1) **Organogénesis**, define la formación y crecimiento de brotes y el subsecuente enraizamiento. El nuevo brote es una estructura unipolar y su tejido vascular está físicamente conectado al tejido de origen.
- 2) **Embriogénesis Somática o Asexual**, es el desarrollo de embriones a partir de células somáticas. Los embriones somáticos

son estructuras bipolares (con un meristemo de raíz y otro del brote), semejantes a los cigóticos, cuyos tejidos vasculares no están unidos a los del tejido original.

Martin (1985) cita que a partir de una sola yema de rosal subdividida cada mes en 4 secciones es posible obtener 200,000 a 400,000 plantas en un año, en tanto que en el mismo período, empleando métodos tradicionales se logran 30-50 plantas. Por otro lado, si el sistema de cultivo es de células en suspensión, donde cada una de éstas puede ser teóricamente inducida a formar un embrión, el número de plantas que potencialmente se pueden regenerar de un sólo frasco de cultivo, se eleva a millones. Científicos en Canadá han logrado obtener aprox. 50,000 embriones somáticos de alfalfa por gramo de tejido en 8 semanas. Estos embriones pueden ser deshidratados a un contenido análogo de una semilla (10%) y germinados, aún después de un año de almacenamiento a temperatura ambiente (Herman, 1991). La embriogénesis somática puede ser muy útil en micropropagación y en algunos aspectos es más ventajosa al compararla con la organogénesis y consecuentemente más efectiva en la regeneración in vitro de especies amenazadas.

#### **EMBRIOGENESIS SOMATICA**

Hace ya casi 40 años cuando Steward et al. (1958) y Reinert (1958) reportaron que habían logrado producir embriones a partir de tejidos somáticos de Daucus carota (zanahoria) cultivados in vitro y que eran estructural y bioquímicamente idénticos a los cigóticos (Ammirato, 1987). Aún sin conocer todos los factores

que intervienen en la embriogénesis somática, y a pesar de no comprender completamente su acción y lejos aún de tener un control completo de ellos es posible llegar a formar embriones somáticos al establecer un explante en cultivo, lograr la proliferación de callo y la iniciación de proembriones, usualmente en un medio (inductor) con alta concentración de auxina (0.45- 452  $\mu\text{M}$ ) particularmente de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). Posteriormente se requiere transferir el callo a medio sin reguladores de crecimiento para permitir la (maduración) formación de embriones bipolares (Tisserat, 1985; Komamine *et al.*, 1990). En el caso de embriogénesis somática directa se infiere que las células productoras de los embriones están presentes en los explantes (Sharp *et al.*, 1980). La inducción de la competencia embriogénica ha ocurrido ya al tiempo de la disección y no se forma callo (Rangan *et al.*, 1968 citados por Litz y Jaiswal, 1991).

#### **Factores de la Embriogénesis Somática**

La producción de embriones somáticos puede ser lograda con una adecuada selección y manipulación de distintos factores. Entre los más importantes están el tipo y estado de desarrollo del explante y la interacción del explante con el medio de cultivo (Litz y Jaiswal, 1991).

#### **Explantos**

Teóricamente de cualquier estructura vegetal debe ser posible regenerar plantas, sin embargo, la experiencia ha demostrado que los embriones y tejidos de plántulas son morfogenéticamente más plásticos que los tejidos maduros (Ammirato, 1989; Fasolo *et al.*,

1989; Brand y Lineberger, 1991). Pero como el embrión es producto de una recombinación genética no se logra multiplicar el genotipo seleccionado de la planta adulta. Esto es crítico si se desea una propagación clonal por ejemplo de especies forestales o cultivos hortícolas o si la producción de semillas es escasa y lenta como ocurre en cícadas y otras gimnospermas como las coníferas. Por lo que la solución a ello es utilizar explantes no embriónicos de plantas adultas. Si bien los tejidos (hojas, tallos, pecíolos, etc.) de plantas herbáceas adultas pueden regenerar nuevos individuos esto no sucede así con las especies perennes, no obstante, existen ejemplos en la literatura (Tabla 9).

Tabla 9. Regeneración de frutales tropicales vía embriogénesis somática a partir de explantes derivados de plantas maduras\*

Especie	N. común	Medio de cultivo**	Explante	Referencia
<u>Mangifera indica</u> L.	mango	MS 1.0 2,4-D	N	Litz <u>et al.</u> , 1982
<u>Musa</u> spp. 1988	plátano	MS 6.6 Dicamba	H, R	Novak <u>et al.</u> ,
<u>Myrciaria cauliflora</u> DC. Berg.	jaboticaba	MS 1.0 2,4-D	N	Litz, 1984a
<u>Syzygium</u> spp.	varios	MS 1.0 2,4-D	E adv	Litz, 1985
<u>Bactris gasipaes</u> H.B.K.	pejibaye	MS 20.5 2,4-D 3.6 BA	At	Arrias y Huete, 1983
<u>Phoenix dactylifera</u> L.	dátil	MS 100 2,4-D 3 2iP, AC	At	Reynolds y Murashige, 1979
<u>Eriobotrya japonica</u> L.	níspero	MS 1 2,4-D 1 BA	N	Litz, 1985
<u>Citrus</u> spp.	varios	MS 1 2,4-D	N	Barlass y Skene, 1986
<u>Euphoria longan</u> Stend.	longan	MS .25-2 K .25-2 2,4-D	H	Litz, 1988

\* Litz y Jaiswal (1991). \*\* Hormonas en mg/l At= ápice de tallo; E adv= embriones adventicios; H= hoja; N= nucela; R= rizoma.

En muchas plantas el objetivo de la investigación es utilizar explantes no embriónicos de plantas adultas. Las hojas, la nucela y el ovario inmaduros son estructuras esporofíticas parentales consideradas fuentes potenciales de tejido embriogénico (Ammirato, 1989).

Se lograron tejidos embriogénicos a partir de hojas inmaduras de: sorgo (Wernicke y Brettell, 1980); bambú (El Hassan y Debergh, 1987); caña de azúcar (Guiderdoni y Demarly, 1988). De nucela de Citrus spp. (Esan, 1973); de mango (Litz, 1984). De óvulos inmaduros de papaya (Litz y Conover, 1983).

#### **Interacción Explante-Ambiente de Cultivo**

El control de la embriogénesis somática ha sido estudiado principalmente tratando de relacionar las respuestas del explante ante los componentes del medio de cultivo, entre los principales podemos citar los siguientes.

**Reguladores de crecimiento.** Auxinas. El 2,4-D es el más utilizado para la inducción de embriogénesis somática (Ammirato, 1989); Stuart et al. (1985) encontraron que concentraciones progresivamente menores de 2,4-D durante la embriogénesis somática en alfalfa generaron menores cantidades de embriones pero de una mejor calidad y alta tasa de germinación. En embriones somáticos de zanahoria, hubo un 80% de germinación de aquellos formados en alta concentración de sacarosa (y sin hormonas) en contraste con el 20% de los inducidos con 2,4-D (Kamada et al., 1988). El primer grupo creció generando plántulas normales mientras los embriones inducidos en 2,4-D presentaron numerosos embriones secundarios y no desarrollaron plántulas

normales.

El ácido abscísico, ABA, adicionado al medio de cultivo se ha utilizado para evitar anormalidades como la formación de embriones secundarios en los ejes embrionarios y también la germinación precoz, por ejemplo, en Daucus carota (Ammirato, 1983), Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco (Durzan y Gupta, 1987), en Picea abies (L.) Karst. (von Arnold y Hakman, 1988). Citocininas. En términos generales las citocininas no son requeridas en el proceso de embriogénesis somática, sin embargo en un número de casos las citocininas, como la kinetina, han demostrado ser de utilidad en el establecimiento de las líneas celulares o en la maduración de los embriones somáticos (Ammirato, 1983).

Etileno. En años recientes se ha encontrado una relación entre las respuestas y los componentes de la atmósfera de los cultivos. Los tejidos vegetales producen normalmente sustancias volátiles (CO<sub>2</sub>, etileno, etanol) que se acumulan en la atmósfera del cultivo. Entre ellos, el etileno se ha significado como un factor que afecta el crecimiento y diferenciación de los tejidos (Tisserat y Murashige, 1977a,b). Callos embriogénicos de Picea abies generan una cantidad menor de etileno que los no embriogénicos (Wann et al., 1987). El etileno inhibió la embriogénesis somática en Daucus carota, Phoenix dactylifera (Thomas and Murashige, 1979); y en Hevea brasiliensis Kunth., Mull. Arg. (Auboiron et al., 1990).

La reducción de la acción del etileno se ha logrado con el empleo de AgNO<sub>3</sub> (Ag<sup>+</sup>) permitiendo la embriogénesis somática (Roustan et



al., 1990) y el cultivo de callos por tiempo prolongado en Brassica oleracea L.. En Solanum tuberosum aumentó la eficiencia en el plaqueo de protoplastos y la regeneración en cultivos de Zea mays (García, 1991).

**Sacarosa.**- Altas concentraciones de sacarosa promovieron la embriogénesis somática en Carica papaya (Litz y Conover, 1983); Daucus carota (Wetherell, 1984), Picea abies (von Arnold, 1987), Cucumis sativus (Chee y Tricoli, 1988, citados por Ammirato, 1989). En un estudio sobre la maduración de embriones somáticos de Theobroma cacao L. se encontró que la sacarosa, glucosa o fructosa mantienen su crecimiento, pero la glucosa fué superior a este respecto que la sacarosa. Por otro lado, el contenido total de lípidos, antocianinas y alcaloides fué menor con glucosa que con sacarosa (Kononowicz y Janick, 1984). En todo estudio sobre regeneración in vitro de embriones somáticos se persigue, la obtención de regenerantes con una apariencia semejante a los naturales y la sacarosa es uno de los factores a considerar pues se ha demostrado que influye en la promoción de un desarrollo más normal no sólo en su papel nutricional sino también a través de un efecto osmótico (Rietsema et al., 1953; Ammirato, 1983; Hu y Wang, 1986).

**Nitrógeno.**- Distintas fuentes de nitrógeno reducido, aminoácidos y amidas han demostrado gran utilidad en el desarrollo del proceso (Norstog y Rhamstine, 1967; Ammirato, 1983). Glutamina y asparagina fueron importantes en cultivos embriogénicos friables de soya (Finer y Nagasawa, 1988, citados por Ammirato, 1989). Las tasas de regeneración varían grandemente de una especie a

otra y de un tejido a otro aún dentro de la misma especie, si bien la respuesta esperada puede ser obtenida atendiendo a diferentes factores, existe una resistencia a la morfogénesis in vitro en particular a la embriogénesis somática en cereales y pastos, en algunas leguminosas, en especies tropicales recalcitrantes, en angiospermas leñosas y especialmente en gimnospermas (Ammirato, 1989) las cuales incluyen especies muy importantes ecológica y económicamente como son las cícadas y las coníferas.

La forma usual en que las gimnospermas han sido regeneradas in vitro ha sido a partir de yemas adventicias formadas por organogénesis en tejidos de plántulas (Bonga, 1987). Los reportes sobre embriogénesis somática son escasos y sólo se han logrado mediante el cultivo de embriones cigóticos, megagametofitos y secciones de plántulas (Norstog y Rhamstine, 1967; Rohr et al., 1989, Attree y Fowke, 1991) (Tabla 9). La regeneración a partir de tejidos somáticos de gimnospermas maduras ha sido un gran obstáculo, hay pocos reportes de regeneración a partir de éstos, en realidad sólo de Bonga (1981; 1982), Ball et al. (1978) y Ball (1987) que describieron el desarrollo de brotes adventicios, respectivamente de Larix decidua Mill. y Sequoia sempervirens Endl., por lo que hasta ahora no existía una sola publicación sobre embriogénesis somática a partir de estructuras vegetativas de plantas adultas de ninguna gimnosperma, incluidas las cícadas. Por lo que todo intento sobre morfogénesis in vitro a partir de estructuras somáticas de gimnospermas debe aportar resultados de gran interés. Los estudios en cícadas sobre embriogénesis

somática y en general de morfogénesis in vitro son escasos (Tablas 11, 12). Los resultados presentan grandes semejanzas con los encontrados en coníferas sobre las que existe un mayor conocimiento del proceso de embriogénesis somática in vitro (Tabla 10).

Tabla 10. Embriogénesis somática en Gimnospermas  
\*(Coníferas)

Espece	Explante	Referencias
<u>Abies alba</u> L.	E inm	Schuller <u>et al.</u> , 1989
<u>Larix decidua</u> Mill.	M inm	Nagmani y Bonga, 1985; von Aderkas <u>et al.</u> , 1987; von Aderkas y Bonga, 1988
<u>L. x eurolepis</u>	E inm	Klimaszewska, 1989a.
	E inm	von Aderkas <u>et al.</u> , 1989
<u>Picea abies</u>	E inm	Hakman <u>et al.</u> , 1985
(L.) Karst.	E inm	Hakman y von Arnold, 1985
	E mad	von Arnold y Hakman, 1986
	E mad	Gupta y Durzan, 1986a
	E mad y plnt de 3-7d	Krogstrup, 1986; Lelu <u>et al.</u> , 1987
	E inm	Wann <u>et al.</u> , 1987
	E mad	von Arnold, 1987
	E mad	Becwar <u>et al.</u> , 1987a
	E	Nagmani <u>et al.</u> , 1987
	E mad	Boulay <u>et al.</u> , 1988
	E mad	Jain <u>et al.</u> , 1988
	cult. susp.	
<u>Picea abies</u>	E mad y E inm	von Arnold y Hakman, 1988
	E mad	Verhagen y Wann, 1989
	M	von Aderkas y Bonga, 1988
	M	Simola y Santanen, 1990.
<u>Picea glauca</u>	E	Attree <u>et al.</u> , 1987
(Moench) Voss.	protoplastos	
	E inm	Hakman y Fowke, 1987a
	cult. susp.	
	E inm	Lu y Thorpe, 1987
	E	Nagmani <u>et al.</u> , 1987
	E	Hakman y von Arnold, 1988
	E	Kartha <u>et al.</u> , 1988
	E inm	Attree <u>et al.</u> , 1989a.
	E mad	Tremblay, 1990
	plnt 12-30d	Attree <u>et al.</u> , 1990a

Tabla 10. (continuación)

<u>Picea mariana</u>	E inm	Hakman y Fowke, 1987a;
(Mill.) B.S.P.	E inm	Tautorus <u>et al.</u> , 1990
	E mad	"
	plnt 12-21d	Attree <u>et al.</u> , 1990a.
**Interior spruce	E inm	Webb <u>et al.</u> , 1989
<u>Picea sitchensis</u>	E inm	Krogstrup <u>et al.</u> , 1988
(Bong.) Carr.	E mad	von Arnold y Woodward, 1988
<u>Pinus caribaea</u>	E inm	Lainé y David, 1990
Morlet		
<u>Pinus elliotti</u>	E inm	Jain <u>et al.</u> , 1989
<u>Pinus lambertiana</u>	E mad	Gupta y Durzan, 1986b; 1987
Dougl.		
<u>Pinus radiata</u>	E	Smith <u>et al.</u> , 1985
D. Don	E inm	Chandler <u>et al.</u> , 1989
<u>Pinus serotina</u>	E	Wann <u>et al.</u> , 1987
<u>Pinus strobus</u> L.	E	Becwar <u>et al.</u> , 1987
	E inm	Finer <u>et al.</u> , 1989
<u>Pinus taeda</u> L.	E inm	Gupta y Durzan, 1987
	protoplastos	
	E inm	Becwar <u>et al.</u> , 1990; 1991
<u>Pseudotsuga menziesii</u>	E inm	Durzan y Gupta, 1987
(Mirb.) Franco		
<u>Sequoia sempervirens</u>	plnt 7d	Bourgard y Favre, 1988
Endl.		

\* Attree y Fowke, 1991.

\*\*P. glauca, P. engelmanni Parry e híbridos intermedios.

d= días después de germinación; E= embrión cigótico;

inm= inmaduro; mad= maduro; M= megagametofito; plnt= plántula.

Tabla 11. Respuestas morfofenéticas in vitro en Cícadas

Especie	Explant	Respuesta	Referencia
<u>Ceratozamia hildae</u>	M	C, R, B, ES	Chávez <u>et al.</u> , 1992a
Landry y Wilson	E	C, ES	
<u>C. mexicana</u> Brongn.	M	C, R, ES	De Luca <u>et al.</u> , 1979
	Mcspg	C	De Luca <u>et al.</u> , 1980
<u>C. mexicana</u> var.	M	C, R, B, ES	Chávez <u>et al.</u> , 1992a
<u>robusta</u> (Miq) Dyer	E	C, ES	
	H	C, ES	Chávez <u>et al.</u> , 1992c

Tabla 11. (continuación)

<u>Cycas circinalis</u> L.	M E	C -	Norstog y Rhamstine, 1967
<u>C. revoluta</u> Thunb.	rH M M Mcspg	C R cor R cor -	Brown y Teas, 1966 De Luca <u>et al.</u> , 1979 De Luca y Sabato, 1980 De Luca <u>et al.</u> , 1980
<u>Encephalartos altensteinii</u> Lehm.	Mcspg	Esperm	De Luca y Sabato, 1979
<u>E. caffer</u> (Thunb.) Lehm.	Masc	-	Osborne, 1988
<u>E. cupidus</u> R. A. Dyer	R, T H	C -	Koeleman y Small, 1982 Osborne, 1988
<u>E. augens-maraisii</u> Verdoorn	R, T H	C -	Koeleman y Small, 1982 Osborne, 1988
<u>E. ferox</u> Bertol. f.	Masc, Micfls	C	Osborne, 1988
<u>E. inopinus</u> R. A. Dyer	R, T H	C -	Koeleman y Small, 1982 Osborne, 1988
<u>E. lanatus</u> Stapf y Burt Davy	R, T	C	Koeleman y Small, 1982
<u>E. latifrons</u> Lehm.	P	C	Osborne, 1988
<u>E. lehmannii</u> Lehm.	R, T H	C -	Koeleman y Small, 1982 "
<u>E. lemboboensis</u> Verdoorn	R, T	C	Koeleman y Small, 1982
<u>E. natalensis</u> R. A. Dyer y Verdoorn	R, T h H, P	C C -	" Osborne, 1988 "
<u>E. paucidentatus</u> Stapf y Burt Davy	R, T	C	Koeleman y Small, 1982
<u>E. transvenosus</u> Stapf y Burt Davy	R, T	C	Koeleman y Small, 1982
<u>E. umbeluziensis</u> R. A. Dyer	M	C	De Luca <u>et al.</u> , 1979
<u>E. villosus</u> Lehm.	M	C	Laliberte <u>et al.</u> , 1983

Tabla 11. (continuación)

<u>E. woodii</u> Sander	h, Lb Masc, Micfls	C C	Osborne, 1988 "
<u>Macrozamia riedlei</u> (Gaud.) Gardn.	M	R cor	Lamont y Ryan, 1977
<u>M. communis</u> L. Johnson	M	C y R cor	De Luca <u>et al.</u> , 1980
<u>Microcycas calocoma</u> (Miq.) A. DC.	M	C y R	Peña y Grillo, 1982
<u>Stangeria ericopus</u> 1987 (Kunze) Baillard	r H	B -	Osborne y van Staden, Osborne, 1988
<u>Zamia fischeri</u> Miq.	M E	C, B, ES C	Chávez <u>et al.</u> , 1992b
<u>Z. furfuracea</u> L. f.	M E	C, B, ES C, ES	" "
<u>Z. pumila</u> L.	M M Mcspg M, E E M, E Cambium M E E E M N E	C, R, B, ES C, R, B, ES TP C, R, ES C, R, B C, ES C C C, R, B, ES E cot E cot C, B, ES C, ES C, B, ES	La Rue, 1948 La Rue, 1954 Norstog, 1965 Brown y Teas, 1966 Norstog y Rhamstine, 1967 Mustoe, 1967 Rivera Rosa, 1980 (no publicado) Webb <u>et al.</u> , 1983 Monnier y Norstog, 1984 Monnier y Norstog, 1986 Chávez <u>et al.</u> , 1992b " "
35 especies de <u>Ceratozamia</u> , <u>Cycas</u> , <u>Dioon</u> , <u>Encephalartos</u> <u>Lepidozamia</u> , <u>Macrozamia</u> , <u>Stangeria</u> , <u>Zamia</u> . <u>Zamia pumila</u> y <u>Zamia</u> sp.	M, H, R cor, C Ov, Hip, Micfls y otras partes H		Henson, 1980 " "

Tabla 11. (continuación)

Varios taxa para estudiar la influencia de la luz en la nodulación de la raíz	Webb, 1981; 1982a; 1982b; 1983, 1984; Webb y De Jesús, 1982 Webb <i>et al.</i> , 1984
---	--

B= brote; C= callo; E= embrión; E cot= embrión cotiledonar  
 ES= embriones somáticos; Esperm= espermatogénesis; Lb= base de hoja; h= hoja joven; H= hoja de planta madura; Hip= hipocótilo; inm= inmaduro; M= megagametofito; Masc= eje cono masculino; Micfls= microsporófilas; Mcspg= microsporangios; N= nucela; Ov= óvulo; P= pecíolo; p= pecíolo de foliolo; R= raíz; R cor= raíz coraloides; rH= ráquis de hoja; r= radícula; TP= tubo polínico  
 - = sin respuesta.

Tabla 12. Embriogénesis somática en Cícadas

Especie	Explante	Referencias
<u>Zamia pumila</u>	M M, E E E M, N, E	LaRue, 1948; 1954 Norstog, 1965 Norstog y Rhamstine, 1967 Webb <i>et al.</i> , 1983 Chávez <i>et al.</i> , 1992b
<u>Zamia fischeri</u>	M, E	Chávez <i>et al.</i> , 1992b
<u>Zamia furfuracea</u>	M, E	"
<u>Ceratozamia hildae</u>	M, E	Chávez <i>et al.</i> , 1992a
<u>C. mexicana</u>	M	De Luca <i>et al.</i> , 1979
<u>C. mexicana</u> var. <u>robusta</u>	M, E  H	Chávez <i>et al.</i> , 1992a  Chávez <i>et al.</i> , 1992c

E= embrión cigótico; H= hoja inmadura de planta adulta;  
 M= megagametofito; N= nucela

### **Embriogénesis Somática en Coníferas**

Sólo a partir de tejidos embrionicos se han iniciado cultivos embriogénicos de coníferas (Tabla 10): embriones cigóticos inmaduros extraídos de semillas colectadas durante su período de maduración, embriones cigóticos maduros disectados de semillas almacenadas y tejidos de plántulas. Además, se han utilizado megagametofitos de distintas coníferas. El primer comunicado sobre embriogénesis somática fué a partir de embriones cigóticos inmaduros de Picea abies (Hakman *et al.*, 1985) y fué seguido en breve por la inducción de embriones haploides asexuales a partir de megagametofitos de Larix decidua (Nagmani y Bonga, 1985). Durzan y Durzan (1991) aplicaron una terminología para discernir entre los distintos tipos de poliembriónía (Tabla 13) dependiente de la naturaleza del tejido o estructura original y utilizaron el término poliembriogénesis para identificar y enfatizar el proceso (poliembriónía cigótica o somática) que ocurre en cultivos *in vitro* de embriones cigóticos o somáticos de coníferas, sin que intervenga una fase de callo. Este proceso ocurre como resultado de la gemación o división de embriones cigóticos o somáticos (poliembriónía por división o poliembriogénesis).



Tabla 13. Orígenes y características de las poliembrionías cigótica y somática \*.

Tipo	Origen	Genotipo recuperado
Simple (policigótica)	varios huevos en un megagametofito	variable, debido a la fertilización
División o gemación (cigótica o somática)	formación de múltiples embriones por segmentación de un embrión, comúnmente con un estado de núcleos libres	idénticos a la nueva generación
Esporofítica (falsa poliembrionía)	1. varios megagametofitos	variable, basada en el genotipo materno
	2. gemación del nucelo, etc.	"
	3. explantes de fases embrionaria, juvenil y/o madura	variación (somaclonal) basada en el genotipo fuente
Gametofítica	1. megagametofitos	variable, basada en el genotipo materno
	2. microgametofito	variable, basada en el genotipo paterno y posible polispermia.

\* Durzan y Durzan (1991).

El estado de madurez influye en la frecuencia de inducción, la cual decrece conforme la semilla madura (Becwar et al., 1990; Lainé y David, 1990 citados por Attree y Fowke, 1991). En especies de Pinus los embriones en un estado precotiledonario son más morfogenéticos; en Picea responden mejor los embriones en las primeras etapas cotiledonarias (Attree y Fowke, 1991).

A partir de embriones maduros se han podido generar cultivos embriogénicos con semillas almacenadas unos cuantos meses y hasta por 10 años o más (Tremblay, 1990 citado por Attree y Fowke, 1991). Pero en comparación con los embriones inmaduros las condiciones para la inducción son más restrictivas y el proceso es más tardado (Gupta y Durzan, 1986)

La inducción de cultivos embriogénicos a partir de plántulas, se ha logrado precultivando en medio con una citocinina, generalmente BA. Los explantes utilizados han sido cotiledones de Picea abies (Lelu et al., 1987 citados por Attree y Fowke, 1991), Sequoia sempervirens (Bourgard y Fabre, 1988); explantes del brote de Picea mariana (Attree et al., 1990).

Los cultivos embriogénicos de megagametofitos son haploides y dado que éstos son derivados del gametofito y no de tejidos somáticos los embriones que se forman se denominan asexuales. Los megagametofitos de L. decidua que fueron propicios para la inducción embriogénica se colectaron 4 semanas después de la fertilización (Nagmani y Bonga, 1985). También a partir de megagametofitos de Picea abies se regeneraron embriones haploides (Simola y Santanen, 1990 citados por Attree y Fowke, 1991).

Entre los principales medios de cultivo utilizados se encuentran (Tabla 14) W, LP, MS, SH, DCR, enriquecidos con hidrolizado de caseína, glutamina, myo-inositol. En general los medios contienen altos niveles de sales y de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  (Thorpe, 1988 citado por Thorpe et al., 1991).

Tabla 14. Medios de cultivo utilizados para la inducción de embriones somáticos en cícadas y \*coníferas .

Especie	Medio basal	Referencias
<u>Ceratozamia hildae</u>	B5 modif	Chávez <u>et al.</u> , 1992a
<u>C. mexicana</u>	W modif	De Luca <u>et al.</u> , 1979
<u>C. mexicana</u> var. <u>robusta</u>	B5 modif	Chávez <u>et al.</u> , 1992a,c
<u>Zamia fischeri</u>	B5 modif	Chávez <u>et al.</u> , 1992b
<u>Z. furfuracea</u>	B5 modif	Chávez <u>et al.</u> , 1992b

Tabla 13. (continuación)

<u>Z. pumila</u>	W	LaRue, 1948
	W modif y Norstog	Norstog, 1965
	MS modif	Norstog y Rhamstine, 1967
	MS	Webb <i>et al.</i> , 1983
	B5 modif	Chávez <i>et al.</i> , 1992b
<u>Abies alba</u>	SH	Schuller <i>et al.</i> , 1989
<u>Larix decidua</u>	L	Nagmani y Bonga, 1985
<u>L. x eurolepis</u>	MS modif	Klimaszewska, 1989a
<u>Picea abies</u>	LP y 59	Hakman y von Arnold, 1985
	MS 50%	Gupta y Durzan, 1986a
	LP y 59	von Arnold y Hakman, 1986
	MS	Krogstrup, 1986
	LP	Wann <i>et al.</i> , 1987
	CD	Lelu <i>et al.</i> , 1987
	LP 50%	von Arnold y Hakman, 1988
	LP 50%	Jain <i>et al.</i> , 1988
	MS 50%	Verhagen y Wann, 1989
	-	Simola y Santanen, 1990
<u>Picea glauca</u>	LP	Attree <i>et al.</i> , 1987
	L 50%	Tremblay, 1990
<u>Picea mariana</u>	LP, LP 50%	Tattorus <i>et al.</i> , 1990
	L 50%	
	LP	Attree <i>et al.</i> , 1990
<u>Picea sitchensis</u>	LP 50%	von Arnold y Woodward, 1988
	MS 50%	Krogstrup <i>et al.</i> , 1988
<u>Pinus caribaea</u>	LP 50%	Lainé y David, 1990
<u>Pinus lambertiana</u>	DCR 50%	Gupta y Durzan, 1986b
<u>Pinus strobus</u>	DCR	Finer <i>et al.</i> , 1989
<u>Pinus taeda</u>	MS 50%	Gupta y Durzan, 1987a
	DCR	Becwar <i>et al.</i> , 1990
<u>Pseudotsuga menziesii</u>	DCR 50%	Durzan y Gupta, 1987
<u>Sequoia sempervirens</u>	MS 50%	Bourgkard y Favre, 1988

\* Attree y Fowke (1991)

CD= Campbell y Durzan (1975); DCR= Gupta y Durzan (1986b);  
L= Litvay *et al.* (1981); LP= von Arnold y Eriksson (1981);  
MS= Murashige y Skoog (1962); Norstog= Norstog y Smith (1963);  
W= White (1943); 59= MS modificado por Linsmaier y Skoog (1965),  
utilizado por Norstog y Rhamstine (1967).

La sacarosa se ha incluido usualmente en 30 mM hasta 100 mM. Altas concentraciones de sacarosa mejoraron el desarrollo de embriones somáticos de Pinus strobus (Finer *et al.*, 1989 citados por Tremblay y Tremblay, 1991). Durante la embriogénesis somática los requerimientos de carbohidratos pueden variar con el estado de

desarrollo (Thompson y Thorpe, 1987 citados por Tremblay y Tremblay, 1991).

Usualmente se requiere de una auxina, comúnmente 2,4-D o ANA hasta 50  $\mu\text{M}$ , para inducir el proceso. Posiblemente también sea necesaria la presencia de una citocinina, Kinetina o BA hasta 25  $\mu\text{M}$ .

No se requieren otras fitohormonas durante la inducción de la embriogénesis, pero durante la maduración el ABA resulta benéfico y promueve el almacenamiento de lípidos y proteínas (Hakman y von Arnold, 1988). Dunstan *et al.* (1988) utilizó ABA 8-12  $\mu\text{M}$  durante 35 días antes de subcultivar embriones de *Picea glauca* a medio sin hormonas. Attree *et al.* (1990b) comparó un rango de concentraciones de ABA durante la maduración de embriones somáticos de *Picea glauca* y *P. mariana*. Observaron que exposiciones cortas a ABA 32  $\mu\text{M}$  no fueron tan efectivas como utilizar 16  $\mu\text{M}$  durante 28 días.

El establecimiento en suelo está probablemente determinado por la calidad del embrión somático maduro, ya que éste germina en ausencia del megagametofito nutritivo esto pueda limitar el vigor de las plántulas. Con varias especies de *Picea* fué requisito adicionar sacarosa (Becwar *et al.*, 1989). En varias especies de *Pinus*, los embriones somáticos y cigóticos disectados después de germinar fueron considerablemente más pequeños y su establecimiento en suelo fué difícil. Entre las especies que han sido establecidas en suelo se encuentran *Picea glauca*, 18% (29/160), *P. mariana* 60% (160/265) (Attree *et al.*, 1990); *Picea sitchensis* 50% de los embriones germinaron y 90% de éstos se establecieron en suelo (Krogstrup, 1990).

Los cultivos embriogénicos de las coníferas son translúcidos a

blancos y tienen un brillo debido al mucílago que producen. Los cultivos embriogénicos consisten de embriones somáticos en distintas etapas de desarrollo, pero de manera notoria se encuentran estructuras con una región embrionaria subtendida por células alargadas del suspensor. Los embriones somáticos forman más embriones por (poliembriogénesis) división, directamente sin la proliferación de callo.

**Desarrollo del embrión somático en Larix decidua**

von Aderkas y Bonga (1988) observaron que a partir del callo formado de megagametofitos se originaron células alargadas que emergían de él, éstas se dividieron generando agregados laxos de células pequeñas con denso citoplasma (microcallo). A su vez se dividieron originando células largas que radiaban en todas direcciones y después se dividían terminalmente produciendo agregados de células pequeñas. Estas divisiones desiguales se presentan después de que el núcleo y la mayor parte del citoplasma migraron hacia el extremo distal de la célula larga, entonces el núcleo se divide y se forma una pared celular, produciéndose una célula pequeña con denso citoplasma en el extremo distal de una célula larga.

Esta alternancia de células largas y cortas se repite varias veces resultando una red de agregados interconectados de células largas y cortas que se observa como un callo laxo blanquecino. Eventualmente los agregados se dividen en una forma polarizada generando hileras de células largas en una dirección formando un haz laxo de células largas semejante a un suspensor. Las células meristemáticas continúan dividiéndose y constituyen una masa de células

embrionales.

von Aderkas y Bonga (1988) observaron un segundo tipo de desarrollo en el que muchas células largas no completaron la citocinesis, obteniéndose células binucleadas, cuyos núcleos nuevamente se dividieron y formaron un coenocito tetranucleado. Entonces los núcleos migraron hacia un polo de la célula larga, se formaron paredes celulares entre todos los núcleos y la parte restante de la célula original, resultando una estructura polarizada con 4 células completas y una célula vacuolada sin núcleo.

Las células con núcleo se dividieron formando un agregado de células pequeñas con denso citoplasma que entra a los ciclos en que de él radian células alargadas; los agregados de células pequeñas se volvieron más organizados. Las células se unieron más unas a otras conformando una estructura densamente empacada en forma de domo y desarrolló una epidermis. El extremo basal del domo se formó de las células del suspensor. Este es el primer estado claramente reconocible como un embriode.

El suspensor continúa creciendo y se vuelve muy largo.

La organización de las células cortas en una masa polar formando células largas en una dirección provee la indicación más temprana de la formación de un embriode. Una vez polarizados los agregados celulares los cuales se asemejan a embrioides tempranos y suspensores, el desarrollo subsecuente es similar al de la embriogénesis cigótica (Rhor *et al.*, 1989). Este embriode temprano (inmaduro) eventualmente adquiere color verde y produce un brote y una raíz.

Los cultivos embriogénicos de coníferas contienen embriones

inmaduros equivalentes a los estados iniciales de desarrollo del embrión cigótico (Fig. 21E), pero se ha sugerido que también incluye etapas de proembrión. Por ejemplo, Gupta y Durzan (1987a) y Durzan y Gupta (1987) observaron núcleos libres en células de Pinus taeda y Pseudotsuga menziesii en cultivos en suspensión. En L. decidua (von Aderkas y Bonga, 1988) se describieron coenocitos de 4 núcleos que pueden ser los progenitores de nuevos embriones. Estos autores sugieren que las células multinucleadas se aproximan a los estados iniciales de núcleos libres en la embriogénesis cigótica. Sin embargo, los estados de núcleos libres observados in vitro no fueron secuencialmente seguidos durante la migración nuclear y del desarrollo del proembrión en embrión. Para claramente demostrar que representan verdaderos estados de proembrión, estos eventos necesitan ser completamente documentados.

#### **Desarrollo del embrión cigótico en coníferas**

Después de la fertilización y por un breve lapso, el embrión presenta un estado de núcleos libres (Norstog, 1982). Durante el desarrollo del embrión cigótico en coníferas (Fig. 21 A-E) (Attrey y Fowke, 1991), la división del núcleo del cigoto resulta en 2, luego en 4 núcleos libres que migran al extremo del proembrión opuesto a las células del cuello. Los núcleos se orientan en una sola hilera y cada núcleo se divide. Se forman paredes celulares entre los 8 núcleos formando 2 hileras de 4 células; sin embargo, las paredes celulares de la hilera proximal permanecen abiertas al citoplasma del "huevo". Cada célula se divide otra vez, formando un

proembrión de 16 células consistente de 4 hileras de 4 células cada una. El estado proembrional se completa cuando la tercera hilera del "suspensor" se alarga empujando las células embrionales al interior del tejidos del megagametofito. El extremo distal del suspensor se separa en varios suspensores secundarios, cada uno de los cuales termina en una yema embrional (poliembriogénesis). No obstante es común que sólo un embrión se desarrolle hasta la madurez y dependiendo del género puede ser dico- o policotiledóneo. Ocasionalmente dos o más embriones se desarrollan.

#### MORFOGENESIS IN VITRO DE CICADAS

Estudios sobre el cultivo in vitro de C. mexicana se registran en las revisiones que han sido realizadas por Norstog, 1982; Webb y Osborne, 1988. Osborne, 1988, 1990 (Tabla 10). Como antecedentes de los estudios de morfogénesis de cicadas DuChartre (1888 citado por La Rue, 1948) describió la producción de raíces a partir de megagametofitos de Cycas thouarsii R. Br. los cuales no contenían un embrión y habían estado mucho tiempo en la cama de germinación. Posteriormente Coulter y Chrysler (1904 citados por Norstog, 1967) observaron que plantas completas de Zamia integrifolia Ait. (= Z. pumila L.) se habían regenerado de secciones del tallo tuberoso subterráneo.

Tradicionalmente se sabe que cuando una hoja completa de cicada es removida de la planta y es colocada en un medio poroso y cálido en su base ocurre la formación de callo y ocasionalmente de raíces (Osborne, 1988). Los actuales métodos de propagación vegetativa involucran el enraizamiento de ramas laterales e hijuelos de la base de la planta.



Muchas de la investigaciones pioneras en la morfogénesis experimental de cícadas se realizaron para estudiar distintas etapas de su desarrollo. Sólo después se establecieron como posibles rutas para la regeneración de estas especies amenazadas (Tabla 11).

Los primeros estudios sobre morfogénesis de cícadas fueron realizados por LaRue en 1948 quien cultivó megagametofitos (haploid) de *Zamia pumila* L. (= *Z. floridana* A. DC.) en medio White (1943) y regeneró raíces, brotes y un solo embrión somático, el primero descrito en la literatura (Tabla 11). La Rue (1948) cita: "...the outgrowths could be identified as roots or shoots. In one example a short axis grew out from the gametophyte and then formed a bud above and a root below, showing a marked resemblance to a *Zamia* seedling in miniature. In all others, roots and shoots arose separately". En nuestra opinión, La Rue describió de manera sencilla y clara la presencia de un solo embrión somático que había germinado ya en una plántula, no le llamó embrión probablemente porque no observó una etapa temprana.

La Rue (1954) en cultivo de megagametofitos de *Z. pumila* obtuvo crecimientos esféricos que formaban raíces y hojas. En la misma publicación describió la formación de yemas y raíces en megagametofitos de *Cycas revoluta* Thunb..

Norstog, alumno de La Rue, continuó las investigaciones con *Z. pumila* (= *Z. integrifolia* Ait.) y confirmó la regeneración en cultivos de megagametofitos y embriones (Norstog, 1965). En una variedad de modificaciones del medio White (1943) fundamentalmente con 2,4-D, AIA, Kinetina, glutamina, asparagina y alanina logró

regenerar raíces, hojas y embriones somáticos. Los mejores resultados los encontró en un medio 8, diseñado para el cultivo de embriones inmaduros de cebada (Norstog y Smith, 1963) conocido como medio Norstog.

Norstog (1965) analizó el número cromosómico en raíces producidas por megagametofitos comprobando su haploidía ( $1n=8$ ); los embriones somáticos que logró obtener presentaban 2 cotiledones y su desarrollo, aparentemente, fué similar al descrito por La Rue (1954 citado por Norstog, 1965) quien describió que a partir de megagametofitos se formaban crecimientos esféricos que denominó pseudobulbillos que eventualmente se transformaban en pequeñas plántulas con 2 hojas y un pequeño tallo. Ni La Rue (1948, 1954) ni Norstog (1965) describieron suspensores asociados a los embriones somáticos de Zamia pumila. En sus objetivos Norstog decididamente planteó utilizar estas técnicas "... to obtain increased production of apogamous organs... a better understanding of factors governing apogamy in Zamia has been sought". Esto revela su perspectiva sobre el potencial de estos estudios y técnicas que sólo en los últimos años han tendido hacia la regeneración como una medida para la conservación de las especies.

La Rue (1948; 1954) debe ser considerado el primer investigador en descubrir la embriogénesis somática in vitro, pues las descripciones de Steward et al. (1958) y de Reinert (1958) ocurrieron 10 años más tarde. Estos logros han demostrado tener profundas implicaciones en el conocimiento de los procesos de crecimiento y desarrollo, la multiplicación y el mejoramiento de otras especies de gimnospermas y angiospermas (Norstog, 1987)

Las investigaciones han sido enfocadas, generalmente, a la especie Z. pumila y a utilizar principalmente material proveniente de semillas como son embriones cigóticos y megagametofitos. Norstog y Rhamstine (1967) cultivaron embriones cigóticos inmaduros y megagametofitos en medios White (1943) y MS modificados, lograron inducir embriogénesis somática mediante 2,4-D y K. Megagametofitos de Cycas circinalis L. sólo formaron callo.

Más tarde Webb et al. (1983) describieron el potencial morfogénico de embriones cigóticos de Z. pumila cultivados in vitro. Al lograr obtener embriones somáticos, brotes y raíces a partir de callo generado en medio MS con ANA y BA.

De Luca et al. (1979) examinaron la regeneración en megagametofitos de C. mexicana, Cycas revoluta y Encephalartos umbeluziensis. Las estructuras que fueron identificadas como pseudobulbillos o embriones globulares en cultivos de C. revoluta, posteriormente fueron descritos como nódulos de raíces coraloides (De Luca et al., 1980). Y de acuerdo a Webb y Osborne (1988) las estructuras embrionarias regeneradas de C. mexicana tenían más semejanza con brotes adventicios.

A partir de megagametofitos y embriones cigóticos de C. hildae, C. mexicana var. robusta (Chávez et al., 1992a) y de Z. fischeri, Z. furfuracea y Z. pumila (Chávez et al., 1992b) se logró inducir la formación de órganos (brotes y raíces) y de embriones somáticos en los que se describió por primera vez la presencia de suspensores en este tipo de regenerantes de cícadas.

Los estudios con tejidos somáticos sólo habían resultado en la formación de callo hasta que Osborne y van Staden (1987) publicaron

su investigación sobre la regeneración de brotes a partir de secciones de raíz de plántulas de la especie Sudafricana Stangeria eriopus. Henson (1980) menciona que a partir de hojas de Zamia sp. se formaron raíces.

Recientemente se logró inducir embriogénesis somática a partir de hojas inmaduras de individuos adultos de Ceratozamia mexicana var. robusta (Chávez et al., 1992c), resultado que tiene fuertes implicaciones para la regeneración de otras cícadas y coníferas. El proceso de regeneración descrito en dicho trabajo concuerda con lo observado en Ceratozamia spp. y Zamia spp. (Chávez et al., 1992a,b,) con lo cual el patrón morfológico de embriogénesis somática demostrado en estas especies se asemeja al que fué descrito para la regeneración a partir de callo derivado de embriones cigóticos de Picea abies (Hakman et al., 1985) y de megagametofitos de Larix decidua (Nagmani y Bonga, 1985). La iniciación del proembrión fué seguida por la elongación de un suspensor y después un embrión cotiledonar se desarrolló en el extremo distal de cada suspensor.

El proceso de embriogénesis somática resulta mejor comprendido si se le compara con los eventos que ocurren en el desarrollo del embrión cigótico en cícadas, así como en coníferas y con los eventos de embriogénesis somática en coníferas.

**Desarrollo del embrión cigótico en cicadas.**

De acuerdo a Chamberlain (1957) y a Norstog (1982), después de la fertilización hay un período de divisiones de núcleos libres que pueden llegar a 1024, dependiendo de la especie. En Zamia pumila es de 256 y en Bowenia serrulata es de 64, que es el menor número encontrado en cicadas. En otras gimnospermas el número puede ser de 4. El estado de núcleos libres es aparentemente una consecuencia del considerable crecimiento del huevo.

Después de que los núcleos han aumentado hasta un número en que hay una pequeña cantidad de protoplasma para cada uno, entonces empieza la formación de paredes celulares y el embrión se vuelve celular. Cientos de células se forman antes de la diferenciación de las partes del cuerpo. La primera estructura en diferenciarse es el suspensor como producto de la elongación de las células que forman una fila o haz de varias hileras de células tubulares. El suspensor continúa creciendo y eventualmente se distingue en él un botón compacto de células pequeñas en el extremo distal. Las regiones del cuerpo y en general el desarrollo de todo el embrión ocurre lentamente. Las células son muy uniformes aún después de que son distinguibles los cotiledones y la coleoriza. El embrión maduro es dicotiledóneo, en ocasiones se presentan 3 cotiledones como en Encephalartos. Ceratozamia puede presentar 1 o 2 cotiledones. C. mexicana es monocotiledónea, sin embargo, Chamberlain (1957) cita que el embrión se desarrolla como dicotiledóneo si se disecta y se cultiva en un clinostato. Por alguna razón el crecimiento de un cotiledón se suprime *in vivo*.

No hay requerimientos de post-maduración y la germinación ocurre

cuando el embrión ha madurado y existe un sustrato adecuado. No retienen su viabilidad mucho tiempo. Algunas semillas germinan después de 1-2 años. Usualmente después de surgir la radícula aparece una sola hoja, en tanto parte de los cotiledones salen de la semilla pero la mayor parte permanecen dentro del megagametofito.

Los estudios sobre morfogénesis experimental en cícadas han demostrado que la regeneración ocurre vía organogénesis o de embriogénesis somática. Aunque las características morfológicas pueden bastar para reconocer la naturaleza de las estructuras regenerantes éstas llegan a ser limitadas para un reconocimiento pleno, como ocurrió en el estudio de De Luca *et al.* (1979) en el cual las estructuras regeneradas fueron identificadas erróneamente como embriones somáticos. Un análisis histológico revelaría la identidad de tales estructuras así como las semejanzas y diferencias respecto al mismo proceso morfogenético en otras gimnospermas.

Las cícadas son recalcitrantes en términos de regeneración in vitro, como lo demuestran los resultados en la Tablas 11 y 12, pero a la vez revelan que con base en la experimentación el potencial morfogenético ha podido ser expresado (mayoritariamente) en explantes ovulares, vía organogénesis y de embriogénesis somática. A partir de tejidos somáticos de plántulas existe sólo un reporte de organogénesis (Osborne y van Staden 1987), en tanto que de tejidos de plantas adultas, a la fecha no existía una sola publicación.

El resultado de los estudios sobre morfogénesis experimental in vitro en el resto de las Gimnospermas es similar, la capacidad morfogenética de los explantes se reduce al aumentar la madurez de los embriones y es menor aún en tejidos somáticos de plántulas y de individuos adultos (Attree et al., 1990). Se ha demostrado que el problema es muy complejo, en el cual debe prestarse más atención a la selección del explante, en las condiciones de cultivo, en el manejo de los reguladores de crecimiento, de los medios nutritivos y de los tiempos de aplicación de estas condiciones (Durzan y Durzan, 1991).

Lograr la regeneración in vitro de gimnospermas a partir de estructuras vegetativas de individuos adultos a través de la embriogénesis somática representa un enorme reto por alcanzar, pero también significa la posibilidad de llegar a aprovechar el potencial de identificar y propagar fenotipos de interés ya existentes en la naturaleza, o bien de modificar su genotipo y multiplicarlo en forma clonal (Gupta y Durzan, 1986).

Ceratozamia mexicana var. robusta es una especie amenazada de extinción a la que el cultivo de tejidos podría ayudar a su conservación y a obtener un mayor conocimiento de la misma. Su capacidad morfogenética demostrada a partir de megagametofitos y embriones cigóticos, aunado a la regeneración de brotes a partir de raíces de plántulas de Stangeria eriopus, son avances que impulsan a explorar la posibilidad de promover el potencial regenerativo in vitro de estructuras somáticas de plantas maduras.

**OBJETIVOS**

Por lo anteriormente expuesto los objetivos del presente estudio fueron:

- 1.- Establecer las condiciones de cultivo in vitro para la inducción de respuestas morfogénicas (raíces, brotes, o embriones somáticos) a partir de hojas inmaduras de plantas adultas de C. mexicana var. robusta (Miq.) Dyer.
- 2.- Determinar la presencia y concentraciones de etileno acumulado en cultivos de callos como un primer ensayo para tratar de encontrar en un futuro una posible relación de tales concentraciones con el potencial de regeneración de estructuras organizadas.
- 3.- Realizar un estudio histológico para determinar la identidad de las estructuras regeneradas.



**MATERIALES Y METODOS****- Embriogénesis somática a partir de folíolos.**

De la colección de cícadas del Fairchild Tropical Garden, Miami, U.S.A, a partir de plantas femeninas adultas, ca. 25 años, con estróbilos en maduración se colectaron hojas jóvenes (0.9-1.0 m long) el 30 de Diciembre de 1987. Los folíolos median de 3-30 mm long fueron disectados y lavados 1-2 min con agua corriente. Subsecuentemente sumergidos durante 5 min en una solución de detergente suave, en agitación. Fueron desinfectados con etanol 70%, 30 segundos seguido de NaOCl 10% (v/v) con 2-3 gotas del emulsificante Tween-20 (polyoxyetileno sorbitan monolaurato) por cada 100 ml de solución y se mantuvieron en agitación durante 20 min . Los explantes fueron enjuagados 2 veces con agua destilada esterilizada antes de ser sembrados asépticamente. Los folíolos fueron cultivados en cajas de petri en medio nutritivo semisólido (Tabla 15), consistente en los macronutrientes del medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968), los micronutrientes y compuestos orgánicos del MS (Murashige y Skoog, 1962), con sacarosa 60 g/l y suplementado con distintos compuestos orgánicos de acuerdo a Norstog y Rhamstine (1967): glutamina 400 mg/l, hidrolizado de caseína 100 mg/l, arginina 100 mg/l, asparagina 100 mg/l y ácido ascórbico 100 mg/l. Después de 2 semanas los explantes libres de contaminación microbiana fueron subcultivados a medio fresco con la misma formulación pero adicionado de las combinaciones hormonales de Kinetina (K) (0, 1, 2, 3 mg/l) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/l). Fueron sembrados 4 folíolos/caja de petri, con 5

réplicas por cada tratamiento (total 20 explantes/tratamiento). El experimento fué repetido una vez con el mismo número de explantes, réplicas y tratamientos. Los medios de cultivo fueron solidificados con Difco Bacto agar 8 g/l. El pH fué ajustado a 5.7 previo a la adición de agar y a la esterilización en autoclave a 121°C, 1.1 kg/cm<sup>2</sup>, 15 min . Los cultivos fueron incubados en oscuridad, 25°C y subcultivados a intervalos de 3 meses durante el primer año, al término del cual los cultivos se trasladaron al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, U.N.A.M., donde se continuó este estudio, Entonces fueron transferidos a frascos de 120 ml, con boca ancha cerrados con una tapa de plástico y sellados con Ega-pack. Los cultivos en diferenciación fueron cambiados a medio sin reguladores del crecimiento. Los embriones somáticos se mantuvieron en oscuridad. Algunos fueron pasados a fotoperíodo de 16 h, 1000 lux.

Tabla 15. Medio de Cultivo Basal, B5 Modificado

Macronutrientes B5	mg/l	Micronutrientes MB	mg/l
KNO <sub>3</sub>	2 500	KI	0.83
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.3
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	150	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
		CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
		CoSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
		Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
		FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
<b>Compuestos Orgánicos</b>	<b>mg/l</b>		
Inositol	100		
Acido nicotínico	0.5		
Piridoxina-HCl	0.5		
Tiamina-HCl	0.1		
Glicina	2.0		
Glutamina	400		
Hidrolizado de Caseína	100		
Arginina	100		
Asparagina	100		
Acido Ascórbico	100		
Sacarosa	60 g/l		
Bacto agar	7 g/l		
pH	5.7		

Debido a que los fragmentos de cultivos inicialmente embriogénicos se convirtieron en callo compacto no embriogénico en las condiciones en que se ensayaron las distintas concentraciones de sacarosa y ABA, así como en los cultivos para las determinaciones de etileno, no fué posible realizar observaciones sobre los cambios de morfología y frecuencia de embriones que con la sacarosa, el ABA y el AgNO<sub>3</sub> se pretendían conseguir. Por lo cual sólo se realizaron determinaciones en el crecimiento, estimado como el volumen de los callos.

- Cultivos embriogénicos en medios con ( K/2,4-D 1/1 mg/l) y sin reguladores del crecimiento (0/0), en presencia de distintas concentraciones de sacarosa.

Secciones de cultivo embriogénico (12-18 mm<sup>3</sup>), de apariencia nodular, amarillento, con áreas hialinas y oxidadas se colocaron sobre: 1) cilindros de medio nutritivo, de 25 mm diam x 10 mm espesor, con 0, 3, 6 o 12% de sacarosa, respectivamente en medio con fitoreguladores (HS0, HS3, HS6, HS12) y sin reguladores del crecimiento (S0, S3, S6, S12) y 2) asimismo, también fueron sembradas secciones del cultivo embriogénico sobre pilas de delgados cilindros de medio, de 25 mm diam x 3 mm espesor, colocados uno sobre otro en orden creciente a su concentración de sacarosa, estando en la base el medio sin sacarosa (0%) encima el de concentración 3%, seguido por el de 6% y 12% en la parte más alta. Lo cual se hizo con medio sin (S0-12) y con fitoreguladores (HS0-12). Los cultivos se incubaron a 25°C en oscuridad 7 meses. Fueron sembradas 5 secciones/caja de petri y 4 réplicas / tratamiento.

- Cultivos embriogénicos en medio basal adicionado de Acido Abscísico (ABA).

Secciones de 12-18 mm<sup>3</sup> de cultivo embriogénico mantenidos (1 mes) en medio sin K/2,4-D fueron subcultivadas a medio con ABA 0 (A0), 1 (A1), 5 (A5) y 20 (A20) µM, durante 3 meses. Posteriormente se pasaron a medio sin reguladores de crecimiento y dos meses después se hizo una segunda medición del volumen de

los cultivos embriogénicos. Fueron sembradas 5 secciones de cultivo embriogénico/caja de petri; 4 réplicas/tratamiento. Se realizaron subcultivos a medio fresco cada 1.5 meses y se incubaron a 25°C, en oscuridad.

**- Determinación de etileno en cultivos embriogénicos**

Fragmentos de 12-18 mm<sup>3</sup> de cultivo embriogénico en medio nutritivo con K 1 mg/l y 2,4-D 1 mg/l (1/1), se subcultivaron a medios con la misma formulación: 1/1 y sin fitoreguladores (0/0). Se adicionó AgNO<sub>3</sub> 0, 5 y 10 µM lo que permitió establecer 6 distintos tratamientos: 0/0 (M0); 0/0 5 (M5); 0/0 10 (M10), 1/1 (MH0); 1/1 5 (MH5) y 1/1 10 (MH10) (Tabla 16). Las resiembras se hicieron en frascos incoloros, tipo antibiótico, de 60 ml de capacidad, 10 ml de ellos ocupados por medio de cultivo. Fueron cerrados con un tapón de hule y sellados con 5 vueltas de Parafilm.

Se sembró una sección de cultivo embriogénico/frasco; 30 frascos/tratamiento además, para cada tratamiento se prepararon 30 frascos testigos con sólo medio de cultivo, sin inóculo. La incubación se realizó, a 25°C, en oscuridad.

En el Instituto de Química, UNAM, se realizaron las determinaciones de las concentraciones de etileno en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 con detector de ionización de flama, columna Porapak Q (relleno de polímero poliestireno de vinil benceno) de 6 ft x 1/8 in; N<sub>2</sub> como gas acarreador en flujo de 27 ml/ min. Mediante una jeringa (Precision Sampling Co.) se tomaron de los frascos, alícuotas de

0.5 ml de la atmósfera interna y se analizaron en el cromatógrafo.

Las mediciones se realizaron cada 15 días, durante 3 meses, en lotes de 10 frascos de cada tratamiento (5 con inóculo y 5 testigos). Se compararon los resultados entre tratamientos.

Tabla 16. Tratamientos aplicados durante el periodo (90 días) de medición de concentraciones de etileno en cultivos embriogénicos de hojas de Ceratozamia mexicana var. robusta \*

Tratamientos		Tiempo (días)					
K/2,4-D (mg/L)	AgNO <sub>3</sub> (μM)	15	30	45	60	75	90
0/0							
0/0	+	5					
0/0	+	10					
1/1							
1/1	+	5					
1/1	+	10					

\*Cultivos generados en medio B5 modificado con K/2,4-D 1 mg/l; oscuridad, 27±2°C

#### - Análisis Estadístico.

Se compararon los resultados entre tratamientos, por lo que para todos los casos, se trabajó con una hipótesis nula (H<sub>0</sub>) en la cual se estableció que no había efecto en las variables de respuesta (crecimiento, concentraciones de etileno) dentro de los diferentes tratamientos a los que se sometieron los cultivos embriogénicos de C. mexicana. Asimismo, en la hipótesis alternativa (H<sub>1</sub>) se estableció que si había efecto del (los) tratamientos sobre las variables de respuesta (crecimiento, concentración de etileno) en los cultivos embriogénicos de C. mexicana.

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía, éste análisis se realizó con 95% de confiabilidad, por lo que si el nivel de significancia  $P > 0.05$  no habría diferencias significativas debidas a los tratamientos, entonces se aceptaría la  $H_0$  para rechazar la  $H_1$ .

**- Análisis histológico.**

Se realizó en el Laboratorio de Citología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M.. Muestras de cultivos embriogénicos fueron procesadas para su inclusión en JB4 y posteriormente seccionadas en un ultramicrotomo con cuchillas de vidrio. A continuación se describe la metodología utilizada.

Fijación.- Porciones de cultivos embriogénicos hialino-amarillentos fueron fijados en oscuridad, a temperatura ambiente durante 4 días en Solución de FAA.

Formaldeído	10 ml
Alcohol Etilico 96%	50 ml
Acido Acético Glacial	5 ml
Agua Destilada	35 ml

Al inicio de este tratamiento se aplicó vacío durante 20 min para asegurar y acelerar la entrada del fijador a los tejidos. Después del periodo de fijación las muestras se lavaron con agua corriente durante 10 minutos. Posteriormente se procedió a la deshidratación gradual en alcohol etílico aplicado en concentraciones porcentuales en orden ascendente; 50, 70, 80, 90, 96%, absoluto (2 cambios). El tiempo de tratamiento en cada concentración de etanol fué de 25 min .

Impregnación.- Solución A con Catalizador JB-4.

25 ml de Solución A se mezclaron con 225 mg de Catalizador. Las secciones de cultivos embriogénicos y embriones somáticos se colocaron en esta solución y se incubaron en oscuridad, a temperatura ambiente por 24 h, al inicio de este período se aplicó vacío durante 20 min para promover la penetración a los tejidos.

Inclusión.- Solución A + catalizador + componente B.

Se preparó una solución 25:1, de la solución de impregnación : Componente B. Se requirió de agitación durante 10 min de manera homogénea, pausada y continua con un aplicador de madera, procurando que no se formaran burbujas de aire.

Ya que esta solución solidifica a los 20 minutos el siguiente paso fué depositar rápidamente las muestras de callo y embriones somáticos en cápsulas Beem tamaño 00 para proceder a llenarlas hasta el borde, con ayuda de una pipeta Pasteur, cuidando que no se formaran burbujas. Entonces se procedió a cerrar las cápsulas para permitir que ocurriera la polimerización en ausencia de aire. Se dejó solidificar la solución al menos durante 24 h, en oscuridad y a temperatura ambiente.

Todas las labores con los componentes del proceso JB-4 se realizaron en áreas ventiladas o en una campana de extracción evitando contacto con la piel pues estos reactivos son tóxicos. Los cortes histológicos (6-8 $\mu$ ) se realizaron en un ultramicrotomo, los cortes se colocaron en una caja de Petri con agua destilada para permitir la completa extensión del mismo, posteriormente con ayuda de una ams bacteriológica se colocaron



en un portaobjetos para aplicar el colorante Azul de Toluidina y ser teñidos durante 15 a 30 segundos, inmediatamente después sosteniendo el portaobjetos en posición inclinada los cortes se lavaron con agua destilada para remover el exceso de colorante. Para fijar los cortes al portaobjetos, éste se colocó unos segundos sobre una parrilla caliente.

Después de la observación bajo microscopio aquellas preparaciones elegidas fueron montadas en bálsamo de Canadá y cubiertas con un cubreobjetos.

La toma de fotografías se realizó en un fotomicroscopio Carl Zeiss modelo Fomi II.

#### Preparación del colorante Azul de Toluidina

Azul de Toluidina	1 g
Bórax (tetaborato de sodio)	1 g
Agua destilada	aforar a 100 ml

Disolver los reactivos por separado con calor y agitación, mezclar, hervir 10-20 min, dejar enfriar y reposar 24 h, filtrar, utilizar la solución filtrada.

## RESULTADOS

### Observaciones Morfológicas.

Una vez sembrados los folíolos de las hojas de Ceratozamia mexicana var. robusta rápidamente se tornaron de color café (pardo). Los explantes más grandes (mayores a 5 mm) no formaron callo y murieron, los folíolos apicales, más pequeños (3-5 mm) produjeron callo friable, blanco-amarillento (Fig. 2) en la mayoría de los medios con 2,4-D; sin embargo, el medio óptimo para la iniciación y crecimiento de callo contenía 1 mg/l de K y de 2,4-D (= 1/1) (Tabla 17). El callo rápidamente se volvía café por lo que requirió de frecuentes subcultivos para tratar de evitar su oxidación, aunque ésta pareció no ser letal a todas las células pues posteriormente surgía nuevamente callo blanco-amarillento. Aproximadamente 3 meses después de iniciados los cultivos se habían diferenciado proembriones en todo el callo, pero particularmente en el medio con 1 mg/l de K y de 2,4-D que permitió las mejores respuestas (Tabla 18). Callo en diferenciación fué subcultivado en medio sin fitohormonas, mientras que el callo restante se subcultivó en medio óptimo (1/1) de proliferación e inducción.

Los cultivos embrionarios eran de color amarillo-miel, con zonas cristalinas, hialinas, que contrastaban con áreas pardas oxidadas; eran rugosos, húmedos, friables, nodulares (Fig. 3). Internamente eran suculentos a acuosos incoloros, viscosos de apariencia finamente granular por el contenido de grandes células vacuoladas, transparentes redondas y alargadas, o bien formaban pequeños grupos celulares.

En la superficie de los cultivos embriogénico a simple vista era posible observar proembriones en forma de estructuras nodulares ( $\leq 1$  mm diam.) generalmente hialinos o blanco-amarillentos entremezclados con una trama de filamentos ( $\leq 1$  mm de ancho) o haces de filamentos (Fig. 3), que vistos bajo microscopio resultaron ser largos suspensores de células alargadas transparentes y cuyo extremo libre era un grupo denso de células pequeñas conformando el cuerpo del embrión (Figs. 4, 5, 6, 7). La apariencia rugosa de los cultivos embriogénicos era debida a que de los embriones (principalmente de los suspensores) emergían células transparentes alargadas y grupos de éstas ordenadas en cortos o largos filamentos cristalinos ( $\leq 2$  mm) que en realidad eran más embriones con sus prominentes suspensores (Figs. 4, 5, 6).

En general los cultivos embriogénicos estaban conformados y recorridos por suspensores con estructura semejante a un haz de filamentos, hialinos a amarillentos y con áreas pardas (desechadas), unidos al cuerpo de un embrión o más comúnmente presentaban ramificaciones (suspensores) y en cada una de ellas se encontraba el cuerpo de un embrión (Figs. 4-8, 19). Estos elementos en conjunto tenía forma de saco o de domo y en etapas tempranas eran hialinos.

Se realizó un conteo de embriones somáticos en fase globular ( $\leq 1$  mm diámetro) y en fase cotiledonar (3-7 mm long) tomando como base  $1 \text{ cm}^3$  de callo. En el medio con  $1 \text{ mg/l}$  de K y 2,4-D se encontraron 15-30 embriones somáticos globulares y 1-8 en fase cotiledonar; en tanto que en medio sin hormonas 30-70 embriones

somáticos en fase globular y 1-10 en cotiledonar.

Tabla 17. Efecto de fitohormonas en la iniciación de callo a partir de folíolos de plantas maduras de Ceratozamia mexicana var. robusta

mg/l	Kinetina			
	0	1.0	2.0	3.0
2,4-D	0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0
0.1 °	0.2 ± 0.13	0	0.3 ± 0.15	0.1 ± 0.1
0.5 °	0.3 ± 0.15	0.9 ± 0.23	1.0 ± 0.15	0.3 ± 0.15
1.0 °	1.0 ± 0.26	2.5 ± 0.43	2.2 ± 0.39	1.7 ± 0.47
2.0 °	1.3 ± 0.21	1.7 ± 0.21	1.3 ± 0.15	0.4 ± 0.16

Los datos representan las medias de la producción de callo por frasco de cultivo ±EE. Se cultivaron 4 folíolos en cada frasco con 5 réplicas por tratamiento. El experimento se repitió una vez.

Tabla 18. Efecto de fitohormonas en la embriogénesis somática de callos de folíolos de plantas maduras de Ceratozamia mexicana var. robusta

mg/l	Kinetina			
	0	1.0	2.0	3.0
2,4-D	0	0	0	0
0.1 °	0	0	0	0
0.5 °	0	0.3 ± 0.15	0.2 ± 0.13	0
1.0 °	0.3 ± 0.15	2.5 ± 0.40	1.7 ± 0.42	1.4 ± 0.45
2.0 °	0.4 ± 0.22	1.1 ± 0.31	0.5 ± 0.16	0.3 ± 0.15

Los datos representan las medias de la respuesta embriogénica por frasco de cultivo ±EE. Se cultivaron 4 folíolos en cada frasco con 5 réplicas por tratamiento. El experimento se repitió una vez.

Tabla 19. Desarrollo de cultivos embriogénicos a partir de folíolos de plantas maduras de *C. mexicana* var. *robusta* (1).

TIEMPO (Meses)	VOL. x (R cm <sup>3</sup> )	T R A T A M I E N T O S (2)			VOL. x (R cm <sup>3</sup> )
		0/0	(K/2,4-D)	1/1	
O B S E R V A C I O N E S					
0	0.012 - 0.018			C	0.012 - 0.018
5	0.28 (0.06-0.9)	C, aumento de áreas oxidadas			0.28 (0.06-0.09)
		ES 1-1.5x2-6mm	°	-----	
		cant. 3-7/5mm <sup>2</sup>	°		
			°		
7	1.28 (0.08-6.5)	C, aumentan áreas hialinas			0.26 (0.09-0.9)
		ES 1-2.50x2-7mm	°	-----	
		cant. 4-7/5mm <sup>2</sup>	°		
			°		
			°		
12	4.84 (0.08-18)	C= masa de ES y	°	C	1.11 (0.09-5.0)
		suspensores.	°		
		ES 1-2.5x2-10mm	°	ES anormales	
		cant. 3-12/5mm <sup>2</sup>	°	cant. 8	

(1) = generado en medio B5 modificado; K/2,4-D 1/1 mg/l, oscuridad, 25°C

C= cultivo embriogénico amarillento a hialino, húmedo, nodular, largos suspensores; interior viscoso finamente granular (= células alargadas cristalinas), áreas oxidadas compactas.

ES = embriones somáticos (diámetro x longitud)

cant.= número de embriones/ 5mm<sup>2</sup>

R cm<sup>3</sup> = rango en cm<sup>3</sup>

Muchos proembriones y embriones se desorganizaron completamente, como si hubieran reventado (Fig. 5) y formaron múltiples embriones directamente, sin que se formara callo (Fig. 4, 5, 19). En el medio sin reguladores del crecimiento los cultivos embriogénicos continuaron proliferando y se lograron las mejores condiciones para la elongación de los suspensores (en comparación

con el medio con fitoreguladores 1/1) (Tabla 19). No obstante que el suspensor se hubiera elongado, fué común que el cuerpo del embrión no alcanzara su completo desarrollo y que ambas estructuras se desorganizaran formando más embriones. Así, ciclos de formación de proembriones, crecimiento de los suspensores y su desorganización continuaron durante aproximadamente 15 meses. Casi 1.5 años después de iniciados los cultivos ocurrió un cambio cualitativo en la apariencia de los suspensores. Se formaron suspensores blancos, lisos y de ápice redondeado, forma de domo (Figs. 7, 8). Lo cual llevó a la formación de estructuras regenerantes más avanzadas, que permitieron el desarrollo de embriones somáticos que llegaron a germinar *in vitro* (Figs. 13, 14), aún en esta etapa del desarrollo fué común observar casos de embriogénesis somática secundaria a partir de los suspensores. Los suspensores se alargaron hasta 1 - 1.5 cm y rara vez tuvieron menos de 1 mm diámetro, aunque su longitud y diámetro fueron variables. La estructura de los suspensores algunas ocasiones fué laxa, mostrando estar formados de múltiples filamentos (Figs. 4, 9). El cuerpo del proembrión se observó como un botón o disco compacto, ligeramente fuera del centro en el extremo distal del suspensor, su mayor crecimiento y diferenciación ocurrieron después de que había terminado la elongación del suspensor. Tales embriones presentaban 1.5 - 3 mm ancho, forma de saco, eran blancos, compactos, de superficie firme, lisa y recorridos por surcos a manera de líneas paralelas en sentido longitudinal. El cuerpo del embrión y parte del suspensor que implicaban conjuntamente 3-10 mm de la longitud eran de color blanco denso

que se continuaba hacia la base con una zona translúcido-hialina, seguida del resto del suspensor, casi invariablemente desecado y pardo (Figs. 9, 11, 12).

Los embriones somáticos en etapa precotiledonar (forma de domo) crecieron y adquirieron una condición monocotiledónea o dicotiledónea (Figs. 12,13,14,17). Conforme los cotiledones crecieron, el suspensor se desecó y el polo radicular fué más evidente (Figs. 13,14). La coleoriza en la base del cuerpo del embrión se presentó como un ensanchamiento de dimensiones variables (3 - 6 mm) del que emergería la radícula.

Hubo una variación considerable en el tamaño de los embriones al tiempo de su germinación, con una longitud de 1.5 a 3 cm. La mayoría de estos embriones fueron dicotiledóneos con una coloración decididamente amarillenta a pajiza. La emergencia y elongación de la raíz marcó la germinación de los embriones somáticos y generalmente después de 1 - 2 semanas los cotiledones se separaron y surgió el ápice del tallo, característicamente pubescente (Figs. 11,12,14).

Aún tiempo después de la germinación fué posible observar restos del suspensor completamente desecados y pardos unidos al cuerpo del embrión (Figs. 13,14)

Ocasionalmente ocurrió otro comportamiento en esta etapa, en que los cotiledones unidos estuvieron cubiertos por una estructura semejante a una vaina o coleoptilo. La superficie de dicha cubierta presentaba escamas café-rojizas (Figs. 15,16). Después de la germinación la cubierta se abrió en su ápice y emergieron dos cotiledones lo que indicó que la estructura semejante a una

vaina o coleoptilo no estaba formada por tejido cotiledonario (Fig. 16)

La transferencia de las jóvenes plántulas a condiciones de iluminación generalmente provocó su muerte y sólo en escasas excepciones cotiledones y ápices se volvieron verdes, sin embargo los brotes no se han elongado bajo estas condiciones de cultivo.

#### - Análisis Histológico

Los cortes histológicos de cultivos embriogénicos siempre mostraron estructuras organizadas. Fué común observar secciones parciales (en distintos ángulos) de suspensores y del cuerpo de los embriones, lo cual aunado a la condición vitrificada de éstos, dificultó la interpretación pues los suspensores en ocasiones se observaron como grupos de células de tipo parenquimático, grandes, de paredes delgadas y núcleos excéntricos, estas células parecían aisladas (Fig. 20A) o asociadas a células (tipo meristemático) pequeñas, redondas, de paredes delgadas y núcleo central prominente con grandes nucleólos, 1-3 (Fig. 20B) (puede tratarse de uno solo, pero debido a su forma irregular posiblemente emerge en distintos puntos), denso citoplasma, pequeñas vacuolas y la presencia de una gran cantidad de glóbulos que dieron reacción positiva de almidón al teñirse con lugol.

En secciones del cuerpo de embriones somáticos vitrificados, se observaron células de tipo meristemático que crecieron y se alargaron, su núcleo sufrió cariocinesis, aparentemente sin citocinesis, pues no se observaron paredes celulares divisorias



entre los dos núcleos produciendo células binucleadas que posteriormente se elongaron (Figs. 20C1,C2) estableciéndose una polaridad en estas células donde uno de los núcleos desplazado hacia un extremo se rodeó de mayor cantidad de citoplasma que el otro que se desplazó al extremo contrario (Fig. 20 C2). El núcleo de la zona con mayor cantidad de citoplasma se dividió y formó un agregado de células pequeñas. El núcleo del otro extremo se dividió para formar grandes células vacuoladas (Figs. 20 C3,D). Las células grandes continuaron dividiéndose produciendo gran cantidad de células alargadas constituyendo el suspensor del embrión. Las células pequeñas también formaron más células del suspensor.

Se reconocieron estructuras semejantes a proembriones (Fig. 20D) parecidos a los descritos en coníferas (Figs. 21C,D). En tales estructuras semejantes a proembriones iniciaba el alargamiento de las células del suspensor. Dichas estructuras se formaron de células derivadas del cuerpo de un embrión somático (Fig. 20L) en el que se observaron células alargadas que recordaron a las encontradas en la matriz mucilaginosa de estos cultivos embriogénicos y que también se asemejaban a las células embriogénicas descritas en coníferas (Durzan y Durzan, 1991). En los embriones que llegaron a madurar las células se observaron más unidas entre sí (sin grandes espacios intercelulares) conformando una estructura consolidada con abundante almidón (Figs. 20 E, F). El desarrollo continuó con la aparición de dos primordios cotiledonarios (Figs. 11, 20 G) y entre ellos se desarrolló en un brote el meristemo apical del tallo (Fig. 12,

14, 20J).

Células epidérmicas del embrión se diferenciaron en tricomas formados de una o dos células. Estos se originaron principalmente en la base y parte media de los dos cotiledones. En esta etapa se diferenció también el tejido provascular, presente sólo en el cuerpo del embrión (Fig. 20H, I). Los embriones no tuvieron conexión vascular con ninguna estructura. Se reconoció la presencia de idioblastos situados generalmente hacia la periferia del cuerpo del embrión y cerca de la base de los cotiledones (Fig. 20H,I,J). En esta etapa de desarrollo fué más notoria la presencia de dos meristemas, uno en cada polo del embrión, un meristemo apical del tallo y otro radicular (Fig. 13, 20J). La coleoriza fué identificada como un ensanchamiento del cuerpo del embrión que iniciaba cerca de la base de los cotiledones y continuaba más allá del meristemo radicular. En ese límite era notoria la transición del tipo celular meristemático hacia el parenquimático que formaba a los suspensores (Fig. 20J). En secciones parciales de los embriones, se observaron grupos de células (del cuerpo) pequeñas, con denso citoplasma unidas a varias hileras de células (del suspensor) alargadas, con grandes espacios entre tales hileras; o bien, los agregados de células pequeñas se encontraron completamente rodeados de células parenquimáticas.

Estos tipos celulares y su distribución permitieron reconocer que las estructuras descritas eran embriones somáticos en corte transversal u oblicuo donde los agregados de células del tipo meristemático correspondían a los nódulos observados en el callo

y cada nódulo era el cuerpo de un embrión ligado a un suspensor en etapas tempranas de su desarrollo. Las hileras de células parenquimáticas que rodeaban a los grupos de células pequeñas correspondieron a células del suspensor.

Tales secciones de embriones incompletos mostraron generalmente el suspensor desgarrado o fragmentado (Fig. 20K) posiblemente durante la aplicación de la técnica histológica y/o también debido a que regiones del embrión dejaron de pertenecer a éste para participar en la formación de más embriones y suspensores, observaciones similares se hicieron del cuerpo del embrión (Figs. 5,6,19,20 L).

**- Crecimiento de cultivos embriogénicos en medios con y sin reguladores de crecimiento, en presencia de distintas concentraciones de sacarosa.**

Los cultivos embriogénicos adquirieron un color pardo, se compactaron y no fueron morfogénicos (Fig. 18).

La inoculación de cultivos embriogénicos en medio basal y en medio con fitoreguladores 1/1, adicionados de distintas concentraciones de sacarosa (Tabla 20) permitió reconocer que hubo crecimiento en todos los medios ensayados, y que los volúmenes alcanzados fueron ligeramente superiores en medio sin K ni 2,4-D en relación a aquellos donde estuvieron presentes; el mayor crecimiento ocurrió en medio con 6% de sacarosa, seguido de 3, 0 y 12% de sacarosa en medios con y sin fitoreguladores. En los resultados obtenidos se observó que al aumentar la concentración de sacarosa de 0 a 6% también aumentó el

crecimiento del callo. Con una concentración de 12% o un gradiente de 0 a 12% sacarosa el crecimiento fué menor, sólo comparable al resultado en los tratamientos sin sacarosa. Un hecho notorio e interesante fué que hubo crecimiento después de 3 y aún 7 meses en medio sin la fuente de carbono (sacarosa).

Tabla 20. Crecimiento de cultivos embriogénicos de C. mexicana var. robusta en medio nutritivo con y sin reguladores del crecimiento adicionado de distintas concentraciones de sacarosa.

	Tratamiento K/2,4-D (mg/l) + Sacarosa (%)	Volumen x (mm <sup>3</sup> )	
		Meses	
		3	7
0/0	0	17.25	49.4
	3	20.7	54.1
	6	18.7	104.55
	12	19.15	34.5
	* gradiente	17.1	38.5
1/1	0	17.1	38.5
	3	19.35	43.5
	6	20.8	103.8
	12	19.2	30.55
	* gradiente	18.0	42.9

\* gradiente de 0 a 12% de sacarosa

El análisis estadístico de los resultados al comparar los distintos tratamientos se presenta en las Tablas 21-26.

Tabla 21 a, b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto, después de 3 meses, de los tratamientos con sacarosa sobre el crecimiento de cultivos embriogénicos de C. mexicana var. robusta.

ANOVA con 95% de confiabilidad.

a) Tabla de medias

Trat. Sac %	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media	
S0	20	17.25	1.3743	13.8255	20.6744
S3	20	15.55	2.3769	12.1255	18.9744
S6	20	18.70	1.6984	15.2755	22.1244
S12	20	19.15	1.1816	15.7255	22.5744
Total	80	17.66	0.8594	15.9502	19.3747

b) Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia
Entre trams.	158.4375	3	52.8125	.849	.4485
Dentro de tratms	4491.45	76	59.0980		
Total	4649.8875	79			

c) Análisis de rango múltiple (Tukey)

Trat. Sac %	n	Media	Grupos homogéneos
S3	20	15.55	*
S0	20	17.25	*
S6	20	18.70	*
S12	20	19.15	*

No se encontraron diferencias significativas,  $P > 0.05$ .

En todos los tratamientos hubo crecimiento del cultivo embriogénico, aún en el medio sin sacarosa.

Tabla 22 a,b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto después de 7 meses, de los tratamientos con sacarosa sobre el crecimiento de cultivos embrionarios de *C. mexicana* var *robusta*. ANOVA con 95% de confiabilidad.

a) Tabla de medias

Trat.	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media	
S0	20	42.00	6.8445	17.5658	66.4341
S3	20	40.60	6.3975	16.1658	65.0341
S6	20	104.55	22.4776	80.1158	128.9841
S12	20	34.50	2.9562	10.0658	58.9341
Total	80	55.41	6.1326		

b) Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia
Entre tratms.	65022.64	3	21674.213	7.204	0.0003
Dentro de tratms	228668.75	76	3008.799		
Total	293691.39	79			

c) Análisis de rango múltiple (Tukey)

Trat. Sac %	n	Media	Grupos homogéneos
S12	20	34.50	*
S3	20	40.60	*
S0	20	42.00	*
S6	20	104.55	*

Si existieron diferencias significativas,  $P < 0.05$ . Se detectaron dos grupos, uno comprendido por los tratamientos S12, S3 y S0. El otro grupo formado por el tratamiento S6 difiere del comportamiento general y su media superó a las del primer grupo por un factor de 2.4 a 3.0.

Tabla 23 a, b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto, después de 3 meses, de los tratamientos con hormonas y sacarosa, sobre el crecimiento de cultivos embriogénicos de C. mexicana var. robusta. ANOVA con 95% de confiabilidad.

a) Tabla de medias					
Trat. Horm Sac %	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media	
HS0	20	17.10	1.1537	14.2731	19.9268
HS3	20	19.35	1.4783	16.5231	22.1768
HS6	20	20.80	1.6537	17.9731	23.6268
HS12	20	19.20	1.3428	16.3731	22.0268
Total	80	19.11	0.7095	17.6990	20.5259

b) Análisis de varianza					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia
Entre tratms.	139.2375	3	46.4125	1.152	.3336
Dentro de tratms	3060.7500	76	40.2730		
Total	3199.9875	79			

c) Análisis de rango múltiple (Tukey)				
Trat. Horm Sac %	n	Media	Grupos homogéneos	
HS0	20	17.10	*	
HS12	20	19.20	*	
HS3	20	19.35	*	
HS6	20	20.80	*	

No se detectaron diferencias significativas,  $P > 0.05$ .

Los valores de estas medias fueron ligeramente superiores a las de tratamientos sin hormonas.

Tabla 24 a, b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto, después de 7 meses, de los tratamientos con hormonas y sacarosa sobre el crecimiento de cultivos embriogénicos de C. mexicana var. robusta. ANOVA con 95% de confiabilidad.

a) Tabla de medias					
Trat. Horm Sac %	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media	
HS0	20	38.50	4.2590	11.7477	65.2522
HS3	20	43.50	10.1350	16.7477	70.2522
HS6	20	103.80	24.3152	77.0477	130.5522
HS12	20	30.55	3.0439	3.7977	57.3022
Total	80	54.08	6.7145	40.7111	67.4636

b) Análisis de varianza						
Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia	
Entre tratms.	67608.24	3	22536.079	6.248	.0008	
Dentro de tratms	274114.15	76	3606.765			
Total	341722.39	79				

c) Análisis de rango múltiple (Tukey)				
Trat. Hor Sac %	n	Media	Grupos homogéneos	
HS12	20	30.55	*	
HS0	20	38.50	*	
HS3	20	43.50	*	
HS6	20	103.80	*	

Si hubo diferencias significativas,  $P < 0.05$  y se detectaron dos grupos, uno comprendido por los tratamientos HS12, HS0 y HS3. El otro grupo formado por el tratamiento HS6 difiere del comportamiento general, su media superó a las del primer grupo por un factor de 2.3 a 3.4. Los valores de estas medias parecieron ser ligeramente inferiores a los de los tratamientos sin hormonas.



Tabla 25 a, b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto de gradientes de sacarosa en medio con y sin hormonas sobre el crecimiento de cultivos embriogénicos de C. mexicana var. robusta después de 3 meses de tratamiento.  
ANOVA con 95% de confiabilidad.

a) Tabla de medias

Trat.	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media	
SO-12	20	18.00	1.2117	15.5887	20.4112
HSO-12	20	18.75	1.1695	16.3387	21.1612
Total	40	18.37	0.8420	16.6699	20.0800

b) Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia
Entre tratms.	5.6250	1	5.6250	.198	.6633
Dentro de tratms	1077.7500	38	28.3618		
Total	1083.3750	39			

c) Análisis de rango múltiple (Tukey)

Trat.	n	Media	Grupos homogéneos
SO-12	20	18.00	*
HSO-12	20	18.75	*

No se encontraron diferencias significativas,  $P > 0.05$ .

Tabla 26 a, b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto de gradientes de sacarosa en medio con y sin hormonas sobre el crecimiento de cultivos embriogénicos de C. mexicana var. robusta después de 7 meses de tratamiento.  
ANOVA con 95% de confiabilidad.

Trat.	a) Tabla de medias			
	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media
S0-12	20	42.90	3.7345	32.8070 52.9929
HS0-12	20	47.85	5.9785	37.7570 57.9429
Total	40	45.37	3.5245	38.2382 52.5117

Fuente de variación	b) Análisis de varianza				
	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia
Entre tratms.	245.025	1	245.0250	.493	.4943
Dentro de tratms	18882.350	38	496.9039		
Total	19127.375	39			

Trat.	c) Análisis de rango múltiple (Tukey)		
	n	Media	Grupos homogéneos
S0-12	20	42.90	*
HS0-12	20	47.85	*

No se encontraron diferencias significativas  $P > 0.05$ .

El crecimiento del cultivo embriogénico fué comparativamente menor dentro de los primeros 3 meses que en los meses posteriores como lo muestran los resultados a 7 meses de iniciados los tratamientos (Tabla 20).

- Determinación de etileno en cultivos embriogénicos.

Los cultivos embriogénicos rápidamente adquirieron un color pardo, se compactaron y no fueron morfo genéticos.

Tabla 27. Concentraciones de etileno acumulado en cultivos embriogénicos obtenidos de hojas de Ceratozamia mexicana var. robusta.\*.

Tratamiento K/2,4-D mg/l + AgNO <sub>3</sub> µM	Tamaño de muestra	Tiempo (días)						
		15	30	45	60	75	90	
		Etileno µl/l						
0/0	5	x	4.86	3.39	1.7	0.12	0.5	0.46
		s	1.85	2.54	0.94	0.27	0.69	0.55
0/0 + 5	5	x	4.77	3.12	0.67	0.56	0.62	0.52
		s	1.59	1.94	1.02	0.53	0.64	0.70
0/0 + 10	5	x	4.42	3.99	1.49	0.96	0.81	0.85
		s	1.44	1.62	1.80	1.05	1.31	0.73
1/1	5	x	6.77	4.93	0.91	2.49	1.52	0.82
		s	2.25	3.13	0.99	1.15	2.81	0.68
1/1 + 5	5	x	4.38	3.55	3.50	2.65	4.21	0.59
		s	1.91	2.13	1.76	2.85	2.40	1.23
1/1 + 10	5	x	2.69	2.90	3.34	2.65	1.13	2.91
		s	2.84	3.52	3.82	1.59	1.01	3.73

\* Callos generados en Medio B5 modificado K/2,4-D 1 mg/l; 27±2°C, oscuridad

x= promedio

s= desviación estándar

Tabla 28 a,b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto después de 15 días, de los tratamientos con fitoreguladores y  $\text{AgNO}_3$ , sobre la concentración de Etileno acumulado en cultivos embrionarios de *C. mexicana* var *robusta*. ANOVA con 95% de confiabilidad.

## a) Tabla de medias

Trat.	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media	
M0	5	4.8680	.8285	2.9874	6.7485
M5	5	4.7700	.7147	2.8894	6.6505
M10	5	4.4280	.6471	2.5474	6.3085
MH0	5	6.7740	1.0094	4.8934	8.6545
MH5	5	4.3880	.8546	2.5074	6.2685
MH10	5	2.6980	1.2702	.8174	4.5785
Total	30	4.6543	0.3719	3.8865	5.4220

## b) Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia
Entre tratam.	42.5070	5	8.5014	2.049	.1076
Dentro de tratm	99.5834	24	4.1493		
Total	142.090	29			

## c) Análisis de rango múltiple (Tukey)

Trat.	n	Media	Grupos homogéneos
MH10	5	2.6980	*
MH5	5	4.3880	**
M10	5	4.4280	**
M5	5	4.7700	**
M0	5	4.8680	**
MH0	5	6.7740	*

No hubo diferencias significativas  $P > 0.05$ , pero de acuerdo a las medias y a los grupos homogéneos, se observó la tendencia a distinguirse los tratamientos MH10 y MH0 por sus valores, respectivamente, el más bajo con hormonas y  $10 \mu\text{M AgNO}_3$ ; y el más alto sólo con hormonas.

Tabla 29 a,b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto después de 30 días, de los tratamientos con fitoreguladores y  $\text{AgNO}_3$ , sobre la concentración de Etileno acumulado en cultivos embriónicos de C. mexicana var robusta. ANOVA con 95% de confiabilidad.

## a) Tabla de medias

Trat.	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media	
M0	5	3.3932	1.1360	1.0196	5.7667
M5	5	3.1234	.8698	.7498	5.4969
M10	5	3.9900	.7241	1.6164	6.3635
MH0	5	4.9298	1.4038	2.5562	7.3033
MH5	5	3.5494	.9531	1.1758	5.9229
MH10	5	2.9220	1.5749	.5486	5.2957
Total	30	3.6513	0.4693	2.6823	4.6203

## b) Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia
Entre tratms.	13.1827	5	2.6365	.399	.8447
Dentro de tratms	158.6307	24	6.6096		
Total	171.813	29			

## c) Análisis de rango múltiple (Tukey)

Trat.	n	Media	Grupos homogéneos
MH10	5	2.9222	*
M5	5	3.1234	*
M0	5	3.3932	*
MH5	5	3.5494	*
M10	5	3.9900	*
MH0	5	4.9298	*

No hubo diferencias significativas  $P > 0.05$ .

Los valores de las medias fueron menores en relación a las de la fecha 1 (Tabla 28).

Tabla 30 a,b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto después de 45 días, de los tratamientos con fitoreguladores y AgNO<sub>3</sub>, sobre la concentración de Etileno en cultivos embriogénicos de C. mexicana var. robusta. ANOV con 95% de confiabilidad.

## a) Tabla de medias

Trat.	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media	
M0	5	1.7084	.4224	-.1348	3.5516
M5	5	.6726	.4595	-1.1706	2.5158
M10	5	1.4894	.8082	-.3538	3.3326
MH0	5	.9116	.4456	-.9316	2.7548
MH5	5	3.4992	.7895	1.6559	5.3424
MH10	5	3.3426	1.7082	1.4993	5.1858
Total	30	1.9373	0.3645	1.1848	2.6897

## b) Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia
Entre tratams.	36.5946	5	7.3189	1.836	.1437
Dentro de tratams	95.6648	24	3.9860		
Total	132.2595	29			

## c) Análisis de rango múltiple (Tukey)

Trat.	n	Media	Grupos homogéneos
M5	5	.6726	*
MH0	5	.9116	*
M10	5	1.4894	*
M0	5	1.7084	*
MH10	5	3.3426	*
MH5	5	3.4992	*

No se encontraron diferencias significativas  $P > 0.05$ .

Los valores de las medias fueron menores que las de las dos primeras fechas.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla 31 a, b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto después de 60 días, de los tratamientos con fitoreguladores y  $\text{AgNO}_3$ , sobre la concentración de Etileno acumulado en cultivos embriogénicos de *C. mexicana* var *robusta*. ANOVA con 95% de confiabilidad.

Trat.	a) Tabla de medias			
	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media
MO	5	.1242	.1242	-1.2616 1.5100
M5	5	.5616	.2386	-.8242 1.9474
M10	5	.9676	.4708	-.4182 2.3534
MH0	5	2.4944	.5178	1.1085 3.8802
MH5	5	2.6518	1.2780	1.2659 4.0376
MH10	5	2.6496	.7127	1.2637 4.0354
Total	30	1.5748	0.2740	1.0091 2.1406

Fuente de variación	b) Análisis de varianzas				
	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia
Entre tratms.	33.3014	5	6.6602	2.956	.0323
Dentro de tratms.	54.0758	24	2.2531		
Total	87.3773	29			

Trat.	c) Análisis de rango múltiple (Tukey)		
	n	Media	Grupos homogéneos
MO	5	.1242	*
M5	5	.5616	*
M10	5	.9676	*
MH	5	2.4944	*
MH10	5	2.6496	*
MH5	5	2.6518	*

Los tratamientos sí promovieron diferencias significativas,  $P < 0.05$ , sin embargo las pruebas de Tukey y de Scheffe no mostraron grupos diferentes, pero las medias parecen indicar la tendencia de que en los tratamientos sin fitoreguladores (MO, M5, M10) se promovió la acumulación de menores concentraciones de etileno lo cual contrasta con los tratamientos con K y 2,4-D (MH, MH5,

MH10), de esta manera es posible considerar 2 grupos. La mayor concentración de etileno se encontró en MH5.

Tabla 32 a, b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto después de 75 días, de los tratamientos con fitoreguladores y  $\text{AgNO}_3$ , sobre la concentración de Etileno acumulado en cultivos embriogénicos de C. mexicana var robusta. ANOVA con 95% de confiabilidad.

a) Tabla de medias					
Trat.	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media	
M0	5	.5040	.3091	-1.0673	2.0753
M5	5	.6216	.2887	-.9497	2.1929
M10	5	.8092	.5880	-.7621	2.3805
MH0	5	1.5232	1.2589	-.0481	3.0945
MH5	5	4.2112	1.0771	2.6398	5.7825
MH10	5	1.1368	.4539	-.4345	2.7081
Total	30	1.4676	0.3107	0.8261	2.1091

b) Análisis de varianza					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia
Entre tratms.	48.7859	5	9.7175	3.355	.0194
Dentro de tratms	69.5232	24	2.8968		
Total	118.1112	29			

c) Análisis de rango múltiple (Tukey)				
Trat.	n	Media	Grupos homogéneos	
M0	5	.5040	*	
M5	5	.6216	*	
M10	5	.8092	*	
MH10	5	1.1368	**	
MH0	5	1.5232	**	
MH5	5	4.2112	*	

Si hubo diferencias significativas,  $P < 0.05$  y se presentaron 3 grupos diferentes: uno, en el que los tratamientos M0 al MH0 son homogéneos donde M0, M5 y M10 presentaron menores concentraciones de etileno y otro grupo formado por MH10 y MH0 que comparte



características con el primer grupo; y un tercer grupo, el MH5 que es el único que difiere del comportamiento general y que también en esta fecha 5 presentó los mayores valores de etileno. Las menores medias se lograron en los tratamientos sin hormonas, pero aumentan al estar presente  $\text{AgNO}_3$  5  $\mu\text{M}$  y un poco más con 10  $\mu\text{M}$ . Se mantuvo la tendencia de que en los medios con hormonas la menor concentración de etileno se encontró cuando el  $\text{AgNO}_3$  estuvo presente en 10  $\mu\text{M}$  y la mayor concentración con 5  $\mu\text{M}$ .

Tabla 33 a,b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto después de 90 días de los tratamientos con fitoreguladores y  $\text{AgNO}_3$ , sobre la concentración de Etileno acumulado en cultivos embriogénicos de *C. mexicana* var robusta. ANOVA con 95% de confiabilidad.

a) Tabla de medias

Trat.	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media	
MO	5	.4650	.2466	-1.0726	2.0026
M5	5	.5270	.3145	-1.0106	2.0646
M10	5	.8576	.3280	-.6800	2.3952
MH0	5	.8262	.3052	-.7114	2.3638
MH5	5	.5944	.5520	-.9432	2.1320
MH10	5	3.0696	1.6319	1.5319	4.6072
Total	30	1.0566	0.3040	0.4289	1.6843

b) Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia
Entre tratms.	24.9447	5	4.9889	1.799	.1513
Dentro de tratms.	66.5720	24	2.7738		
Total	91.5168	29			

## c) Análisis de rango múltiple (Tukey)

Trat.	n	Media	Grupos homogéneos
M0	5	.4650	*
M5	5	.5270	*
MH5	5	.5944	*
MH0	5	.8262	*
M10	5	.8576	*
MH10	5	3.0696	*

No se encontraron diferencias significativas,  $P > 0.05$ .

Tabla 34. Análisis de varianza en el tiempo, de las concentraciones de etileno acumulado en cultivos embrionarios de hojas de *Ceratozamia mexicana* var. *robusta*.

TIEMPO (días)	GRADOS DE LIBERTAD	VALOR F	NIVEL DE SIGNIFICANCIA (<0.05)
15	5, 24	2.049	0.1076
30		0.399	0.844
45		1.836	0.143
60		2.956	0.032*
75		3.355	0.019*
90		1.799	0.151

\* Hubo diferencias significativas

En general se puede señalar que los valores más bajos de etileno acumulado ocurrieron en los tratamientos sin fitoreguladores y baja concentración de  $\text{AgNO}_3$ . Valores mayores se observaron en los tratamientos con hormonas. Esto parece indicar: a) que el etileno registrado en la fecha 1 no se acumuló, probablemente escapó, b) aún cuando haya escapado, posiblemente no se siguió produciendo en la misma cantidad, c) que el etileno en los tratamientos sin fitoreguladores se produce en menor cantidad.

- Cultivos embriogénicos en medio basal adicionado de  
Ácido Abscísico (ABA)

Los cultivos embriogénicos rápidamente adquirieron un color pardo, se compactaron y no fueron morfogénicos.

Tabla 35. Crecimiento *in vitro* de cultivos embriogénicos de *C. mexicana* var. *robusta* en medio basal con distintas concentraciones de ABA.

Tratamiento ABA ( $\mu\text{M}$ )	Volumen x $\text{mm}^3$	
	Meses	
	3	5
0	21.66	21.23
1	23.9	25.0
5	21.35	27.85
20	18.53	25.46

Tabla 36 a, b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto de ABA sobre el crecimiento de cultivos embriogénicos de *C. mexicana* var. *robusta* después de 3 meses de tratamiento. ANOVA con 95% de confiabilidad

a) Tabla de medias					
Trat. ABA ( $\mu\text{M}$ )	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media	
A0	15	21.6666	1.6695	17.8145	25.5187
A1	11	23.9090	3.2120	19.4108	28.4073
A5	14	21.3571	2.0180	17.3698	25.3444
A20	15	18.5333	1.2978	14.6812	22.3854

b) Análisis de varianza						
Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia	
Entre tratms.	190.9918	3	63.6639	1.153	.3367	
Dentro de tratms	2815.190	51	55.1998			
Total	3006.1818					

c) Análisis de rango múltiple (Tukey)			
Trat. ABA ( $\mu\text{M}$ )	n	Media	Grupos homogéneos
A20	15	18.5333	*
A5	14	21.3571	*
A0	15	21.6666	*
A1	11	23.9090	*

No se encontraron diferencias significativas,  $P > 0.05$ .

Tabla 37 a, b, c. Análisis estadístico para determinar el efecto de ABA sobre el crecimiento de cultivos embriogénicos de C. mexicana var. robusta después de 5 meses de tratamiento. ANOVA con 95% de confiabilidad.

a) Tabla de medias					
Trat. ABA ( $\mu\text{M}$ )	n	Media	Error estándar	Intervalos para la media	
A0	13	21.2307	1.5898	15.7989	26.6625
A1	11	25.0000	3.2973	19.0950	30.9049
A5	14	27.8571	3.4143	22.6229	33.0913
A20	15	25.4666	2.2254	20.4099	30.5233
Total	53	24.9622	1.3383	22.2721	27.6524

a) Análisis de varianza					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor F	Nivel de significancia
Entre tratms.	302.169	3	100.7230	1.061	.3743
Dentro de trams	4651.755	49	94.9337		
Total	4953.924	52			

c) Análisis de rango múltiple (Tukey)			
Trat. ABA ( $\mu\text{M}$ )	n	Media	Grupos homogéneos
A0	13	21.2307	*
A1	11	25.0000	*
A20	15	25.4666	*
A5	14	27.8571	*

No se encontraron diferencias significativas,  $P > 0.05$ .

## DISCUSION

La regeneración de plantas tropicales (Angiospermas) por la vía de embriogénesis somática a partir de explantes derivados de individuos maduros se ha logrado en varias especies, muchas de ellas de gran importancia alimenticia y económica, incluyendo Citrus spp., Musa, mango y palma datilera (Tabla 9) (Litz y Jaiswal, 1991). En contraste, en las cícadas, las cuales también son especies tropicales y en general en las Gimnospermas no se había encontrado este proceso asexual in vitro. Se ha reconocido que los factores más importantes que determinan la embriogénesis somática son el tipo de explante, su estado de desarrollo y la interacción entre explante y medio de cultivo.

Sólo a partir de embriones y megagametofitos se había alcanzado en cícadas (e. g. La Rue, 1948, 1954; Norstog, 1965; Norstog y Rhamstine, 1967; Chávez et al., 1992a,b). Así también en coníferas a partir de dichas estructuras y además de tejidos de plántulas recién germinadas (Attree y Fowke, 1991).

Entre las estructuras más apropiadas que podrían ensayarse en gimnospermas se encuentran la nucela, como fué demostrado en Citrus spp., mango, jaboticaba, níspero y Syzygium spp. (Tabla 9), así como de Hevea brasiliensis (Carron y Enjalric, 1985, citados por Litz y Jaiswal, 1991). Las hojas inmaduras son otro tipo de explante comúnmente utilizado, por ejemplo en Musa, Euphoria longan (longan) y Santalum album (sándalo) (Lakshmi Sita, 1986).

El estado de desarrollo del explante puede ser muy importante, Durzan y Gupta (1987) encontraron que prácticamente sólo de embriones inmaduros colectados en la 4-5 semana después de la

fertilización, generaron cultivos embriogénicos de Pseudotsuga menziesii. Los trabajos hasta ahora publicados sobre embriogénesis somática en coníferas fueron realizados con estructuras ligadas a la semilla (embriones, megagametofitos) y plántulas muy jóvenes. Cultivos embriogénicos se han obtenido de óvulos no fertilizados de frutos inmaduros de naranja (Button y Bornman, 1971, citados por Litz y Jaiswal, 1991); o bien de nucela de óvulos fertilizados de mango poliembriónico (Litz et al., 1984c), jaboticaba (Litz, 1984a) y de mango monoembriónico (Litz, 1984b), o de níspero (Litz, 1985) y Citrus (Rangan et al., 1968, citados por Litz y Jaiswal, 1991). Los explantes fueron utilizados después de haber retirado el embrión cigótico o los embriones adventicios. El tiempo óptimo para disectar la nucela de mango fué cuando el embrión ocupaba aproximadamente la mitad del saco embrionario. Sólo de folíolos recién formados de las hojas compuestas de árboles maduros de Euphoria longan se generó callo embriogénico (Litz, 1988).

Entre los escasos estudios con hojas de cícadas, Henson (1980) cultivó secciones de hasta 3 cm long de folíolos juveniles y maduros de distintas especies (Tabla 11). Casi exclusivamente a partir de los folíolos jóvenes ocurrió la formación de callo el cual requirió mucho tiempo para crecer. De hojas jóvenes de Zamia pumila y de microsporófilas de Zamia sp. se formaron raíces en cultivos incubados en oscuridad. Osborne (1988) cita sobre el informe de Henson que no se formó callo a partir de hojas maduras completamente expandidas. Posteriormente, Osborne (1988) cultivó secciones de peciolo, peciolulos de folíolos, bases de hojas,

ejes de conos y esporófilas de 5 especies de Encephalartos, incubados en oscuridad, en medio SH, sólo obtuvo la formación de callo que posteriormente se necrosó; Norstog (com. pers.) también obtuvo producción de callo al cultivar hojas de Stangeria eriopus.

Osborne y van Staden (1987) fueron los primeros en regenerar brotes a partir de raíces de plántulas, lo cual constituyó el primer estudio con éxito en las cícadas en el que se logran finalmente estas estructuras a partir de tejidos vegetativos, sin embargo, los explantes también provinieron de plantas jóvenes. La regeneración a partir de tejidos somáticos de individuos maduros de gimnospermas ha sido un obstáculo mayor. La regeneración in vitro de muchas plantas leñosas ha sido impedida por una posible falta de plasticidad en el desarrollo en los órganos que fueron determinados muchos años atrás. Aunque la diferenciación ha sido demostrada a partir de callo derivado de embriones, megagametofitos y de plántulas de varias especies de árboles, el callo derivado de explantes de origen maduro ha perdido la mayor parte de su potencial regenerativo (Brown y Sommer, 1982, citados por Litz, 1985). Bonga (1983) intentó explicar este problema al señalar la posible ausencia de células morfogénicamente competentes en plantas maduras o bien por la incapacidad de las células de este tipo a diferenciarse debido al efecto inhibitorio de las células vecinas.

En general es preferible utilizar explantes inmaduros ya que se ha observado que la madurez del mismo influye en la frecuencia de inducción embriogénica, haciendo que ésta disminuya (Becwar et

al., 1990; Lainé y David, 1990, citados por Attree y Fowke, 1991). Explantes como por ejemplo las hojas inmaduras o la epidermis de hipocótilo pueden incluir células embrionicas, es decir células embriogénicamente predeterminadas o bien pueden estar presentes células suficientemente cercanas a este estado para sólo requerir una mínima redeterminación (Williams y Maheswaran, 1986).

Los folíolos de *C. mexicana* var. *robusta* fueron tomados de plantas femeninas con unos 25 años de edad (Fig. 1), que mantenían aún un estróbilo en maduración del que se había desprendido ya aproximadamente un tercio del total de las semillas. Fué a partir de hojas inmaduras con los folíolos aún no expandidos y durante el invierno en Miami, Florida, que los explantes se colectaron y sembraron el mismo día. El resultado fué que sólo los apicales y más inmaduros generaron callo embriogénico. En esta breve descripción es posible encontrar múltiples factores que pudieron participar e interaccionar propiciando las respuestas morfogenéticas, por ejemplo, el estado reproductivo de la planta donadora fuera de su lugar natural de crecimiento, el sexo de los individuos, su edad, la estación del año con su particular temperatura, humedad y fotoperíodo. Influyó también, el estado de desarrollo de los folíolos ya que sólo los apicales respondieron, también podemos señalar que su posición en la hoja pudo influir, todo ello sin dejar de considerar que las plantas habían sido sometidas a labores hortícolas para su mantenimiento en el Fairchild Tropical Garden.

En distintas investigaciones en que se ha logrado inducir



embriogénesis somática en varias especies de gimnospermas (Hakman y von Arnold, 1985; Nagmani y Bonga, 1985; Gupta y Durzan, 1986; Wann et al., 1987; Litz com. pers.) la masa de tejido de la cual se han originado los embriones no fué descrita plenamente como un callo, el cual típicamente tiene poca organización, en cambio, la masa de tejido embriogénico en gimnospermas es más organizada, así, encontramos que ha sido denominada "callo embriogénico" (Hakman y von Arnold, 1985; Gupta y Durzan, 1986), tejido embriogénico (Rohr et al., 1989), masa de embriones y suspensores o ESM (embryonal-suspensor mass) (Durzan y Gupta, 1987; Krogstrup et al., 1988; Durzan y Durzan, 1991).

Las características que describen estos cultivos embriogénicos son muy semejantes a las que presentaron los cultivos generados a partir de folíolos de C. mexicana (Figs. 2,3): un aspecto húmedo viscoso, friable, hialino, blanco, cristalino, amarillento; áreas pardas, estructuras nodulares numerosas con largos suspensores que fácilmente sufren oxidación y forman una trama, muchos de ellos ramificados emergen del cultivo y en el extremo distal de cada rama fué posible observar el cuerpo de un embrión formado por densas células meristemáticas. Esta masa de embriones y suspensores no puede ser considerada un callo (Figs. 3, 19), por lo que para fines prácticos en este estudio, se mantuvieron los ~~términos cultivo embriogénico o masa de embriones y suspensores~~ (MES), términos utilizados de la misma manera en estudios citados en la bibliografía (Nagmani y Bonga, 1985; Hakman y von Arnold, 1985; Durzan y Gupta, 1987; Durzan y Durzan, 1991).

Las investigaciones en coníferas señalan que la apariencia

~~The following text is heavily obscured by noise and artifacts, likely from a scanning process. It appears to be a continuation of a scientific or technical document.~~

Las observaciones de los cultivos embriogénicos de la
 mexicana indicaron que su proliferación fue a partir de las
 estructuras globulares y los embriones maduraron en etapas
 precotiledonar con sus largos compuestos que finalmente
 fallaron en continuar su desarrollo (Fig. 1, 4).
 Durzan y Gupta (1987) mencionan que en cultivos de embriones a
 partir de embriones globulares formados de blastocistos
 el origen de las células totipotentes es por un cultivo sobre una
 masa de embriones-suspensión en proliferación; los primeros
 crecimientos o áreas de crecimiento formados en condiciones que
 ser friables, histiote o parietales y algunas veces en
 estructuras totales y pluripotentes, la generación de células
 somáticas y de células totipotentes en cultivos pluripotentes que
 después adquieren una estructura morfológica en condiciones más

translúcida, brillante y viscosa es debida a la producción de mucilago y que los cultivos embriogénicos consisten básicamente de embriones somáticos que son estructuras polarizadas con un cuerpo subtendido por células alargadas del suspensor. Estos embriones a su vez se dividen y forman por división (cleavage polyembryony) nuevos embriones; o bien, sus componentes celulares inician la formación de más embriones en ausencia de callo (Hakman y Fowke, 1987; Hakman y von Arnold, 1988; Attree y Fowke, 1991). Esto puede explicarse con el proceso de embriogénesis somática directa en la cual posiblemente las células que han sido predeterminadas para producir embriones adventicios están ya presentes en el explante (Sharp *et al.*, 1980) y no se forma un callo desorganizado (Rangan *et al.*, 1968, citados por Litz y Jaiswal, 1991).

Las observaciones de los cultivos embriogénicos de C. mexicana indicaron que su proliferación fué a partir de las estructuras globulares y los embriones somáticos en etapa precotiledonar con sus largos suspensores que normalmente fallaron en continuar su desarrollo (Fig. 3, 5). Similarmente, Durzan y Gupta (1987) mencionan que en cultivos en suspensión a partir de embriones cigóticos inmaduros de Pseudotsuga menziesii el origen de las células totipotentes no fué un callo sino una masa de embriones-suspensores en proliferación. Los nuevos crecimientos o áreas de reciente formación se reconocieron por ser friables, hialinas o amarillentas y siempre tuvieron una estructura nodular y filamentosa. La formación de embriones somáticos y su posterior desorganización en nuevos filamentos que después adquirirían una evidente morfología de embriones más

desarrollados, fué la etapa visible más característica de la proliferación de los cultivos embriogénicos (Figs. 4,5). La presencia de tales suspensores cristalinos cortos o de grandes células vacuoladas alargadas sobre o dentro de otros embriones más desarrollados permitieron suponer que éstas son el origen o que corresponden a etapas tempranas de nuevos embriones somáticos mucho antes de que terminaran de organizarse sus largos y notorios suspensores.

Una característica que se presenta en la literatura sobre embriogénesis somática es la frecuencia con que se mencionan ciclos secundarios de formación directa de embriones, que pueden ser originados de células individuales de la epidermis o por gemación multicelular del embrión somático primario (Williams y Maheswaran, 1986). Una posible explicación es que una vez que ha ocurrido la determinación embriogénica, para que el grupo de células se mantenga como tal, debe suprimirse cualquier tendencia de las células para actuar independientemente. La pérdida de este control es presumiblemente el factor que permite a células individuales o grupos de células a expresar su potencial y formar un nuevo embrión somático. La falla en el mantenimiento de este control puede ser la característica de los cultivos embriogénicos que permiten la continua proliferación de proembriones globulares semejantes a nódulos con largos suspensores (Button *et al.*, 1974; Litz y Conover, 1983; Kononowicz *et al.*, 1984, citados por Williams y Maheswaran, 1986) y tal parece fué el caso en los cultivos de *C. mexicana*.

El callo embriogénico y los cultivos embriogénicos desarrollados por C. mexicana comparten las características señaladas para otras cícadas: C. hildae, Zamia fischeri, Z. furfuracea, Z. pumila (Chávez et al., 1992a,b) y en general de otras gimnospermas, Picea abies (Hakman y von Arnold, 1985), P. menziesii (Gupta y Durzan, 1987), Larix decidua (Nagmani y Bonga, 1985; von Aderkas y Bonga, 1988) manifestando así una respuesta común para el proceso de embriogénesis somática. Estas observaciones coinciden sin que hasta ahora se hayan encontrado grandes diferencias entre especies y tampoco por el hecho de utilizar tejidos haploides (megagametofitos) ((Nagmani y Bonga, 1985; von Aderkas y Bonga, 1988; Chávez et al., 1992a,b) o diploides (embriones cigóticos y somáticos) (Gupta y Durzan, 1987; Chávez et al., 1992a,b,c) (Tablas 10, 12) como puede apreciarse en las investigaciones que a continuación se citan. Nagmani y Bonga (1985) cultivaron megagametofitos de óvulos inmaduros de Larix decidua y obtuvieron cultivos embriogénicos de los que salían embriones asexuales con largos suspensores enrollados y retorcidos que alcanzaban varios centímetros. Observaron protuberancias en forma de domos de color rojo a verde claro, que vistos bajo microscopio resultaron ser embriones asexuales con sus suspensores. Hakman y von Arnold (1985) cultivaron embriones cigóticos inmaduros de Picea abies, de los cuales se originaron cultivos con numerosos embriones somáticos con largos suspensores y muchos otros más pequeños. La gran mayoría no prosperaron. Describieron la iniciación de los embriones somáticos y su posterior

desarrollo en nódulos verdes, de los cuales esporádicamente se formaron embriones bien definidos y plántulas. En las primeras etapas, los embriones somáticos estaban formados en un extremo, de células largas vacuoladas, las cuales constituían al suspensor y un pequeño grupo de células meristemáticas en el otro extremo; posteriormente se volvieron más organizados observándose cotiledones, hipocótilo y radícula.

Gupta y Durzan (1986) lograron inducir cultivos embriogénicos a partir de embriones maduros de Pinus lambertiana, en particular de células del suspensor. El cultivo era mucilaginoso claro y rodeaba a un callo blanco, éste último contenía embriones somáticos en varios estados de desarrollo con largos suspensores (saliendo del callo) que en morfología se asemejaban a los estados tempranos del desarrollo de embriones cigóticos. Además, encontraron que numerosas células embrionarias con largos suspensores están presentes inicialmente en la matriz mucilaginosa. De manera semejante, en los cultivos embriogénicos de C. mexicana, en repetidas ocasiones en que se realizó la fragmentación y subcultivo de éstos, se observó el aspecto acuoso, mucilaginoso, incoloro, transparente y finamente granular del interior de los cultivos embriogénicos con la presencia de grandes células vacuoladas alargadas, lo que permite suponer que estas células de aspecto parenquimático podrían ser células iniciales de los embriones somáticos como mencionan para coníferas Durzan y Durzan (1991), von Aderkas y Bonga (1988), y Litz (com. pers.).

La notoria presencia de largos suspensores semejantes a filamentos recorriendo los cultivos embriogénicos de hojas in vitro de C. mexicana coincide en cierta medida con descripciones hechas por Chamberlain (1957) en semillas inmaduras de Ceratozamia en las que fué característica la presencia de un largo suspensor, que alcanzaba 8 cm de longitud. En los embriones somáticos del presente estudio fueron más cortos (1 - 1.5 cm). En los embriones somáticos de C. hildae y C. mexicana obtenidos a partir de embriones cigóticos y megagametofitos, los suspensores alcanzaron 1-2 cm long (Chávez et al., 1992a).

La estructura morfológica que describimos del suspensor, a manera de un haz filamentososo, pudiera ser equiparable a lo señalado también por Chamberlain (1957) quien cita que el suspensor de embriones cigóticos en estado cotiledonar temprano no es una estructura derivada de un embrión, sino un haz de suspensores de varios embriones y de los cuales un solo cuerpo embrionario ha de predominar. El mismo Chamberlain (1912) menciona en sus observaciones que distintos casos ocurren en cuanto a la estructura del embrión en semillas inmaduras de Ceratozamia. En un caso, a) se forman varios embriones dentro de una semilla, cada uno con su suspensor y posteriormente se unen formando un solo suspensor y un solo cuerpo del embrión; b) en otro caso todos los suspensores, cada uno unido a un cuerpo (embrión) se desarrolla por separado; y cita un tercer caso, c) en el que de tres embriones dos de ellos se fusionaron (también los suspensores) y el tercer embrión se desarrolló de manera independiente; concluyó que cualquiera que sea el curso seguido,

en la semilla madura se encontrará un solo embrión el cual puede ser producto de una sola fertilización o provenir de varias células huevo. De acuerdo a Durzan y Durzan (1991), lo descrito por Chamberlain (de manera análoga a la poliembriogénesis) correspondería a poliembrión simple o policigótica donde el origen de los embriones es de varios cigotos en el mismo megagametofito. En nuestros cultivos fué frecuente observar que de un haz de suspensores surgieran varios cuerpos embrionarios al mismo o a distintos niveles o distancias (Figs. 4, 5, 19) por lo que pensamos que el origen de esos embriones fueron células al mismo o a diferentes niveles de un solo cuerpo de embrión o de suspensor. Aunque existe la posibilidad de que tales suspensores paralelos fueran originados independientemente por células presentes en la base de éstos. Sin embargo, el hecho de que no sólo los suspensores sino el cuerpo de los embriones formaran más suspensores (Figs. 4,5, 20L) hace inclinarnos por la primera posibilidad, descrita como poliembriogénesis por división longitudinal apoyándonos en la clasificación que citan Durzan y Durzan (1991) (Tabla 13), en la que describen la poliembriogénesis somática como aquella por la que se forman nuevos embriones por división de un proembrión o la gemación a partir del suspensor sin haber mediación de callo (embriogénesis somática directa). Buchholz (1920, 1926) cita que la poliembriónia (poliembriogénesis) a partir de embriones cigóticos es común en gimnospermas y describió en forma detallada el proceso en Pinus.



La presencia de un suspensor en los embriones somáticos de cicadas quizá fué advertida por La Rue (1948, 1954), Norstog (1965), Norstog y Rhamstine (1967) pero no fué mencionada en sus investigaciones.

El suspensor se significó como la estructura más característica y notoria en los cultivos de hojas de C. mexicana, pero también como una unidad de proliferación y nueva formación de más embriones somáticos (Fig. 19). Observaciones similares fueron realizadas en cultivos embriogénicos a partir de megagametofitos y embriones cigóticos de C. hildae y C. mexicana (Chávez et al., 1992a) y en general para coníferas (Durzan y Durzan, 1991). En Z. fischeri, Z. furfuracea y Z. pumila sólo se estableció su presencia (Chávez et al., 1992b).

Los embriones somáticos de C. hildae, Z. fischeri, Z. furfuracea y Z. pumila (Chávez et al., 1992a,b) fueron dicotiledóneos. Aquellos formados a partir de hojas de C. mexicana no todos fueron dicotiledóneos, algunos fueron monocotiledóneos (Fig. 17). Embriones somáticos a partir de megagametofitos y de embriones cigóticos C. mexicana fueron descritos como aparentemente monocotiledóneos.

En el presente estudio algunos embriones somáticos presentaban una cubierta en forma de vaina o coleoptilo que después se abrió para dar salida a dos cotiledones (Fig. 16). De acuerdo a Chamberlain (1957) los embriones cigóticos de C. mexicana usualmente poseen un tubo cotiledonar en la región basal de los cotiledones, posiblemente como una anomalía este tubo puede cubrir por completo a los cotiledones. Durzan y Gupta (1987)

observaron en embriones somáticos de Pseudotsuga menziesii una cubierta o vaina de células que podría contribuir en el desarrollo de la coleorriza.

Los cultivos de C. mexicana a partir de megagametofitos y de embriones cigóticos fueron más embriogénicos y los embriones somáticos más normales, en tanto, que un reducido número de folíolos resultó morfogénico (Tablas 18,19) y comúnmente, las masas de embriones/suspensores y embriones inmaduros se desorganizaron en más embriones y suspensores.

Gupta y Durzan (1987) mencionan que a partir de semillas maduras de Pseudotsuga menziesii sólo un embrión de 1,000, generó un cultivo embriogénico. Por su parte, Nagmani y Bonga (1985) señalan que sólo 5 de un total de 1440 explantes de megagametofitos de Larix decidua, fueron regenerativos.

Los medios de cultivo en que se ha logrado inducir embriogénesis somática en cícadas son principalmente el White (1943) y en las modificaciones de éste, basadas en el medio Norstog (Norstog y Smith, 1963) propuestas por Norstog (1965) y Norstog y Rhamstine (1967) que adicionan diversos compuestos nitrogenados como asparagina, alanina, glutamina, sulfato de adenina. Otro medio utilizado es el MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado por Linsmaier y Skoog (1965) con alanina, glutamina, tirosina y sulfato de adenina. Recientemente Chávez et al. (1992a,b,c) utilizaron el medio B5 con modificaciones propuestas por Litz basado en el trabajo de Norstog y Rhamstine (1967) (Tablas 14,15) y lograron cultivos embriogénicos a partir de megagametofitos y embriones cigóticos de C. hildae y C. mexicana, Z. fischeri, Z.

furfuracea y Z. pumila y a partir de hojas inmaduras de C. mexicana. Este medio también es rico en nitrógeno reducido y en una alta concentración de sacarosa. Algunas de las modificaciones de éste último medio habían sido utilizadas ya con éxito en la inducción de embriogénesis somática. En nucela de mango cultivado en MS modificado en la concentración de sales y adicionado de glutamina 400 mg/l, ácido ascórbico 100 mg/l, sacarosa 60 g/l (Litz, 1984; Litz y Schaffer, 1987). En el cultivo de hojas de árboles adultos de Euphoria longan en medio B5 con glutamina 400 mg/l, hidrolizado de caseína 200 mg/l, sacarosa 60 g/l (Litz, 1988).

El medio de cultivo propuesto por Litz (Tabla 15) y utilizado para cultivar folíolos de C. mexicana reúne muchos de los componentes que demostraron jugar un papel importante en las investigaciones en que originalmente se propuso su inclusión (Norstog y Rhamstine, 1967).

El medio aquí utilizado es rico en fuentes de nitrógeno como ha sido recomendado no sólo para inducir embriogénesis somática sino anteriormente para el cultivo de embriones. Entre los aminoácidos y sus amidas la glutamina y la asparagina son los más efectivos para estimular el crecimiento in vitro del embrión. Tal beneficio de la glutamina sobre el crecimiento de embriones inmaduros de cebada fué reconocido desde 1906 por Brown y seguido por Norstog (1961) y Norstog y Smith (1963 citados por Hu y Wang, 1986). Exceptuando las investigaciones de LaRue (1948) y Webb et al., (1983) en todos los cultivos embriogénicos de cícadas se ha incluido la glutamina. La asparagina ha estado presente en la

embriogénesis asexual de las cicadas, exceptuando los trabajos de LaRue (1948), Norstog y Rhamstine (1967) y Webb *et al.* (1983) (Tabla 37).

Concentraciones relativamente altas de sacarosa (5-6%) han resultado óptimas para la embriogénesis somática en diversas especies como Citrus (Murashige y Tucker, 1969), mango (DeWald *et al.*, 1989) y papaya (Litz y Conover, 1983). En coníferas la sacarosa se ha incluido usualmente en 30 a 100 mM, sin evidencia de que la alta concentración haya sido dañina.

La concentración de 6% (175 mM) sacarosa utilizada con C. mexicana debió jugar un papel muy importante durante la embriogénesis somática a partir de los folíolos, como fuente de carbono y energía, además de ejercer una acción osmótica en el medio de cultivo (Rietsema, 1953; Wetherell, 1984). Se sabe que existen altos valores osmóticos en la savia de los óvulos inmaduros de los vegetales. Chamberlain (1957) menciona que dentro del tubo polínico de las cicadas existe una alta presión y para dar una idea de ello cita que los espermatozoides pueden moverse libremente en una solución con 30% de sacarosa.

von Arnold y Hakman (1986) ensayaron distintas concentraciones de sacarosa (0.1-5%) y encontraron una relación entre éstas y la aparición de callos embriogénicos. Concentraciones menores o mayores de 1% sacarosa promovieron bajos porcentajes de callo embriogénico en medio LP. La misma observación pudo hacerse en medio 59 (Norstog y Rhamstine, 1967), pero en éste la concentración óptima de sacarosa fué 3%. Cultivos embriogénicos de varias especies de cicadas han incluido en el medio 6% de

sacarosa (Chávez et al., 1992a,b,c) (Tabla 14).

Tremblay y Tremblay (1991) encontraron en cultivos embriogénicos iniciados a partir de embriones cigóticos de Picea mariana y P. rubens que el número de embriones somáticos incrementó al aumentar la concentración de sacarosa desde 1, 3, hasta un óptimo de 6%, seguido de una rápida disminución en 9%; con 12% no se formaron embriones. Resultados similares se obtuvieron con P. glauca (Lu y Thorpe, 1987; Hakman y von Arnold, 1988); Picea abies (von Arnold y Hakman, 1988; Jain et al., 1988) y Pinus strobus (Finer et al., 1989).

Finer et al. (1989) observaron que el callo embriogénico proliferó considerablemente en medio con 1 y 3% de sacarosa, en tanto que con 12% el crecimiento fué mínimo, al igual que ocurrió en P. strobus.

En nuestros cultivos de callo (que inicialmente fueron cultivos embriogénicos) (Tablas 20-26) de C. mexicana, con y sin hormonas encontramos el mismo comportamiento: con 6% se logró el mayor crecimiento en tanto que a concentraciones menores (0, 3%) o mayores (12% y en el gradiente (de 0-12%) el crecimiento fué menor. Resultó de interés que aún en ausencia de sacarosa el cultivo continuó creciendo hasta valores cercanos a los obtenidos con 3%; o mayores que con 12% o con el gradiente, aún a 7 meses de iniciados los tratamientos (Tabla 20) y ya que los cultivos fueron mantenidos en oscuridad, una posibilidad para explicar dicho aumento es que durante el tratamiento el callo pudo emplear reservas almacenadas que resultaron suficientes dado su lento crecimiento.

De acuerdo a los tratamientos con sacarosa, el crecimiento del callo fué comparativamente menor dentro de los primeros 3 meses que en los meses posteriores como lo muestran los resultados a 7 meses de iniciados los tratamientos (Tabla 20). Este hecho no fué privativo para este grupo de tratamientos en que se variaron las concentraciones de sacarosa pues también fué observada esta tendencia en los ensayos con ABA (Tabla 35). Dentro del mismo período de tiempo estos cambios coinciden con valores altos (al menos los primeros 45 días) en la concentración de etileno acumulado en los cultivos de callo (Tabla 27). Con base en ello, es posible señalar que los fragmentos de cultivos embriogénicos formado de folíolos inmaduros de C. mexicana producido en presencia de K y 2,4-D 1 mg/l, después de que se subcultivaron para iniciar estos ensayos, entraron en una etapa de adaptación a las nuevas condiciones y de reparación de tejidos. En esta etapa ocurre oxidación del callo y coincide con escaso crecimiento que se prolongó al menos por 3 meses (Tabla 20).

Posteriormente se detectaron concentraciones menores de etileno (Tabla 27) que fueron medidas hasta 3 meses después de iniciados los cultivos, y de acuerdo a su tendencia posiblemente continuaron bajas. En forma paralela ocurre crecimiento del callo (Tabla 20) y cambios morfo genéticos que llevaron al desarrollo de embriones somáticos (Tabla 19).

La intención de ensayar los cultivos embriogénicos en distintas concentraciones de sacarosa fué poder promover un mayor desarrollo más normal y maduración de embriones somáticos, sin embargo ésto no se cumplió pues los cultivos se tornaron en un

callo compacto no morfogénico. Attree *et al.* (1989) señalan que cultivos embriogénicos formados a partir de protoplastos de embriones cigóticos de Picea glauca se convirtieron en callos no embriogénicos. Gupta y Durzan (1987) citan que algunos de sus cultivos de masas de embriones y suspensores se volvieron no embriogénicos al cambiar alguna condición del cultivo.

Asimismo, los ensayos con ABA con los que se buscaba reducir la frecuencia de embriogénesis secundaria y promover un desarrollo más normal y la maduración de los embriones a la vez que evitar germinación precoz (Ammirato, 1989) no aportaron progreso en los fragmentos de cultivos embriogénicos ensayados pues sufrieron una fuerte oxidación se compactaron formando callo no morfogénico y sólo tuvieron un limitado crecimiento. Durzan y Gupta (1987) lograron promover el desarrollo individual y la maduración de embriones somáticos al aplicar ABA 0.5  $\mu\text{M}$  a fragmentos de las masas de embriones y suspensores que obtuvieron de embriones cigóticos de Pseudotsuga menziesii.

Las concentraciones utilizadas (1, 5, 20  $\mu\text{M}$ ) con C. mexicana se encuentran dentro de los valores citados en la literatura. Attree *et al.* (1990) compararon un rango de concentraciones de ABA durante la maduración de embriones somáticos de Picea glauca y P. mariana y observaron que una corta exposición a 32  $\mu\text{M}$  ABA no resultó tan efectiva como la aplicación de 16  $\mu\text{M}$  ABA por 28 días. Por lo que parece recomendable que de hacerse nuevos intentos en un futuro, deberán ensayarse distintas concentraciones y períodos de aplicación de ABA, así como distintos estados de desarrollo de los cultivos embriogénicos y de embriones somáticos.

Las auxinas son factores del medio de cultivo que tienen un importante papel en el proceso de embriogénesis somática, el uso de 2,4-D o de otra auxina sintética, como dicamba, ha sido una práctica general, usualmente sola o en combinación con una citocinina, BA, 2iP o K. Una concentración de 1-2 mg/l de 2,4-D es comúnmente utilizada.

Norstog y Rhamstine (1967) lograron inducir la formación de embriones somáticos de Z. pumila a partir de embriones cigóticos en medio 59, con K/2,4-D 1 mg/l y a partir de megagametofitos con K 0.5 mg/l + 2,4-D 0.1 mg/l. La formación de "pseudobulbillos" se logró después de subcultivar el callo a medio sin hormonas.

Como antecedentes de la embriogénesis somática en C. mexicana, a partir de megagametofitos solamente ocurrió en la combinación de K 3 mg/l + 2,4-D 2 mg/l; y a partir de embriones cigóticos en un rango más amplio (K 0-3 mg/l + 2,4-D 0-2 mg/l) incluyendo la combinación de K/2,4-D 1mg/l (Chávez et al., 1992a).

En el presente estudio también se utilizaron K y 2,4-D y el medio de inducción de embriogénesis las contenía en una concentración de 1 mg/l de cada una. En este medio no sólo se indujo la embriogénesis sino que también se desarrollaron embriones en estado precotiledonar (Tablas 18, 19). Esta misma observación hicieron Gupta y Durzan (1986) quienes encontraron que el callo de Pinus lambertiana era capaz de poliembriogénesis somática aun en un medio con 2,4-D. El subcultivo de callo embriogénico y de embriones a medio sin reguladores del crecimiento o con BA 0.1 mg/l favoreció su desarrollo.



En el esquema de la metodología general para la obtención de embriones somáticos (Komamine *et al.*, 1990) se considera que es necesaria la presencia de una auxina, usualmente 2,4-D, no sólo para establecer la actividad mitótica de las células sino fundamentalmente para inducir la embriogénesis. Para lograr el desarrollo posterior (maduración) de los embriones, las células deben subcultivarse a medio sin auxinas, de no ser así, no prosperarán pues resultarían inhibidos por ésta. No obstante, de acuerdo con el esquema propuesto por Sharp *et al.* (1980) puede existir una población celular que después de la inducción de la embriogénesis y aún en presencia de 2,4-D las células pueden formar embriones en baja frecuencia (Low Frequency Somatic Embryogenesis, LFSE).

La formación de embriones somáticos de *C. mexicana*, en presencia de 2,4-D aparentemente difiere del esquema básico del proceso embriogénico (Komamine *et al.*, 1990).

Como posibles vías de control de niveles de auxina, se ha encontrado que por ejemplo en la soya el 2,4-D absorbido puede ser conjugado con aminoácidos para formar ácidos como el ácido 2,4-D -glutámico y el 2,4-D -aspártico. Otra posibilidad de control puede ser la que presentan células de *Daucus carota* al liberar 2,4-D al medio (preferentemente en medio sin hormonas), después de una prolongada exposición a esta hormona, lo que permite a las células llegar a expresar su capacidad embriogénica (Montague *et al.*, 1981a,b, citados por George y Sherrington, 1984).

Respecto a la capacidad que presentaron los cultivos embriogénicos de C. mexicana, de seguir creciendo en ausencia de fitoreguladores pudo deberse a que las hormonas endógenas así lo permitieron y quizá las células desarrollaron habituación.

En un estudio sobre los efectos de tres métodos de sellado en cultivos de Gerbera jamesonii Bolus y Ficus lyrata Warb, Jackson et al. (1991) hicieron durante 28 días determinaciones de las tasas de producción y de escape de etileno así como lecturas de las concentraciones de etileno acumulado después de varios días y encontraron como era lo esperado, poco etileno ( $< 0.05 \mu\text{l/l}$ ) en frascos con sello laxo (con sólo la tapa del frasco), con sello moderado encontraron hasta  $0.83 \mu\text{l/l}$  (frasco con tapa y una vuelta de Nescofilm, PVC) y en recipientes fuertemente sellados (frasco con tapa y 2 vueltas de Nescofilm, PVC) encontraron etileno acumulado hasta en  $5.4 \mu\text{l/l}$ .

En los cultivos de callo de C. mexicana se identificó etileno en las muestras de la fase gaseosa. Las determinaciones cada 15 días a lo largo de 3 meses revelaron que este gas estuvo presente en estos cultivos (al menos durante los 3 primeros meses en que se realizaron los análisis) en los cuales se mantuvieron condiciones que se asemejan a las que se emplearon para inducir morfogénesis. En especies (como las cícadas) de lento desarrollo se requieren prolongados períodos de incubación para lo cual se toman medidas preventivas y así proteger los cultivos de infecciones y desecación, pero es posible que se ocasione una pobre aereación de los tejidos, provocando que gases producidos metabólicamente como el etileno que es un regulador del crecimiento ( $0.001-10$

$\mu\text{l/l}$ , Burg 1968 citado por Jackson *et al.*, 1991) se acumule en concentraciones y por tiempos que afecten negativamente las respuestas morfogénicas. El etileno se ha significado como un factor que afecta el crecimiento y diferenciación de los tejidos positiva o negativamente (en términos de morfogénesis normal). En el presente estudio debido a que los fragmentos de cultivos inicialmente embriogénicos se convirtieron en callo no morfogénico, se desecaron y adoptaron un color pardo, y así también debido a que no se determinaron las tasas de producción de etileno ni de escape de este gas con el tipo de sellado (apretado) que se aplicó, los resultados (Tablas 27-34) solamente reflejan la concentración de etileno acumulado en el tiempo transcurrido desde la siembra inicial hasta la fecha y el momento de la determinación del etileno, por lo que posibles variaciones grandes o pequeñas entre lectura y lectura no se documentaron. Esto hace que una posible discusión de los resultados caiga en el terreno de las especulaciones y por ello no se ofrece aquí. En los cultivos embriogénicos y embriones somáticos de *C. mexicana* aún en etapa cotiledonar se observó que su exposición a la luz o a temperaturas arriba de  $30^{\circ}\text{C}$  y por debajo de  $25^{\circ}\text{C}$  podían provocar su oxidación, lo mismo ocurrió después de que se subcultivaron fracciones de los cultivos embriogénicos para iniciar los ensayos con sacarosa, ABA y las mediciones de etileno, o simplemente en las labores de mantenimiento. La oxidación de los callos generalmente se superaba 3 meses después del subcultivo en que aparecía nuevo callo amarillento (Tablas 19, 20, 22, 24). Los embriones no sobrevivieron.

La fuerte oxidación de compuestos fenólicos en folíolos, callos, cultivos embriogénicos y embriones somáticos de C. mexicana confirman que esta respuesta es un serio problema comúnmente asociado con los cultivos de tejidos de plantas tropicales leñosas (Litz y Jaiswal, 1991). Rohr et al. (1989) describieron depósitos fenólicos en suspensores de embriones somáticos en maduración de Larix decidua. La integridad del suspensor resultó fundamental para la sobrevivencia de los embriones cigóticos cultivados in vitro de Capsella bursa-pastoris, estudiada por Monnier (1984). Lesiones en el suspensor durante la disección de los embriones a partir de los óvulos propiciaron su muerte entre otras causas por a) la liberación de polifenoles que conducen a una reacción en cadena, matando más células por oxidación, b) por la penetración repentina y rápida de sales minerales.

En los cultivos embriogénicos de C. mexicana fué común que después de 1-2 días de efectuadas resiembras de fragmentos tomados (aún sin corte) de una porción mayor, se presentó una intensa y extendida (oxidación) coloración parda que generalmente no resultó letal a todas las células, pues 3-4 meses después aparecieron tejidos nuevos (Fig. 18).

Aún cuando en los cortes histológicos no se observó una secuencia completa, del desarrollo de los embriones somáticos, un esquema posible de ello con base en las estructuras observadas (Figs. 22 A-K) permiten señalar que el proceso embriogénico a partir de folíolos inmaduros de individuos adultos de C. mexicana se asemejaría al proceso cigótico en cícadas (Chamberlain, 1957; Norstog, 1982) y de otras gimnospermas (coníferas); así también a

etapas de la embriogénesis asexual en coníferas. En cícadas este proceso no se ha descrito.

Grupos de células parenquimáticas parecidas a las encontradas en callo formarían células de tipo meristemático, pequeñas con denso citoplasma (Figs. 22A) constituyendo así el posible callo embriogénico. Kohlenbach (1978) consideró la inducción de la embriogénesis somática como la transformación de células previamente parenquimáticas vacuoladas, cambiando a un tipo celular con denso citoplasma y determinación embriogénica. Hakman y Fowke (1987) encontraron a partir de cultivos embriogénicos en suspensión de Picea glauca generados de embriones cigóticos, que la región meristemática embrionaria parece ser iniciada por una división asimétrica de células vacuoladas. Observaciones similares fueron citadas por von Aderkas y Bonga (1988) y Rohr et al. (1989) en cultivos embriogénicos de megagametofitos de Larix decidua donde previo al desarrollo de embriones, células de tipo parenquimático forman, por divisiones asimétricas, células pequeñas con denso citoplasma.

En C. mexicana posiblemente en algunas de las células pequeñas el núcleo se dividiría sin citocinesis (Figs. 20 C1, C2, 22 B), éstas se alargan y cada núcleo migra hacia un extremo, y hacia uno de ellos también se desplaza la mayor parte del citoplasma, para después formar paredes celulares y constituir dos células, estableciéndose una bipolaridad; con una célula pequeña con denso citoplasma en un extremo y en el otro, una célula alargada con poco citoplasma y gran vacuola (22 C2).

En el modelo de desarrollo del proembrión cigótico de coníferas, después de la migración de núcleos libres, se forman dos células, la proembrional primaria (pE) y una célula (pU) (de la parte superior) que formará al suspensor. Este modelo pE/pU o E/U es comúnmente llamado el patrón básico y es un estado de desarrollo primitivo común a todas las gimnospermas (Dogra, 1980, 1984 citado por Durzan y Durzan, 1991). La célula proembrional contribuye a la formación del proembrión (E) el cual puede dividirse para formar múltiples embriones (poliembriónia) (sin un estado de callo intermedio) o diferenciarse en un solo (cuerpo) proembrión. Este modelo de desarrollo con etapa de 2 núcleos libres también ocurre en la poliembriogénesis somática de Picea abies y Pinus taeda (Durzan y Durzan, 1991), y Pseudotsuga menziesii (Durzan y Gupta, 1987).

Para C. mexicana una posible etapa siguiente implicaría un coenocito multinucleado (no observado) (Fig. 22D,E) formado a partir de la célula (con más citoplasma) proembrional en la que por divisiones sucesivas del núcleo se formarían 4 a 8 núcleos libres como ocurre en el estado de proembrión de Pinus (Buchholz, 1920) o bien 8 núcleos, para después formar paredes celulares, como citan Attree y Fowke (1991) en el esquema general cigótico de coníferas (Figs. 21B). En la etapa de núcleos libres del proembrión cigótico en cícadas el número de éstos varía y puede llegar a más de 1000. Después, las primeras paredes celulares se forman en el extremo correspondiente al cuerpo del embrión (Chamberlain, 1957; Norstog, 1982).

Las siguientes etapas corresponderían a formas proembrionarias pluricelulares en las que persiste la bipolaridad, una región formada por células pequeñas y densas; y otra de células grandes, largas y vacuoladas (Figs. 20 C3, 20 D, 22F). Las hileras superiores formadas de células pequeñas conforman el cuerpo del proembrión. El suspensor estaría formado por células derivadas de la inicial superior del suspensor (pU) (Durzan y Durzan, 1991) y probablemente por células alargadas, derivadas de las pequeñas del cuerpo del proembrión somático de *C. mexicana*.

En el proceso cigótico de las coníferas (Attree y Fowke, 1991) se forman 2 hileras de 4 células cada una, que después se dividen en 16, distribuidas en 4 hileras. En este estado, la tercera hilera se alarga y participa en la formación del suspensor (Fig. 21 C,D).

En la embriogénesis somática en *Larix decidua* puede ocurrir o no una fase de coenocito con núcleos libres, resultando después un agregado de células pequeñas que pueden entrar o no en un ciclo repetitivo en que se forman células alargadas (radiando en todas direcciones) y estas generan células pequeñas, hasta que en uno de estos ciclos las células largas se forman paralelas en una dirección adoptando las funciones de suspensor (von Aderkas y Bonga, 1988; Rohr *et al.*, 1989).

En *C. mexicana* una vez conformado un embrión éste generalmente se presentó vitrificado con los tejidos laxos. En esta condición fué capaz de entrar en un ciclo repetitivo de poliembriogénesis generando nuevos embriones somáticos a partir del cuerpo o del suspensor (Figs. 20 G).

Posteriormente las células pequeñas y largas del proembrión continuaron dividiéndose y su integración al cuerpo y suspensor del embrión contribuyó a reducir espacios intercelulares permitiendo eventualmente consolidar y compactar al embrión que adoptó una forma de domo y dejó de ser una estructura laxa (Fig. 22H). Los embriones y sus largos suspensores se tornan blancos debido a una alta acumulación de almidón (Fig. 22 I).

Posteriormente se desarrollan dos cotiledones que crecen y que al germinar el embrión se separan dando paso a la primera hoja. En tanto, emerge la radícula a través de la coleorriza (22J,K). Otro esquema del posible desarrollo podría ser el propuesto por Litz (com. pers.) que iniciaría a partir de grandes células vacuoladas alargadas. Células de éste tipo han sido observadas por Litz en cultivos embriogénicos de cicadas y también se han identificado como embriogénicas en cultivos de coníferas. En ambos grupos vegetales aparecieron en una matriz mucilaginoso o bien en estado libre en cultivos en suspensión (Durzan y Durzan, 1991). Estas células alargadas posiblemente se forman de células inicialmente más pequeñas y esféricas, que quizá éstas también inicien el proceso de embriogénesis (Fig. 23 A). En los cultivos de *C. mexicana* se observaron ambos tipos de células.

Las células alargadas o esféricas previa inducción embriogénica se dividirían de manera asimétrica formando una célula pequeña con denso citoplasma y otra alargada (Fig. 23 B), hecho que también coincide con lo descrito en coníferas (Durzan y Durzan, 1991; von Aderkas y Bonga, 1988). Litz deja abierta la posibilidad de que una fase previa o posterior a ésta pudiera ser



de núcleos libres.

A partir de la célula pequeña se originarían las células del cuerpo del embrión, en tanto que de la célula alargada derivaría el suspensor (Fig. 23 C) comúnmente vitrificado. Después, por una nueva inducción hacia un proceso de poliembriogénesis, células del cuerpo y/o del suspensor se formarían nuevos embriones de manera repetitiva sin una fase intermedia de callo con lo cual llegan a formarse redes de embriones interconectados (Fig. 23 D). Eventualmente algunos embriones empiezan a compactarse (Fig. 23 E) y a presentar una superficie firme, lisa y blanca (Fig. 23 F), posteriormente los embriones forman cotiledones y llegan a germinar (Figs. 23 G, H).

La falta de estudios histológicos sobre regenerantes in vitro de cícadas fué en parte compensada por las descripciones de material in vivo de embriones cigóticos, realizadas por Chamberlain (1912, 1957) quien señala que la primera diferenciación es una elongación de las células que formarán al suspensor. Las regiones del cuerpo del embrión se diferencian muy lentamente, las células son bastante uniformes aún después de que son distinguibles los cotiledones y la coleoriza. La característica más notable es el suspensor el cual deriva de los varios embriones que se hayan formado en el megagametofito. El embrión puede ser visto a pesar del enrollamiento y giros que hace el suspensor que se alarga dentro del gametofito. Otra característica notable es la coleoriza, que aparece temprano en la embriogénesis y conforme madura el embrión se hace muy dura. En las semillas que germinan, el ápice de la raíz atraviesa la coleoriza y crece rápidamente,

en tanto, el tallo permanece inconspicuo cubierto por los cotiledones que pueden diferir en tamaño, después usualmente aparece una sola hoja.

Generalmente la descripción de los cultivos embriogénicos de coníferas es con base en embriones inmaduros (Fig. 21E) y sólo en pocas investigaciones se han descrito estados de proembriones (Attree y Fowke, 1991).

En los cultivos embriogénicos de *C. mexicana* se observaron posibles etapas de núcleos libres y fué patente la homogeneidad de las células en el cuerpo del embrión y la parte más prominente siempre resultó el suspensor cuyo desarrollo no fué mencionado en los primeros estudios de embriogénesis somática en cícadas (Norstog, 1965; Norstog y Rhamstine, 1967; De Luca *et al.*, 1979 Webb *et al.*, 1983), más tarde fué mencionado en cultivos de coníferas (Hakman *et al.*, 1985; Nagmani y Bonga, 1985), y recientemente se encontró en las cícadas *C. hildae* y *C. mexicana* y *Z. fischeri*, *Z. furfuracea* y *Z. pumila* (Chávez *et al.*, 1992a,b).

En las primeras etapas de desarrollo los embriones somáticos tuvieron poca diferenciación pero fué posible distinguir varias fases semejantes a las (4) establecidas por von Arnold y Hakman (1988), durante la regeneración de plántulas a partir de embriones somáticos de *Picea abies*. 1) Embriones con una estructura laxa formados de una región embrional meristemática de pequeñas células, con denso citoplasma, subtendidas por un suspensor de células largas y vacuoladas, 2) embriones más compactos con una región embrional meristemática más prominente y

densa de color blanco opaco, los embriones continúan ligados al callo a través del suspensor, 3) embriones compactos con prominentes cotiledones de color amarillo pálido, y el suspensor aún adherido, 4) plántulas verdes.

Comparativamente en términos generales los embriones somáticos de C. mexicana atraviesan por etapas semejantes, a) embriones somáticos formados de células pequeñas meristemáticas con denso citoplasma, donde la característica más distintiva es la diferencia entre las células del cuerpo y las del largo suspensor (Fig. 20E) (etapa 1), b) en otro grupo más avanzado de embriones, el cuerpo es más prominente, consolidado y es posible reconocer dos meristemas, uno apical y otro radicular y con ello la bipolaridad de los embriones (Fig. 20J) (etapa 2); y c) embriones con cotiledones en los cuales se observan células provasculares que no se continúan ni se conectan con tejidos externos al cuerpo del embrión, es posible reconocer la coleoriza (Fig. 20H, J) (etapa 3).

En el presente estudio surgieron nuevas interrogantes y problemas por resolver como por ejemplo si el procedimiento descrito para inducir la embriogénesis resultará efectivo con otras especies de cícadas; si todos los embriones somáticos obtenidos presentan el mismo sexo, si los embriones regenerados mantienen estabilidad genética o presentan variaciones. Y entre los problemas más inmediatos por resolver quedan, evitar la oxidación de los tejidos; poder sostener el desarrollo de los embriones sin que pierdan organización y llegar a adaptar plántulas a condiciones de invernadero.

La micropropagación vía embriogénesis somática ofrece ventajas significativas sobre la micropropagación vía organogénesis (Attree y Powke, 1991) no sólo en la multiplicación de un mayor número de individuos de especies escasas en la naturaleza, sino que, ofrece ser una tecnología enfocada a la multiplicación clonal en gran escala de árboles con características selectas para bosques bajo cultivo intensivo que son aprovechados en distintas industrias (Gupta y Durzan, 1986). Una de las ventajas más inmediatas es que el enraizamiento de nuevos individuos ocurre sin la necesidad de complejos tratamientos para la inducción de raíces (Mohammed y Vidaver, 1988). Pero hasta ahora, en las gimnospermas los embriones somáticos solamente se habían podido inducir a partir de tejidos embrionarios y dado que las cualidades superiores de determinados individuos son conferidas por complejos de genes, estas combinaciones únicas se pueden perder durante la reproducción sexual (Litz, 1985).

La propagación vegetativa se ha utilizado para preservar las características de plantas altamente apreciadas pero en su aplicación en gimnospermas se presentan las mismas limitantes mencionadas, pues cuando se intenta la regeneración vía yemas adventicias, éstas son inducidas sólo de tejidos de plántulas, no obstante, es éste uno de los métodos más empleados en la micropropagación de coníferas.

Hasta ahora no ha sido posible inducir la regeneración *in vitro* a partir de tejidos de coníferas maduras, lo cual sería deseable de aquellas con calidad superior.

La embriogénesis somática a partir de folíolos de individuos adultos de la cícada C. mexicana se asemeja al proceso descrito en coníferas en la regeneración a partir de callo derivado de embriones cigóticos de Picea abies (Hakman et al., 1985) y de megagametofitos de Larix decidua (Nagmani y Bonga, 1985; von Aderkas y Bonga, 1988) por lo que los resultados aquí obtenidos prometen ser alcanzados en otras cícadas y demás gimnospermas explorando el tipo y estado de desarrollo de los explantes somáticos, así como del medio de cultivo.

La implementación de la metodología utilizada en este estudio podría brindar una valiosa tecnología para propagar individuos maduros de coníferas selectas y proveer una práctica fuente de material experimental para estudios de crecimiento y diferenciación del embrión. La criopreservación de cultivos embriogénicos permitiría el almacenamiento a largo plazo de genotipos particularmente valiosos, (Withers, 1985) en tanto se desarrollan ensayos por ejemplo de fitomejoramiento a través de manipulaciones genéticas.

Los avances en el conocimiento de la genética de células somáticas vegetales han demostrado un enorme y promisorio potencial en el mejoramiento de muchos cultivos agronómicos de países desarrollados, sin embargo, la plena aplicación de éstos sofisticados avances en el laboratorio son dependientes del desarrollo de métodos de regeneración de plantas completas a través del cultivo de células y tejidos vegetales que a diferencia de los elaborados y costosos procedimientos de biología molecular, son alcanzables por los países en desarrollo

y donde éstas técnicas deberán ser adaptadas y aplicadas prioritariamente en la propagación y mejoramiento de sus especies y cultivares de uso regional y a nivel nacional que además de proveer satisfactores para consumo en el mismo país, su exportación representaría una fuente principal de divisas. Debe advertirse la importancia de los recursos que ofrecen las floras nativas para el desarrollo de cada país y reconocer la necesidad de realizar inventarios, de proteger, investigar y capitalizar racionalmente sus recursos naturales hasta ahora poco conocidos y por ello en gran medida menospreciados. Si se analizan las aparentes ventajas de las plantas ya domesticadas sobre las capacidades de las plantas silvestres o menos exploradas, generalmente se apreciará una desproporcionada atención en investigación que se les ha brindado a las primeras. Muchas especies indígenas que aún utilizan los distintos grupos étnicos como en nuestro país, contienen una riqueza de nuevos y probablemente mejores recursos (especies, frutos, fragancias, ceras, aceites, grasas, colorantes, fibras, hules, gomas, resinas, fármacos, pesticidas biodegradables, genes de resistencia a factores del medio ambiente, etc.) no sólo para el hombre sino para los organismos silvestres.

Desde las primeras publicaciones sobre embriogénesis somática generadas en cícadas (La Rue, 1948, 1954; Norstog, 1965) y años después en coníferas (Hakman et al., 1985; Nagmani y Bonga, 1985) los métodos en cultivos de tejidos han progresado y permitido la utilización de distintas fuentes de explantes, desde megagametofitos y embriones cigóticos inmaduros a embriones

cigóticos maduros y plántulas.

Norstog (1987) había señalado que las cícadas pueden proveer conocimientos sobre el crecimiento y desarrollo de otras gimnospermas y angiospermas. La embriogénesis somática a partir de folíolos de C. mexicana confirma por primera vez el potencial morfogénético de estas estructuras vegetativas obtenidas de una gimnosperma madura lo cual es indicativo de que en un futuro, esta capacidad puede ser desarrollada en otras especies de este importante grupo vegetal y podría permitir la micropropagación y/o manipulación genética de especies que merecen una urgente atención en programas con orientación ecológica y de aprovechamiento comercial. Sin embargo, por ahora la implicación más directa e inmediata se relaciona con la conservación de la especie C. mexicana y de otras cícadas que se encuentran en serio peligro de extinción y que forman parte de la diversidad silvestre de nuestro país.

**FIGURAS****Figs. 1-19. ASPECTOS MORFOLOGICOS**

Fig. 1. Ceratozamia mexicana, individuo femenino maduro.  
Escala= 1 m .

Fig. 2. Callo embriogénico, amarillento friable, áreas blancas a hialinas, apariencia húmeda, mucilaginoso. Escala = 2.5 cm

Fig. 3. Cultivo embriogénico, se observan embriones somáticos (es) semejantes a pequeños nódulos y una trama de largos suspensores (s) vitrificados (de aspecto cristalino).  
Escala= 3 mm .

Fig. 4. Dos embriones somáticos unidos por el cuerpo (ce) ligados a dos suspensores (s). Posible poliembriogénesis. De los suspensores emergen pequeños suspensores (filamentos) indicando que se producen nuevos embriones. Escala= 1 mm.

Fig. 5. Embrión vitrificado, cuerpo (ce) y suspensor (s) formando nuevos embriones con apariencia de filamentos cristalinos que se separan. Poliembriogénesis. Escala= 1 mm

Fig. 6. Embrión somático en etapa temprana. Se observa un suspensor largo (s) y en el extremo el pequeño cuerpo del embrión (ce).  
Escala= 5 mm.

Fig. 7. Embrión somático con cuerpo (ce) denso, compacto y suspensor (s) blanco-hialino. Escala= 1.5 mm.

Fig. 8. Embrión somático con el cuerpo del embrión más consolidado, blanco y liso; el suspensor (s) presenta el color blanco en una mayor extensión. Escala= 1.5 mm

Fig. 9. Embrión somático con el cuerpo (ce) consolidado y blanco, el suspensor (s) se presenta blanco-pardo y aún con estructura multifilamentosa, no se ha compactado lo suficiente.  
Escala= 1.5 mm

Fig. 10. Embrión en etapa cotiledonar temprana. Los cotiledones (c) aún unidos, de color blanco ligeramente amarillentos. Suspensor (s). Escala = 2 mm

Fig. 11 y 12. Embriones en etapa cotiledonar (cotiledones =c) de color amarillo pajizo; el brote (b) pubescente emergiendo, el suspensor (s) con estructura multifilamentosa está oxidado.  
Escala= 3 mm.

Fig. 13. Embrión somático en germinación, se observan 2 cotiledones y en el extremo opuesto emerge la radícula.  
Escala = 2.5 cm.



Fig. 14. Plántula de *C. mexicana* var. robusta obtenida a partir de la germinación de un embrión somático. Brote (b), cotiledones (c), radícula (r), suspensor (s). Escala= 1.2 cm.

Fig. 15. Embrión somático con una cubierta de apariencia membranosa sobre el cuerpo y los cotiledones, la radícula (r) ya emergió.  
Escala = 2 cm

Fig. 16. Embrión somático con el cuerpo cubierto por una membrana semejante a un coleoptilo, el extremo distal se abrió y han emergido dos cotiledones y el brote (b). Radícula (r). Escala = 2 cm

Fig. 17. Embrión somático con un solo cotiledón con el extremo distal lobulado, el brote (b) pubescente inicia su aparición.  
Escala = 8 mm

Fig. 18. Fragmentos de cultivo embriogénico en gradiente de sacarosa (0-12%), la mayoría oxidados, sólo algunos con nuevos tejidos amarillentos (-->). Escala= 4 cm

Fig. 19. Grupos de embriones somáticos vitrificados, entrelazados por suspensores. Proliferan en ciclos repetitivos de inducción poliembrionogénica (ver Fig. 22 G). Suspensores (s).  
Escala = 2.5 cm

#### ANÁLISIS HISTOLÓGICO

#### FIGS. 20 A-L. ALGUNAS FASES OBSERVADAS DEL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS FORMADOS A PARTIR DE FOLIOLOS DE INDIVIDUOS ADULTOS DE *C. MEXICANA* VAR. ROBUSTA

Fig. 20 A. Células parenquimáticas del callo embriogénico en corte parcial de un suspensor en cultivo embriogénico. 64X. Núcleo (n).

Fig. 20 B. Transición de células parenquimáticas (pa) (suspensor) a tipo meristemáticas (me) (cuerpo), en un embrión precotiledonar. 64X.

Fig. 20 C1. Posible célula binucleada, poco alargada. 64X.

Fig. 20 C2. Posible célula binucleada alargada con un polo vacuolado y otro con denso citoplasma. 64X.

Fig. 20 C3. Grupo de 4-8 células pequeñas, subtendidas por 1-2 células alargadas vacuoladas. Posible estado de proembrión. 64X.

Fig. 20 D. Posibles proembriones somáticos, se distinguen dos polos: células pequeñas en un extremo y alargadas (pa) que formarán el suspensor en el otro extremo. (Notar semejanza con Figs. 21 C y D). Una tercera estructura en el extremo izquierdo es posiblemente similar a las otras dos, pero en un ángulo de corte diferente. 64X.

Fig. 20 E. Corte longitudinal de embrión somático en etapa precotiledonar. Se distingue el suspensor (s) del cuerpo del embrión (ce). 25.2X.

Fig. 20 F. Corte longitudinal de embrión somático. Localización del cotiledón mediante microscopía de polarización, se observa como numerosos puntos blancos en el suspensor. 25.2X. Cuerpo del embrión (ce), suspensor (s).

Fig. 20 G. Corte longitudinal de embrión somático en etapa cotiledonar temprana. 25.2X. Cotiledón = c.

Fig. 20 H. Corte longitudinal de embrión somático, con iniciación del tejido provascular (pv). 25.2X.

Fig. 20 I. Corte longitudinal de embrión somático en la base de un cotiledón. Se observan algunas células de la epidermis diferenciadas en tricomas (tr), otras dentro del cuerpo han formado idioblastos (i) con un denso contenido. 64X.

Fig. 20 J. Corte longitudinal de embrión somático en etapa cotiledonar mostrando el meristemo apical del tallo (ma) y de la raíz (mr), se observan idioblastos (i). 25.2X.

Fig. 20 K. Corte de la región apical de un embrión somático vitrificado que está perdiendo organización. Células (del cuerpo) tipo meristemático (me) y (del suspensor) tipo parenquimático (pa). 25X.

Fig. 20 L. Embrión precotiledonar vitrificado que probablemente está experimentando una inducción embriogénica secundaria. El cuerpo (ce) está generando células tipo parenquimático alargadas (ver Figs. 20 C y 22 G) y nuevos pro-embriones (pe, ver Fig. 20 D). 25X. Suspensor (s).

**FIGS. 21 A-E DESARROLLO DEL ENBRION CIGOTICO EN CONIFERAS.  
(ATTREE Y FOWKE, 1991)**

Fig. 21 A. Ovulo con gametofito femenino con dos arquegonios.

Fig. 21 B. Proembrión de 4 núcleos libres. Después de la fertilización el núcleo del cigoto se divide y los núcleos migran al polo opuesto a las células del cuello .

Fig. 21 C. Proembrión de 16 células distribuidas en 4 hileras de 4 células. Las células proximales permanecen "abiertas" al citoplasma del huevo.

Fig. 21 D. Proembrión este estado se completa cuando las células de la tercera hilera del suspensor se alargan.

Fig. 21 E. Embrión inmaduro en un estado comparable a los reportados en cultivos embriogénicos somáticos.

**FIGS. 22 A-K POSIBLE ESQUEMA DE EMBRIOGENESIS SOMATICA A PARTIR DE CALLO DE HOJAS DE PLANTAS MADURAS DE C. MEXICANA VAR. ROBUETA. CON FASES DE NUCLEOS LIBRES**

Fig. 22 A. Células de tipo parenquimático que posiblemente se encuentran libres e una matriz mucilagínosa o formando parte de tejidos (embriones). Se alargan y se dividen asimétricamente.

Fig. 22 B. Células en división celular con migración de núcleos y citoplasma.

Fig. 22 C. Se forman dos células, una pequeña con denso citoplasma que originará al cuerpo del embrión y una larga que generará al suspensor.

Figs. 22 D, E. La célula pequeña posiblemente aumenta de tamaño y se divide su núcleo hasta un cierto número de éstos, por ejemplo 8, como ocurre en coníferas (Pinus).

Fig. 22 F. Se forman paredes celulares estructurando un embrión somático de tejidos laxos.

Fig. 22 G. Los embriones pueden proliferar vía poliembriogénesis, generando una trama de más embriones, generalmente con apariencia vitrificada, derivados de células del cuerpo y/o del suspensor (ver Figs. 4, 5, 19, 21 L).

Fig. 22 H. Eventualmente los embriones pueden empezar a compactarse. Los tejidos se vuelven menos laxos.

Figs. 22 I-K Embriones somáticos consolidados en fase precotiledonar (blancos) y cotiledonar (blanco-amarillentos). Radícula (r), suspensor (s).

**FIGS. 23 A-H. POSIBLE ESQUEMA DE EMBRIOGENESIS SOMATICA A PARTIR DE CALLO DE HOJAS DE PLANTAS MADURAS DE C. MEXICANA (INTERPRETACION DE ACUERDO A LITZ, COM. PERS.)**

Fig. 23 A. Células alargadas (o probablemente esféricas) que previo un proceso de inducción embriogénica se podrían dividir asimétricamente.

Fig. 23 B. Se forman 2 células, una pequeña que podría ser la inicial del cuerpo del embrión y una larga que originaría al suspensor.

Figs. 23 C, D. Un embrión vitrificado y con inducción embriogénica secundaria podría formar grupos entrelazados de embriones somáticos derivados de células del cuerpo o del suspensor.

Figs. 23 E-H. Corresponden al establecimiento de embriones somáticos que podrían llegar a madurar y germinar.

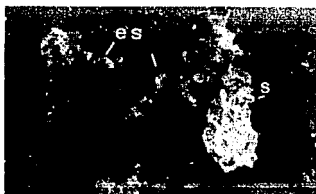
FIGS. 1-19. ASPECTOS MORFOLOGICOS



1



2



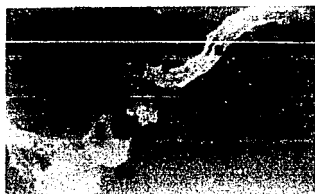
3



4



5

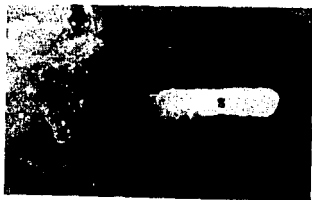


6





7



8



9



10



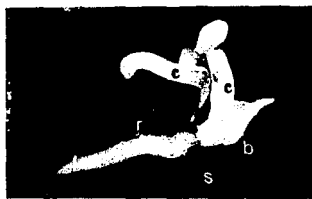
11



12



13



14



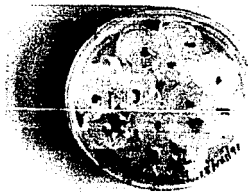
15



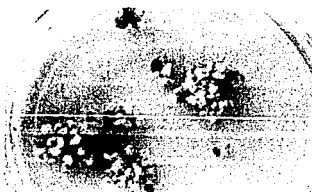
16



17

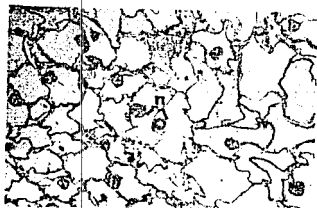


18



19

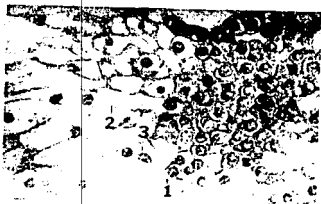
ANALISIS HISTOLOGICO  
FIGS. 20 A-L. ALGUNAS FASES OBSERVADAS DEL DESARROLLO DE EMBRIONES  
SOMATICOS FORMADOS A PARTIR DE FOLIOLOS DE INDIVIDUOS ADULTOS DE  
C. MEXICANA VAR. ROBUSTA.



A



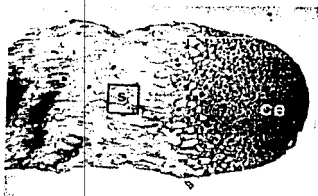
B



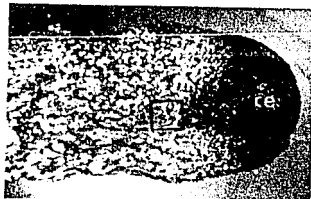
C



D



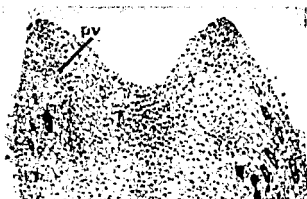
E



F



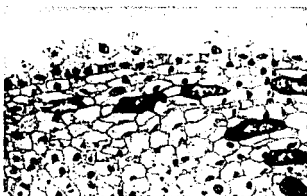
G



H



J



I



K



L



Fig. 21 A-E. DESARROLLO DEL EMBRION CIGOTICO EN CONIFERAS.  
 (ATTREE Y FOWKE, 1991)

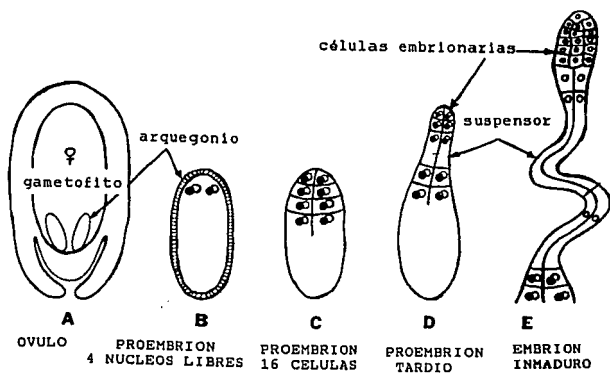
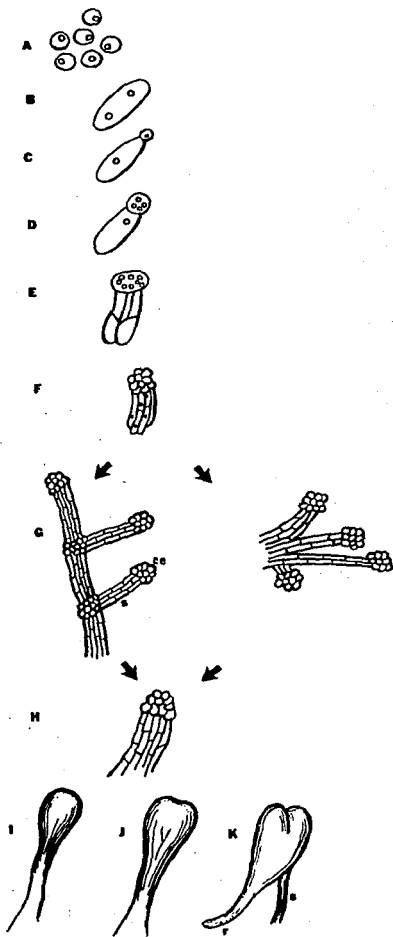
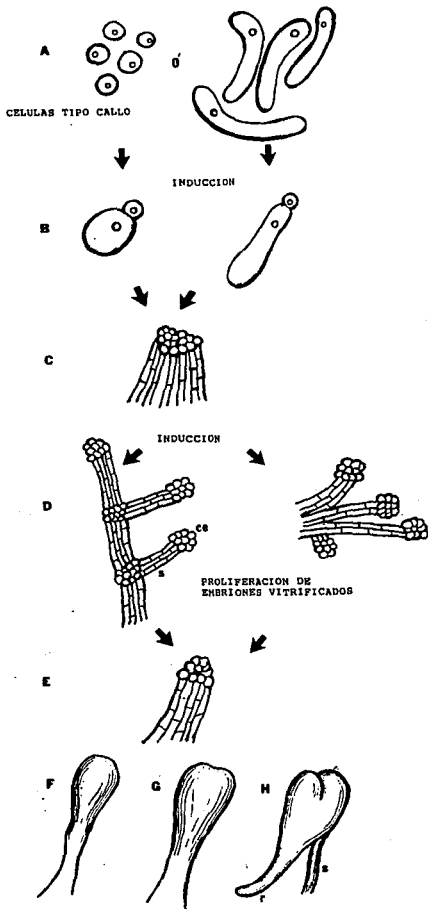


FIG. 22 A-K. POSIBLE ESQUEMA DE EMBRIOGENESIS SOMATICA A PARTIR DE CALLO DE HOJAS DE PLANTAS MADURAS DE *C. MEXICANA*. CON FASES DE NUCLEOS LIBRES.



**Figs. 23 A-H. POSIBLE ESQUEMA DE EMBRIOGENESIS SOMATICA A PARTIR DE CALLO DE HOJAS DE PLANTAS MADURAS DE *C. MEXICANA* (INTERPRETACION DE ACUERDO A LITZ, COM. PERS.)**



APENDICE

**DESCRIPCION DE Ceratozamia**

Ceratozamia Brongn. Ann. Sci. Nat. Bot., Ser. 3,5: 7-9. 1846.

**Plantas** con aspecto de palma; troncos parcialmente subterráneos o epígeos, globosos, llegando a ser cilíndricos con la edad, armados con las bases persistentes ampliamente espaciadas de las hojas y catáfilos. Hojas 1-25 o más, espiraladas en una corona apical, pinnadas, vernación circinada; folíolos imbricados cuando jóvenes, 2 en plántulas, hasta 80 o más en plantas adultas, generalmente linear lanceolados, ovado-lanceolados a obovado-oblanceolados, coriáceos, glabros, enteros, el ápice acuminado a subacuminado, la base atenuada; pecíolo y raquis ascendentes a colgantes, armados con pocas a numerosas espinas gruesas, cortas a largas. **Microstróbilos** cilíndricos a angostamente cónicos, verde pálidos cuando inmaduros cambiando a verde oscuro o moreno en dehiscencia; pedúnculo corto, tomentoso; microsporófilos cuneiformes, la porción estéril aplanada, terminada en dos cuernos, los microsporangios cubriendo densamente de  $1/2 - 3/4$  de la superficie abaxial del microsporofilo; **megastróbilos** cilíndricos, verdes cuando inmaduros, morenos en dehiscencia, más grandes y pesados que los microstróbilos; pedúnculo corto, tomentoso; megasporófilos en hileras aparentemente verticales, cuneiforme-peltados, los extremos hexagonales, engrosados, con 2 cuernos erectos divergentes. **Semillas** ovadas, variablemente anguladas, el exocarpo delgado, carnoso, moreno claro cuando inmaduro, moreno en la madurez (Vovides et al., 1983).

Ceratozamia Brongn., descrita en 1846, es uno de los 4 géneros

endémicos de América perteneciente a la familia Zamiaceae con 9 especies C. mexicana Brongn., C. kuesteriana Regel, C. norstogii Stevenson, C. robusta Miq., C. zaragozae F. Medellin, C. eurphyllidia Vázquez-Torres, Sabato y Stevenson, C. hildae G. Landry y Wilson, C. latifolia Miq., y C. migueliana H.A. Wendl. (Moretti y Sabato, 1988). Tiene una distribución dispersa pero continua a lo largo de una región no muy ancha desde Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Guatemala y Belice. Ceratozamia spp. crecen a una altitud de 150-2000 m.s.n.m. en estratos inferiores de bosque tropical, en pendientes húmedas y/o en áreas rocosas húmedas y sombreadas, especialmente en las laderas orientales de la Sierra Madre Oriental (Vovides et al., 1983), no se encuentra en la Sierra Madre Occidental, lo cual parece estar en relación a las condiciones de menor humedad en el lado occidental de México (Rzedowski, 1978). La mayor distribución de Ceratozamia va de Veracruz a Belice y puede referirse en morfología gruesa a un complejo de C. mexicana. A lo largo de esta área Ceratozamia no muestra un rango considerable de variación morfológica aún cuando las poblaciones de Chiapas, Tabasco y en Centro América están aisladas geográficamente de las de Oaxaca y centro de México. Entre los rasgos más distintivos del género está la presencia de dos estructuras en forma de astas en las esporófilas (Moretti, Sabato y Vázquez-Torres, 1979-1980). Ceratozamia mexicana es la especie tipo del género, descrita en 1846. Es una de las especies de cícadas más atractivas utilizada como ornamental, medicinal y aún como alimenticia (Vázquez

Torres, 1990). En 1983 la IUCN la catalogó como Vulnerable. Vovides et al. (1983) reconocen tres variedades: latifolia, mexicana y robusta.

Ceratogamia mexicana var. robusta (Miq.) Dyer, en Hemsley, Biol. Centr. Am. Bot. 3: 193. 1883.

**Sinonimias:** C. robusta Miq., Tijdschr. Wis-Natuurk. Wetensch. Eerste Kl. Kon. Ned. Inst. Wetensch. 1: 42. 1848.

**Tallo** algunas veces mayor a 1 m de altura, raramente ramificado, generalmente inclinado o postrado, hasta 20 cm de diámetro o más cuando maduro. **Hojas** en plantas adultas 15-20 en una corona, 1 - 2.80 m, verde oscuras y glabras. **Pecíole** 35-60 cm long. con un promedio de 50 cm, subterete, muy espinoso cerca de la base, menos espinoso hacia arriba. **Estipulas** grandes y suculentas. **Raquis** con 2 surcos en el lado superior y pocas espinas en el lado inferior. **Foliolos** 30-50 en cada lado, mas o menos opuestos, lanceolados a lineares, muy agudos, angostados en su base, 30-50 cm de largo, 2.5 - 4 cm ancho, en promedio 15 venas. **Conos masculinos** subcilíndricos, adelgazándose gradualmente hacia el ápice, unos 20 cm de largo, 7 cm de diámetro, antes de dispersar el polen se alarga 2-3 veces con un escaso incremento en diámetro; pedúnculo tomentoso. **Microsporófilas** cuneadas, 17 mm largo, 12 mm de ancho, el tallo de 2 mm de largo. **Microsporangios** cerca de 240, en soros de 3 , ocasionalmente de 4. **Conos femeninos** cilíndricos, lisos, 26-33 cm largo, 9 -11 cm de diámetro; pedúnculo de 6 cm largo, algunas veces hasta de 13 cm. **Megasporófilas** en 8-14 hileras verticales de 9-13 cada una, el

ápice peltado transversalmente hexagonal, 1-3.7 cm ancho, 0.9-1.7 cm alto. **Semillas** pubescentes cuando jóvenes, tegumento externo carnoso liso y moreno al madurar, hasta 2.6 cm de largo y 1.8 cm de diámetro. **Distribución:** México (Veracruz, Oaxaca y Chiapas), posiblemente en Guatemala. **Altitud:** 140-1300 m.s.n.m.; **Vegetación:** desde selva alta perennifolia hasta bosque caducifolio, en lugares húmedos, sombreados, generalmente en pendientes, a veces rocosas (Vovides et al., 1983; Vovides vom pers.). Estas regiones tienen un alto índice de deforestación (Toledo, 1988). **Floración:** Julio a Febrero. **Usos:** Se cultiva como ornamental; las hojas se utilizan para decorar iglesias. Las semillas pulverizadas se usan como vermífida. En la zona lacandona, Chiapas, las semillas una vez maduras y cocidas también se consumen como alimento (Vázquez Torres, 1990). **Nombres comunes:** Costilla de león, palma imperial, palmilla, piña del monte. (Vovides et al., 1983).

---

## BIBLIOGRAFIA

- AMMIRATO, P.V., 1983b. Embryogenesis, 82-123. En: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.) 1983. Macmillan, New York.
- AMMIRATO, P.V., 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. 57-81. En: C.E. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett and D.D. Biesboer (Eds.) Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss, Inc. New York.
- AMMIRATO, P.V., 1989. Recent Progress in Somatic Embryogenesis. Newsletter IAPTC No. 57:2-16.
- ANONIMO, 1988. Biodiversity: the key role of plants. Threatened Plants Newsletter No. 19:2-4.
- ATTREE, S.M., D.I. DUNSTAN and L.C. FOWKE, 1989. Plantlet Regeneration from Embryogenic Protoplasts of White Spruce (Picea glauca) Bio/Technology 7:1060-1062.
- ATTREE, S.M., D. DUNSTAN and L.C. FOWKE, 1989. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures, and improved embryo regeneration from protoplasts of White Spruce (Picea glauca). Can. J. Bot. 67:1790-1795.
- ATTREE, S.M., T.E. TAUTORUS, D.I. DUNSTAN and L.C. FOWKE, 1990. Somatic Embryo Maturation, Germination and Soil establishment of Plants of Black and White Spruce (Picea mariana and Picea glauca). Can J. Bot. 68:2583-2589.
- ATTREE, S.M. and L.C. FOWKE, 1991. Micropropagation through Somatic Embryogenesis in Conifers. 53-70. En: Y.P.S. BAJAJ (Ed.) 1991. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17 High-Tech and Micropropagation. Springer-Verlag, Berlin
- AUBOIRON, E., M.P. CARRON and N. MICHAUX-FERRERE. 1990. Influence of Atmospheric Gases, particularly Ethylene, on Somatic Embryogenesis of Hevea brasiliensis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21:31-37.
- BALL, E.A., 1987. A Tissue Culture Multiplication of Sequoia. 146-158. En: J. M. Bonga, D.J. Durzan (Eds.) 1987. Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 3. Dordrecht, Martinus Nijhoff.
- BALL, E.A., D.M. MORRIS and J.A. RYDELIUS, 1978. Cloning of Sequoia sempervirens from Mature Trees through Tissue culture. 181-226. En: In vitro Multiplication of Woody Species, Gembloux; Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat.



- BECWAR, M.R., T.L. NOLAN and J.L. WYCKOFF, 1989. Maturation, germination and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25:575-580
- BECWAR, M.R., R. NAGMANI and S.R. WANN, 1990. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. For. Res.* 20:810-817.
- BERGERSEN, F.J., G.S. KENNEDY and W. WITTMANN, 1965. Nitrogen Fixation in the Coralloid Roots of *Macrozamia communis* L. Johnson. *Aust. J. Biol. Sci.* 18: 1135-1142.
- BEVERSDORF, W.D., 1990. Micropropagation in Crop Species. 3-12. En: H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van Der Plas and J. Van Aartrijk (Eds.). 1990. Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- BONGA, J.M., 1981. Organogenesis in vitro of Tissues from Mature Conifers. *In Vitro* 17:511-518.
- BONGA, J.M., 1982. Shoot formation in Callus from the Stalks of Young Female Strobili of *Larix decidua*. *Can. J. Bot.* 60:1357-1359.
- BONGA, J.M., 1983. In vitro Propagation of Conifers. 75-83. En: L. ZSUFFA, R.M. RAUTER and C.W. YEATMAN (Eds.) 1983. Clonal Forestry; its Impact on Forest Tree Improvement and Our Future Forests. Toronto: Canadian Tree Improvement Association, Proceedings of the 19th Meeting part 2.
- BONGA, J.M., 1987. Clonal propagation of Mature Trees, Problems and Possible Solutions. 249-271. En: J.M. Bonga and D.J. Durzan (Eds.) Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 1. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht.
- BOURGKARD, F. and J.M. FAVRE, 1988. Somatic embryos from callus of *Sequoia sempervirens*. *Plant Cell Rep.* 7:445-448.
- BRAND, M.H. and R.D. LINEBERGER, 1991. The effect of leaf source and developmental stage on shoot organogenic potential of sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.) leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ culture* 24:1-7.
- BUCHHOLZ, J.T. 1920. Embryo Development and Polyembryony in Relation to the Phylogeny of Conifers. *Amer. J. Bot.* VII:125-145
- BUCHHOLZ, J.T. 1926. Origin of cleavage polyembryony in conifers. *Bot. Gaz.* 81:55-71.
- CHAMBERLAIN, C. J. 1912. Morphology of *Ceratozamia*. *Bot. Gaz.* 53:1.19.

- CHAMBERLAIN, C. J. 1957. *Gymnosperms, Structure and Evolution*. University of Chicago, Chicago.
- CHAVEZ, V.M., R.E. LITZ, and K. NORSTOG. 1992a. *In vitro* Morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 30:93-98.
- CHAVEZ, V.M., R.E. LITZ, and K. NORSTOG. 1992b. Somatic Embryogenesis and Organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 30:99-105
- CHAVEZ, V.M., R.E. LITZ, P.A. MOON and K. NORSTOG. 1992c. Somatic Embryogenesis from Leaf Callus of Mature Plants of the Gymnosperm *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer Cycadales. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28P:59-63.
- CLOUD, P. 1983. The Biosphere, *Scientific American* 249:132-144.
- COLLINS, M., 1987. International Protection of Cycads. *Fairchild Tropical Garden Bulletin* 42: 28-29.
- DAVIS S.D., S.J.M. DROOP, P. GREGERSON, L. HENSON, C.J. LEON, J.L. VILLALOBOS, H. SYNGE and J. ZANTOVSKA, 1986. Plants in Danger, what do we know?. 240-245p. IUCN. Gland and Cambridge.
- DEHGAN, B. and B. SCHUTZMAN, 1983. Effect of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and GA<sub>3</sub> on Seed Germination of *Zamia furfuracea*. *HortScience* 18: 371-372.
- DE LUCA, P., A. MORETTI and S. SABATO, 1979. Regeneration in Megagametophytes of Cycads. *Giorn. Bot. Ital.* 113:129-143.
- DE LUCA, P. and S. SABATO, 1980. Regeneration of Coralloid Roots on Cycad Megagametophytes. *Plant Sci. Lett.* 18:27-31.
- DE LUCA, P., S. SABATO, A. BALDUZZI and R. NAZZARO, 1980. Coralloid Root Regeneration on *Macrozamia* Megagametophytes. *Giorn. Bot. Ital.* 114:271-275.
- DE WALD, S.G., R.E. LITZ and G.A. MOORE, 1989. Optimizing Somatic Embryo Production in Mango. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114:712-716.
- DIXON, K. and E. BUNN, 1990. Micropropagation Research in Kings Park and Botanic Garden, Western Australia. *Botanic Gardens Micropropagation News.* 1:2-4.

- DUNSTAN, D.I., F. BEKKAQUI, M. PILON, L.C. FOWKE and S.R. ABRAMS, 1988. Effects of ABA and analogues on the maturation of White Spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Plant Sci.* 58:77-84.
- DURZAN, D.J. and P.K. GUPTA, 1987. Somatic Embryogenesis and Polyembryogenesis in Douglas fir Cell suspension cultures. *Plant Sci.* 52:229-235.
- DURZAN, D.J. and P.E. DURZAN, 1991. Future Technologies: Model-reference control Systems for the Scale-up of Embryogenesis and Polyembryogenesis in Cell suspension Cultures. 389-423. En: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (Eds.). *Micropropagation, Technology and Application.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- ECKENWALDER, J.E., 1980. Cycads: The Prime of their Lives. *Bull. Fairchild Trop. Garden* 35: 11-19.
- EHRlich, P. R. and E.O. WILSON, 1991. Biodiversity Studies: Science and Policy. *Science* 253:758-762.
- EL HASAN, A.A. and P. DEBERGH, 1987. Embryogenesis and Plantlet Development in the Bamboo *Phyllostachys viridis* (Young) McClure. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 10:73-77.
- ESAN, E. B., 1973. A Detailed Study of Adventive Embryogenesis in the Rutaceae. Ph. D. Dissertation, Univ. of Calif., Riverside.
- FASOLO, F., R.H. ZIMMERMAN and I. FORDHAM, 1989. Adventitious Shoot formation on Excised Leaves of *in vitro* Grown Shoots of Apple Cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16:75-87.
- FAY, M. and M. MAY. 1990. The *in vitro* Propagation of *Nesocodon mauritianus*. *Bot. Gdn Microprop. News* 1:6-8.
- FINER, J.J., KRIEBEL and M.R. BECWAR, 1989. Initiation of Embryogenic Callus and Suspension cultures of eastern White Pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Rep* 8:203-206.
- FULLER, D., 1985. U.S. Cactus and Succulent Business Moves Toward Propagation. *TRAFFIC (U.S.A.)* 6: 1-11.
- GAMBORG, O.L., R.A. MILLER and K. OJIMA, 1968. *Plant Cell Cultures. I. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean root cells.* *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- GARCIA, C., 1991. Inducción y Mantenimiento de Cultivos Embrionarios *in vitro* de Diferentes Variedades de Maíz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 157p.

- GEORGE, E.F. and P.D. SHERRINGTON, 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetic Limited, Great Britain.
- GILBERT, S., 1984. Cycads: Status, Trade, Exploitation and Protection 1977-1982. TRAFFIC (USA), WWF/US
- GUIDERDONI, E. and Y. DEMARLY, 1988. Histology of Somatic Embryogenesis in Cultured Leaf Segments of Sugarcane plantlets. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 14:71-88.
- GUPTA, P.K. and D.J. DURZAN, 1986. Somatic Polyembryogenesis from Callus of Mature Sugar Pine Embryos. Bio/Technology 4:643-645.
- HAKMAN, I., L.C. FOWKE, S. von ARNOLD and T. ERIKSSON, 1985. The Development of Somatic Embryos in Tissue Cultures Initiated from Immature Embryos of Picea abies (Norway Spruce). Plant Sci. 38: 53-59.
- HAKMAN, I. and S. von ARNOLD, 1985. Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis in Picea abies (Norway spruce). J. Plant Physiol. 121:149-158
- HAKMAN, I. and S. von ARNOLD, 1988. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Suspension Cultures of Picea glauca (White Spruce). Physiol. Plant. 72:579-587.
- HAKMAN, I. and L.C. FOWKE, 1987. An Embryogenic Cell Suspension Culture of Picea glauca (White Spruce). Plant Cell Rep. 6:20-22.
- HENSON, N., 1980. The Formation of Organised Elements and Callus from Cycads in Culture at Kew. Int. Rpt. Royal Bot. Gardens, Kew, Surrey, England.
- HINMAN, C.W., 1986. Potential New Crops. Sci. Amer. 255:25-29.
- HU, C. and P. WANG, 1986. Embryo Culture: Technique and Applications, 43-96. Eds: D.A. Evans, W.R. Sharp and P.V. Ammirato (Eds.) 1986. Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 4. Techniques and Applications, MacMillan Publishers, New York.
- IRIONDO J.M. y C. PEREZ, 1990. Application of in vitro culture Techniques to the Conservation of Iberian Endemic Plant Species. Bot. Gdn. Microprop. News. 1:4-6.
- JACKSON, M.B., A.J. ABBOTT, A.R. BELCHER, K.C. HALL, R. BUTLER and J. CAMERON. 1991. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aereation on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. Ann. Bot. 67:229-237.

- JAIN, S.M., R.J. NEWTON and E.J. SOLTES, 1988. Enhancement of Somatic Embryogenesis in Norway Spruce (*Picea abies* L.). *Theor. Appl. Genet.* 76:501-506.
- KAMADA, H., T. KIVOSUS and H. HARADA, 1988. New Methods for Somatic Embryo Induction and their Use for Synthetic Seed Production. In *vitro* Cell Dev. Biol. 24:71A (abstract).
- KOHLNBACH, H.W., 1978. Comparative Somatic Embryogenesis. 59-66. En: T.A. Thorpe (Ed.). *Frontiers of Plant Tissue Culture* 1978. IAPTC 1978, Calgary.
- KOMAMINE, A., M. MATSUMOTO, M. TSUKAHARA, A. FUJIWARA, R. KAWAHARA, M. ITO, J. SMITH, K. NOMURA and T. FUJIMURA, 1990. Mechanisms of Somatic Embryogenesis in Cell Cultures-Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. 307-313. En: H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van Der Plas and J. Van Aartrijk (Eds.). 1990. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- KONONOWICZ, A.K. and J. JANICK, 1984. The influence of Carbon Source on the Growth and Development of Asexual Embryos of *Theobroma cacao*. *Physiol. Plant.* 61:155-162.
- KROGSTRUP, P., E.N. ERIKSEN, J.D. MOLLER and H. ROULUND, 1988. Somatic embryogenesis in Stika Spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) *Plant Cell Rep.* 7:594-597.
- KROGSTRUP, J.V. NORGAARD and O. HAMANN, 1990. Micropropagation of Threatened Endemic and Indigenous Plant Species from the Island of Rodrigues. *Bot. Gdn. Microprop. News.* 1:8-12.
- LAKSHMI SITA, G., 1986. Sandalwood (*Santalum album* L.). 363-374. En: Y.P.S. BAJAJ (Ed.). 1986. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 1. Trees I*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- LA RUE, C.D., 1948. Regeneration in the Megagametophyte of *Zamia floridana*. *Bull. Torrey Bot. Club* 75:597-603.
- LA RUE, C.D., 1954. Studies on Growth and Regeneration in Gametophytes and Sporophytes of Gymnosperms. *Brookhaven Nat. Lab. Symp.* 6:187-208.
- LAWESSON, J. 1987. Protecting the Chinese Flora. *Threatened Plants Newsletter* No. 18:23-25.
- LAWRENCE, G.H., 1951. *Taxonomy of Vascular Plants*. Macmillan Publishing Co. Inc. New York.
- LINDEN, E., 1989. The Death of Birth. *Time* 133: 16-19.

- LITZ, R.E. and R.A. CONOVER, 1983. High frequency Somatic Embryogenesis from Carica suspension cultures. Ann. Bot. 51:683-686.
- LITZ, R.E., 1984. In Vitro Somatic Embryogenesis from Nucellar Callus of Monoembryonic Mango. HortScience 19: 715-717.
- LITZ, R.E., 1984a. In Vitro Responses of Adventitious of Two Polyembryonic Eugenia Species. HortScience 19:720-722.
- LITZ, R.E., 1984b. In vitro Somatic Embryogenesis from Nucellar Callus of Monoembryonic Mangifera indica L. HortScience 19: 715-717.
- LITZ, R.E., R.J. KNIGHT and S. GAZIT, 1984c. In vitro somatic embryogenesis from Mangifera indica L. callus. Scientia Hort. 22:233-240.
- LITZ, R.E., 1985. Somatic Embryogenesis in Tropical Fruit Trees. 179-193. En: R.R. Henke, K.W. Hughes, M.P. Constantin and A. Hollaender (Eds.) 1985. Tissue Culture in Forestry and Agriculture, Plenum, New York.
- LITZ, R.E. and B. SCHAFFER, 1987. Polyamines in Adventitious and Somatic Embryogenesis in Mango (Mangifera indica L.). J. Plant. Physiol. 128:251-258.
- LITZ, R.E., 1988. Somatic Embryogenesis from Cultured Leaf Explants of the Tropical Tree Euphoria longan Steud. J. Plant Physiol. 132:190-193.
- LITZ, R.E. and V. JAISWAL, 1991. Micropropagation of Tropical and Subtropical Fruits. 247-263. En: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (Eds.). Micropropagation; Technology and Application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- LOZOYA, S.H., 1985. Micropropagación de Especies Herbáceas. 65-79. En: M. ROBERT, y V.M. LOYOLA, (Comp.) 1985. El cultivo de Tejidos Vegetales en México. CICY y CONACYT, México.
- LU, C-Y. and T.A. THORPE, 1987. Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration in Cultured Immature Embryos of Picea glauca. J. Plant Physiol. 128:297-302.
- MacKNIGHT, J., 1988. WWF-US. Threatened Plants Newsletter No. 19:11-12.
- MARTIN, C., 1985. Cultivo de Plantas en Probeta. Mundo Científico 5(44):160-169.

- MARTINEZ-VAZQUEZ, O. and A. RUBLUO, 1989. In vitro Mass Propagation of the Near Extinct Mammillaria san-angelensis Sánchez-Mejorada. J. Hort. Sci. 64:99-105.
- MILLIKEN, T., 1987. CITES-Japan. Threatened Plants Newsletter No. 18:11-12.
- MILLIKEN, T., 1987. WWF-Japan. Threatened Plants Newsletter No. 18:18-19.
- MOHAMMED, G.H. and W.E. VIDAVER, 1988. Root Production and Plantlet Development in Tissue-Cultured Conifers. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 14:136-160.
- MONNIER, M. and K. NORSTOG, 1984. Developmental Aspects of Immature Zamia Embryos Cultured in vitro. Z. Pflanzenphysiol. 113:105-115.
- MONNIER, M. and K. NORSTOG, 1986. Effect of in ovulo Period on the Differentiation and Regulation of Immature Embryos of Zamia cultured in vitro. J. Exp. Bot. 37:1633-1642.
- MOORE, J., 1988. Horticultural Science in a Changing World. HortScience 23:799-803.
- MORETTI, A. and S. SABATO, 1988. Systematics and Evolution of Dioon and Ceratozamia. Fairchild Tropical Garden Bulletin 43: 22-28.
- MORETTI, A., S. SABATO and M. VAZQUEZ-TORRES, 1979-1980. The Distribution of Ceratozamia Brongn. (Zamiaceae). Delpinoa, nuova serie, 21-22: 13-21.
- MROGINSKI, L.A., K.K. KARTHA, and J.P. SHYLUK, 1981. Regeneration of Peanut (Arachis hypogaea) Plantlets by in vitro Culture of Immature Leaves. Can. J. Bot. 59: 826-830.
- MURASHIGE, T. 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. 15-26. En: T.A. Thorpe (Ed.) Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. IAPTC, Calgary.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-Assays with Tissue Cultures. Physiol. Plant. 15: 473-487.
- MURASHIGE, T. and T. TUCKER, 1969. Growth Factor Requirements of citrus Tissue Culture. 1155-1161. En: H.D. Chapman (Ed.). Proc. 1st. Intl Citrus Symp.. Vol 3., Univ. California, Riverside.
- NAGMANI, R. and J.M. BONGA, 1985. Embryogenesis in Subcultured Callus of Larix decidua. Can. J. For. Res. 15: 1088-1091.

- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 1975. Underexploited Tropical Plants with Promising Economic Value. National Academy of Science, Washington, D.C. 189pp.
- NORSTOG, K. and J. SMITH, 1963. Culture of Small Barley Embryos on Defined Media. *Science* 142:1655-1656.
- NORSTOG, K. 1965. Induction of Apogamy in Megagametophytes of *Zamia integrifolia*. *Amer. Jour. Bot.* 52:993-999.
- NORSTOG, K., 1967. Some Characteristics of Growth and Development in Cycad Tissue Cultures. 5th. Conf. Cycad Toxicity. Nat. Inst. Health, Bethesda IV:1-8.
- NORSTOG, K. and E. RHAMSTINE, 1967. Isolation and Culture of Haploid and Diploid Cycad Tissues. *Phytomorphology* 17:374-381.
- NORSTOG, K., 1982. Experimental Embryology of Gymnosperms. 25-51. En: B.M. Johri (Ed.). 1982. *Experimental Embryology of Vascular Plants*. Springer-Verlag, Berlin.
- NORSTOG, K., 1987. Cycads and the Origin of Insect Pollination. *American Scientist* 75: 270-279.
- OSBORNE, R. and J. VAN STADEN, 1987. *In vitro* Regeneration of *Stangeria eriopus*. *HortScience* 22:1326.
- OSBORNE, R., 1988. An Investigation into *in vitro* Culture and Phytochemical Aspects of Some Members of the Order Cycadales. Ph.D. Thesis, Department of Botany, Faculty of Science, University of Natal, Pietermaritzburg, 247p.
- OSBORNE, R. 1990. Micropropagation in Cycads. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 57:82-88.
- OSBORNE, R. 1990a. A Conservation Strategy for the South African Cycads. *South African Journal of Science* 86: 220-223.
- OSBORNE, R., P.J. ROBERTSE and M.I. CLAASSEN, 1992. The Longevity of Cycad Pollen in Storage. *S. Afr. J. Bot.* 58: 250-254.
- RAMIREZ FUENTES, M.C., 1990. Establecimiento del Cultivo *in vitro* de Orquídeas Mexicanas en Peligro de Extinción. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 64p.
- RAVEN, P. 1986. 60,000 Plants Under Threat. *Threatened Plants Newsletter* No. 16: 2-3.
- REID, W.V., 1992. Conserving Life's Diversity. *Environ. Sci. Technol.* 26:1090-1095.
- REINERT, J., 1958. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. *Naturwissenschaft.* 45:344-345



- RIETSEMA, J. S. SATINA and A.F. BLAKESLEE, 1953. The Effect of Sucrose on the Growth of Datura stramonium Embryos in vitro. Amer. J. Bot. 40:538-545.
- ROBERT, M. and V.M. LOYOLA, 1984. Plant Tissue Culture. ATAS Bulletin 1. Tissue Culture, pp. 80-81.
- ROBERT, M. y V.M. LOYOLA, (Comp.) 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México 21-26. En: M. ROBERT y V.M. LOYOLA, (Comp.) 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CICY y CONACYT, México.
- RODRIGUEZ-GARAY, B. and A. RUBLUO, 1992. In vitro morphogenetic responses of the endangered cactus Aztekium ritteri (Boedeker). Cactus and Succulent Journal (U.S.). 64:116-119.
- ROHR, R., P. von ADERKAS, and J.M. BONGA, 1989. Ultrastructural changes in Haploid Embryoids of Larix decidua during Early Embryogenesis. Amer. J. Bot. 76:1460-1467.
- ROUSTAN, J.P., A. LATCHE and J. FALLOT. 1990. Control of Carrot Somatic Embryogenesis by AgNO<sub>3</sub> an Inhibitor of Ethylene Action: Effect on Arginine Decarboxylase Activity. Plant Sci. 67: 89-95
- RUBLUO, A., V.M. CHAVEZ, and A. MARTINEZ, 1989. In vitro Seed Germination and Re-introduction of Bletia urbana (Orchidaceae) in its Natural Habitat. Lindleyana 4: 68-73.
- RUBLUO, A., V. CHAVEZ, A.P. MARTINEZ and O. MARTINEZ-VAZQUEZ, 1993. Strategies for the Recovery of Endangered Ochids and Cacti Through in vitro Culture. Biological Conservation 63:163-169.
- RZEDOWSKI, J., 1978. Vegetación de México. Limusa, México.
- SEDUE, 1991a. Las Areas Naturales Protegidas en la Conservación de las Especies. Simposio sobre Evaluación, Recuperación, Propagación y Mantenimiento de Plantas en Peligro de Extinción. Inst. Biol. UNAM, SEDUE, Red Latinoamericana de Botánica, Rancho Santa Ana Botanic Garden, CUCC.
- SEDUE, 1991b. Flora y Fauna. Aprovechamiento y Conservación. México Desconocido Año XV No. 177:107.
- SEDUE, 1991c. Acuerdo por el que se establecen los criterios ecológicos CT-CERN-001-91 que determinan las especies raras, amenazadas, en peligro de extinción o sujetas a protección especial y sus endemismos, de la flora y la fauna terrestres y acuáticas en la República Mexicana. Diario Oficial 17 de mayo de 1991.

- SHARP, W.R., M.R. SONDAHL, L.S. CALDAS and S.B. MARAFFA, 1980. The Physiology of *in vitro* Asexual Embryogenesis. 268-310. En: J. Janick (Ed.) 1980. Horticultural Reviews Vol. 2, Purdue University, Avi Publishing Co., Westport.
- SIMMONS, J.B., 1976. The Botanical Garden as a Documented Living Collection and its Role in Plant Resources Maintenance. Optima Leaflet. 18: 1-12.
- SOULÉ, M.E., 1991. Conservation: Tactics for a Constant Crisis. Science 253:744-750.
- STEWART, F.C., M.O. MAPES and K. MEARS, 1958. Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. Amer. J. Bot. 45:705-708.
- STUART, D.A., J. NELSEN, S.G. STRICKLAND and J.W. NICHOL, 1985. Factors Affecting Developmental Processes in Alfalfa Cell Culture. 58-73. En: R.R. Henke, K.W. Hughes, M.P. Constantin and A. Hollaender (Eds.). 1985. Tissue Culture in Forestry and Agriculture. Plenum Press, New York.
- THOMAS, D.S. and T. MURASHIGE, 1979. Volatil Emission of Plant Tissue Cultures. 2. Effect of the Auxin 2,4-D on Production of Volatiles in Callus Cultures. In Vitro 15: 659-663.
- THORPE, T. (Ed.), 1978. Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. Proc. 4th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture 1978. IAPTC, Calgary.
- THORPE, T.A., I.S. HARRY and P.P. KUMAR. 1991. Application of Micropropagation to Forestry. 311-336. En: P. C. Debergh and R.H. Zimmerman (Eds.). Micropropagation, Technology and Application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- TISSERAT, B. and T. MURASHIGE, 1977a. Effects of ethephon, ethylene and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on asexual embryogenesis *in vitro*. Plant Physiol. 60:437-439.
- TISSERAT, B. and T. MURASHIGE, 1977b. Probable identity of substances in Citrus that repress asexual embryogenesis. In Vitro 13:785-
- TISSERAT, B., 1985. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. 79-105. En: R.A. Dixon (Ed.) Plant Cell Culture, a Practical Research. IRL Press, Oxford.
- TOLEDO, V.M., J. CARABIAS, C. MAPES y C. TOLEDO, 1991. Ecología y Autosuficiencia Alimentaria. Siglo Veintiuno Editores. México, 118p.
- TOLEDO, V.M., 1988. La Diversidad Biológica de México. Ciencia y Desarrollo Año XIV No. 81: 17-30.

- TREMBLAY, L. and F.M. TREMBLAY, 1991. Carbohydrate requirements for the Development of Black Spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and Red Spruce (*E. rubens* Sarg.) Somatic Embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 27:95-103.
- VAZQUEZ-TORRES, M., 1990. Algunos Datos Etnobotánicos de las Cicadas en México. Memoirs of the New York Botanical Garden 57:144-147.
- VELAZQUEZ, A.M., 1988. Especies y Habitats en Peligro de Extinción. Información Científica y Tecnológica 10(147):45-49.
- VILLALOBOS, A.V., 1985. Las Bases Morfogenéticas en la Micropropagación de Especies Perennes. 55-64. EN: M. ROBERT y V.M. LOYOLA, (Comp.) 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CICY y CONACYT, México.
- VILLALOBOS, J., 1987. From the Latin American Desk. Threatened Plants Newsletter No. 18:10-11.
- von ADERKAS P. and J.M. BONGA. 1988. Formation of Haploids of *Larix decidua* Early Embryogenesis. Amer. J. Bot. 75:690-700.
- von ARNOLD, S., 1987. Improved Efficiency of Somatic Embryogenesis in Mature Embryos of *Picea abies* (L.) Karst. J. Plant Physiol. 128: 233-234.
- von ARNOLD, S. and I. HAKMAN, 1986. Effect of Sucrose on initiation of Embryogenic Callus from Mature Zygotic Embryos of *Picea abies* (L.) Karst. (Norway Spruce). J. Plant Physiol. 122:261-265.
- von ARNOLD, S. and I. HAKMAN, 1988. Regulation of Somatic Embryo Development in *Picea abies* by Abscisic Acid (ABA). J. Plant Physiol. 132:164-169.
- von ARNOLD, S. and A. WALLIN, 1988. Tissue Culture Methods for Clonal Propagation of Forest Trees. Newsletter IAPTC No. 56:2-13.
- VOVIDES, A.P. 1981. Las Cicadáceas. Notas didácticas del Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero, INIREB, Xalapa, Veracruz. No. 2:1-3
- VOVIDES, A.P., 1989. Problems of Endangered Species Conservation in Mexico: Cycads an Example. Encephalartos No. 20:29-35.
- VOVIDES, A.P., J.D. REES y M. VAZQUEZ-TORRES, 1983. Zamiaaceae. Flora de Veracruz Fascículo 26: 1-31.
- VOVIDES, A.P., y CH. M. PETERS, 1987. *Dioon edule*: la planta más antigua de México. Ciencia y Desarrollo XIII (73): 19-24.

- WANN, S.R., M.A. JOHNSON, T.L. NOLAND, and J.A. CARLSON, 1987. Biochemical Differences Between Embryogenic and Nonembryogenic Callus of Picea abies (L.) Karst. Plant Cell Rep 6:39-42.
- WEBB, D.T., M.E. RIVERA, E. STARSZAK and J. MATOS, 1983. Callus Initiation and Organized Development from Zamia pumila Embryo Explants. Ann. Bot. 51:711-717.
- WEBB, D.T. and R. OSBORNE, 1988. In vitro Regeneration of Cycads. 591-613. En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) 1988. Biotechnology in Agriculture and Forestry 2. Trees. Springer-Verlag, Berlin.
- WERNICKE, W. and R. BRETTELL, 1980. Somatic Embryogenesis from Sorghum bicolor leaves. Nature 287:138-139.
- WETHERELL, D.F., 1984. Enhanced Adventive Embryogenesis resulting from Plasmolysis of Cultured Wild Carrot Cells. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 3:221-227.
- WHITE, P.R., 1943. A Handbook of Plant Tissue Culture. New York.
- WILLIAMS, E.G. and G. MAHESWARAN, 1986. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. Ann. Bot. 57:443-462.
- WILSON, E.O., 1989. Threats to Biodiversity. Sci. Amer. 261:108-116.
- WILSON, R., 1984. Population and Natural Resources: A Statement (IUCN/IPPF). Earthwatch No. 16: 1-7.
- WITHERS, L., 1985. Cryopreservation of Cultured Plant Cells and Protoplasts. En: K.K. Kartha (Ed.). 1985. Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC. Press Inc., Boca Raton.
- WOCHOK, Z.S., 1981. The Role of Tissue Culture in Preserving Threatened and Endangered Plant Species. Biological Conservation 20: 83-89.