

109
2-j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

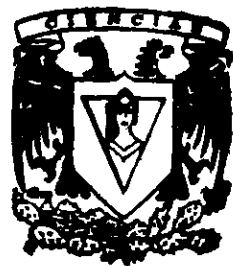
FACULTAD DE CIENCIAS, U.N.A.M.

EFFECTO DEL ACIDO ABCISICO, EN EL
DESARROLLO *in vitro* DE EMBRIONES SOMATICOS
DE Ceratozamia hildae LANDRY ET WILSON
(ZAMIACEAE).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
MARIO ALBERTO MONROY DE LA ROSA

DIRECTOR DE TESIS. DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA



MEXICO, D. F.



1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

258205



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Efecto del ácido abscísico, en el desarrollo in vitro de embriones somáticos de Ceratozamia hildae Landry et Wilson (Zamiaceae)".

realizado por Mario Alberto Monroy de la Rosa

con número de cuenta 8321838-3 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Víctor Manuel Chávez Avila

Propietario Dra. María Cristina Pérez-Amador

Propietario M. en C. Nelly Diego Pérez

Suplente M. en C. Rosa María Fonseca Juárez

Suplente M. en C. Martín Mata Rosas

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Comité Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
LABORATORIO DE CULTIVO DE
TEJIDOS VEGETALES DEL JARDÍN
BOTÁNICO DE LA U.N.A.M. BAJO LA
DIRECCIÓN DEL DR. VICTOR MANUEL
CHÁVEZ AVILA.**

Agradecimientos:

Al DR. Víctor Manuel Chávez Avila por su guía, apoyo y consejos durante el desarrollo de este trabajo.

Asimismo por la revisión del manuscrito y sus sugerencias a:

DRA. María Cristina Pérez-Amador.

M. en C. Nelly Diego Pérez.

M. en C. Rosa María Fonseca Juárez.

M. en C. Martín Mata Rosas.

Muy especialmente agradezco al M. en C. Francisco Javier Martínez Ramón por la revisión detallada del manuscrito y por sus acertadas sugerencias.

A MI MADRE POR TODO SU APOYO, COMPRENSIÓN Y CARIÑO, POR TODAS SUS ENSEÑANZAS, QUE ME HAN LLEVADO EN GRAN PARTE A SER LO QUE SOY.

A ELIZABETH MORENO GUTIÉRREZ, COMPAÑERA DE VARIOS AÑOS Y RESPONSABLE EN GRAN MEDIDA DE LOS POCOS LOGROS QUE HE TENIDO, DE TODAS MIS ACCIONES Y ALGUNAS FRUSTRACIONES, DE MIS ESPERANZAS Y DESESPERANZAS, CON LA ILUSIÓN DE QUE EN ALGÚN MOMENTO DE NUESTRAS VIDAS NUESTROS CAMINOS SE VUELVAN A ENCONTRAR.

A MI PADRE, HERMANOS, SOBRINOS Y CUÑADOS.

A VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ AVILA PADRE PUTATIVO Y A TODOS MIS
COMPAÑEROS DEL LABORATORIO, POR BRINDARME SU AMISTAD.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
I. INTRODUCCIÓN	4
II. ANTECEDENTES	6
Registro fósil	7
Morfología de cicadas.	7
Estructuras reproductivas	8
Distribución geográfica de las cicadas	10
La familia Zamiaceae	11
<i>Ceratozamia hildae</i>	12
Precios, Saqueo y Destrucción	14
Usos	16
Cultivo tradicional	16
CULTIVO DE TEJIDOS	17
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	18
HIPERHIDRATACION DE CULTIVOS	22
ÁCIDO ABCSÍICO (ABA)	23
OXIDACIÓN DE TEJIDOS Y ÓRGANOS	24
III. OBJETIVOS	25
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	25
V. RESULTADOS	30
VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	44
VII. BIBLIOGRAFÍA	48

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ANOVA	Análisis de varianza
B5	Medio de cultivo Gamborg <i>et al.</i> , 1968
Ch	<i>Ceratozamia hildae</i>
CE	"Callo" embriogénico, masa de embriones y suspensores
CTES	Convención Internacional para el tráfico de especies amenazadas
DE	Desviación estándar
EC	Embriones cotiledonares
EG	Embriones en germinación
EP	Embriones precotiledonares
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962
SEMARNAP	Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca
TREC	Tropical Research and Education Center
U.F.	Universidad de Florida
2, 4-D	Ácido 2, 4-Diclorofenoxiacético

RESUMEN

Efecto del ácido abscísico, en el desarrollo *in vitro* de embriones somáticos de *Ceratozamia hildae* Landry et Wilson (Zamiaceae).

Con base en observaciones hechas en esta investigación se pudo establecer la separación de cuatro diferentes etapas de desarrollo en los cultivos embriogénicos *in vitro* de *Ceratozamia hildae*: a) "callo" embriogénico; b) **embriones precotiledonares**, en los cuales se pudo reconocer el inicio del desarrollo del brote y su cotiledón o cotiledones; c) **embriones cotiledonares**, los cuales tuvieron como característica distintiva, que un alto porcentaje (90 %) de ellos desarrolló un solo cotiledón; d) **embriones en germinación**, la presencia de raíz y el brote cubierto por brácteas, que se presentaron glabras o pubescentes fueron sus características distintivas. En estas cuatro fases se exploró el efecto del ABA como promotor de su maduración, teniendo los mejores resultados en los embriones en la primera fase de desarrollo ("callo" embriogénico), los cuales crecieron hasta llegar a una etapa posterior (embriones precotiledonares), en una concentración de ABA 30 μ M, cultivados en medio Litz durante 45 días de tratamiento. El análisis estadístico realizado (ANOVA) apoya lo anterior, separa estadísticamente este tratamiento de los otros con un nivel de significancia del 0.05 %, se ha visto que el ABA tiene un efecto diferencial con base principalmente en el tiempo de exposición y la edad del explante, por lo que estos factores son atribuidos para la respuesta obtenida en la presente investigación.

INTRODUCCIÓN

"In early 1960, Luciano E. Guerra, a commercial plant collector from Mission, Texas imported one of the most unusual American cycads. Guerra had been an avid cycad collector for many years and immediately recognized that this species of *Ceratozamia* (Cycadaceae) was unlike any he had seen before. This cycad is unquestionably new to science and has remained undescribed since its first introduction eighteen years ago." (Landry and Wilson, 1979).

Este es el inicio del artículo en donde se describe por primera vez a *Ceratozamia hildae*, este párrafo es muy significativo, podemos ver hasta dónde llega el saqueo de especies que existe en nuestro país, así como el gran desconocimiento de la biodiversidad de México y la poca protección que se le ha brindado.

La descripción de esta especie se hizo con plantas colectadas (saqueadas) al N de Xitilla, San Luis Potosí, México, así mismo ocurrió con los holotipos e isotipos.

De la fecha en que fue "descubierta" (1960) a la que fue descrita por los científicos, transcurrieron 19 años, en los que en México no se tuvo conocimiento de ella, en 1980 se publicaron otros datos anatómicos y se dice que el horticultor Antonio Martínez de S.L.P. sabía de su existencia (Vovides y Rees, 1980).

Catorce años después de la descripción de *C. hildae* y cuatro de arduo esfuerzo e investigación en cultivo de tejidos, salió a la luz un trabajo donde se exploró la morfogénesis *in vitro* de los megagametofitos y embriones cigóticos (Chávez *et al.*, 1992a), los estudios con esta especie pasaron de la biología descriptiva a la experimental. Esta investigación marcó el inicio de un trabajo coordinado y fructífero que mantienen la UNAM y la Universidad de Florida (UF) en el que participan el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico y el Plant Cell and Tissue Culture Laboratory, del Tropical Research and Education Center, Homestead, Florida.

Sus investigaciones en 1992 (Chávez *et al.*, 1992 a; b y c) sobre la inducción de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos (2n) y de megagametofitos (n) (con *Ceratozamia hildae*, *C. mexicana*, *Zamia pumila*, *Z. fischeri*, *Z. furfuracea*) aparecieron después de casi 10 años en que la literatura sobre el tema no presentaba ningún reporte en las cicadas (Webb, 1982).

Hasta entonces, las publicaciones sobre inducción de embriones somáticos en cícadas, coníferas y en general en gimnospermas habían tenido su punto de partida en el cultivo de estructuras ligadas a la semilla y no obstante que existe un gran interés científico y tecnológico por lograr embriones a partir de tejidos somáticos y más aún de plantas maduras como se practica en angiospermas desde 1958 (Steward *et al.*, 1958; Reinert, 1958) estos resultados no se habían equiparado para las gimnospermas. Hasta que en 1992 este equipo de investigación UNAM-U. F. publicó sus resultados sobre embriones somáticos y su germinación *in vitro* obtenidos a partir del cultivo de hojas (foliolos) de la cícada mexicana *Ceratozamia mexicana* (Chávez *et al.*, 1992b) este artículo es considerado el primer reporte en el mundo sobre la obtención de embriones a partir de tejidos somáticos de individuos maduros dentro del grupo de las gimnospermas. La importancia de este estudio radica en que confirma la totipotencialidad de las células de tejidos vegetativos en gimnospermas adultas, demuestra para este grupo vegetal la factibilidad de las grandes promesas biotecnológicas sobre fitomejoramiento y producción ilimitada. Sin embargo particularmente para México y en forma inmediata se tiene en nuestra Universidad (UNAM), la metodología para estudiar, propagar y conservar, a ésta y a otras especies mexicanas de cícadas en peligro de extinción. Posteriores a este estudio, sólo existen, hasta ahora, otros dos trabajos en el mundo que han tenido resultados similares, los cuales son producto del mismo grupo de investigación y también con especies mexicanas de cícadas *Ceratozamia hildae* (Litz *et al.*, 1995) y *Ceratozamia eurphyllidia* (Chávez *et al.*, sometido a revisión).

Hace 50 años La Rue (1948) inició como pionero los múltiples esfuerzos dentro de la ciencia para tratar de establecer un método efectivo de regeneración y propagación *in vitro*, así también, uno de sus estudiantes el Dr. Knut Norstog vendría a realizar posteriormente un avance significativo al lograr por vez primera la inducción de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos de cícadas. A lo largo de los años las investigaciones se han orientado a tratar de resolver entre otros factores: la falta de respuesta morfogénica de los explantes y limitada fuente de explantes morfogénicos (sólo con embriones y megagametofitos se había tenido éxito). Si bien ha parecido lejano y hasta ahora no existe reporte alguno sobre el establecimiento en invernadero de cícadas regeneradas *in vitro*, las investigaciones de la UNAM-U. F. indica que ya lo han logrado (resultados personales no incluidos y comunicación personal con el Dr. R. E. Litz), la consolidación de esta posibilidad es una urgente necesidad para aquellas especies de cícadas como *C. hildae* que se encuentran en peligro de extinción, sin embargo este procedimiento puede sufrir serias limitaciones y antes de concretarlo se deberán resolver algunos problemas:

limitaciones como la hiperhidratación, oxidación, control de la poliembriogénesis, factores todos ellos que se encuentran ligados en mayor o menor medida a distintas etapas de los embriones por lo que una clara caracterización de éstas en sus aspectos morfológicos y sus respuestas al cultivo *in vitro* son fundamentales para aspirar al control del desarrollo de tejidos morfogenéticos, a la conservación y efectiva propagación de *C. hildae* y la conservación de este grupo de organismos pancrónicos.

ANTECEDENTES

La división Cycadophyta presenta dos órdenes, Bennettitales y Cycadales, este último es el único que cuenta con representantes vivos en nuestros días (tabla 1).

Tabla 1.- Clasificación taxonómica de las cicadas actuales de acuerdo a Stevenson *et al.*, 1990; Osborne, 1995.

división	clase	orden	suborden	familias	géneros
Cycadophyta	Cycadopsida	Cycadales	Stangerinae	Stangeriaceae	<i>Stangeria</i> <i>Bowenia</i>
			Cycadinae	Cycadaceae Zamiaceae	<i>Cycas</i> <i>Lepidozamia</i> <i>Macrozamia</i> <i>Encephalartos</i> <i>Dioon</i> <i>Microcycas</i> <i>Ceratozamia</i> <i>Zamia</i> <i>Chigua</i>

limitaciones como la hiperhidratación, oxidación, control de la poliembriogénesis, factores todos ellos que se encuentran ligados en mayor o menor medida a distintas etapas de los embriones por lo que una clara caracterización de éstas en sus aspectos morfológicos y sus respuestas al cultivo *in vitro* son fundamentales para aspirar al control del desarrollo de tejidos morfogenéticos, a la conservación y efectiva propagación de *C. hildae* y la conservación de este grupo de organismos pancrónicos.

ANTECEDENTES

La división Cycadophyta presenta dos órdenes, Bennettitales y Cycadales, este último es el único que cuenta con representantes vivos en nuestros días (tabla 1).

Tabla 1.- Clasificación taxonómica de las cícadas actuales de acuerdo a Stevenson *et al.*, 1990; Osborne, 1995.

división	clase	orden	suborden	familias	géneros
Cycadophyta	Cycadopsida	Cycadales	Stangerinae	Stangeriaceae	<i>Stangeria</i> <i>Bowenia</i>
			Cycadinae	Cycadaceae Zamiaceae	<i>Cycas</i> <i>Lepidozamia</i> <i>Macrozamia</i> <i>Encephalartos</i> <i>Dioon</i> <i>Microcycas</i> <i>Ceratozamia</i> <i>Zamia</i> <i>Chigua</i>

Registro fósil

Se han encontrado fósiles del Triásico con características estructurales semejantes a las de las cícadas actuales por lo que se cree que la evolución de las cícadales tuvo su esplendor antes del fin del Paleozoico, los más completos y bien preservados restos de las cícadales proceden del Triásico Superior y del Jurásico, hojas de las cícadas son abundantes en el Mesozoico por lo que se le ha conocido como la edad de las cicadofitas las cuales se cree que ya existían en el Pérmico con un posible ancestro en el Carbonífero Superior (Stewart y Rothwell, 1993).

Los primeros registros fósiles que se conocen de las Cycadales son las frondas fértiles de *Luxistrobis* (primer registro del grupo Pensilvánico), *Spermopteris* (fase ovulada de la hoja nombrada *Taeniopteris* y que fue común en las rocas del Paleozoico Superior), *Phasmatoxycas* (fronda *Taeniopteris*doide, Pérmico Inferior) y *Archaeoxycas* (hoja fértil entera, Pérmico Inferior) (Stewart y Rothwell, 1993).

Morfología de cícadas.

En las cícadas el tallo varía desde muy corto y bulboso (*Bowenia*, *Stangeria* y *Zamia*) hasta alto y columniforme (*Macrozamia*, *Ceratozamia* y *Dioon*), se ha sugerido que el tallo grueso de las cícadas es una característica derivada, que las cícadas primitivas presentaban un tallo delgado como el de *Leptoxycas* (Stewart y Rothwell, 1993). En las cícadas actuales las frondas son grandes y pinnadas (sólo en *Bowenia* son doblemente pinnadas) dispuestas en forma helicoidal en el ápice del tallo, con nervaciones dicotómicas aunque a primera vista parecen ser paralelas (Scagel *et al.*, 1984), al morir las hojas, se separan del tallo por una capa de abscisión dejando cubierto el tronco por sus bases foliares lo cual ha servido para tratar de estimar la edad de las plantas, por ejemplo se han estimado ejemplares de hasta 2 500 años de edad de *Dioon edule* (Scagel *et al.*, 1984; Vovides, 1987), el número de estos rastros varía según la especie aunque siempre presentan una disposición ceñida.

Tanto la médula como el córtex contienen canales mucilaginosos, la raíz primaria es grande, especialmente en la plántula, las raíces al alcanzar la superficie del suelo (geotropismo negativo) desarrollan nódulos que contienen cianobacterias endosimbióticas (*Anabaena*, *Nostoc*), estas cianobacterias se encuentran en los espacios intercelulares del córtex (Scagel *et al.*, 1984).

Estructuras reproductivas

Todas las cícadas presentan sexos separados (díocicas), presentan estróbilos o conos, en *Cycas* las semillas son producidas en estróbilos en donde la esporófila presenta una estructura muy parecida a la hoja. Los conos unisexuales se producen en el ápice del tallo, sólo en 2 géneros son laterales y axilares a las hojas, tradicionalmente los conos de las cícadas se han interpretado como una serie evolutiva partiendo del tipo primitivo ejemplificado por *Cycas* y finalizando con el más evolucionado de *Zamia*, sin embargo interpretaciones de los géneros forma *Crossozamia* (*Phasmatozycas*) sugieren que el cono "primitivo" en *Cycas* puede ser una característica derivada (Stewart y Rothwell, 1993).

Los ginostrobilos son claramente de mayor tamaño que los androstróbilos, *Macrozamia denisonii* produce ginostrobilos de más de 70 cm de largo y más de 30 kg de peso (Scagel *et al.*, 1984), así mismo, en *Dioon spinulosum* los ginostrobilos alcanzan hasta 40 cm de largo y 25 kg de peso.

Los androstróbilos están formados por muchos androsporófilos que a su vez contienen androsporangios (28 en *Zamia* a más de 1000 en *Cycas*) con un desarrollo eusporangiado (Scagel *et al.*, 1984).

Los granos de polen de la mayoría de las especies son esféricos o elípticos con una sola abertura en la superficie, sus gametos presentan una banda espiral de undulipodios lo que los relaciona con las criptógamas, su diámetro se aproxima a 1/3 de mm por lo que es el espermatozoide vegetal más grande que se conoce (Scagel *et al.*, 1984), en *Cycas revoluta* sobrepasa los 210 μm (Stewart y Rothwell, 1993).

Los óvulos son sésiles (de 6 cm en *Cycas* y *Macrozamia* y de 5 mm en *Zamia pygmaea*), las ginosporas siguen fases muy parecidas a las de una planta productora de esporas libres como *Selaginella*, el arquegonio maduro consta de dos células del cuello (todas las cycadales las presentan), un núcleo del canal ventral y un núcleo ovular, después de la fecundación el cigoto sufre divisiones produciendo hasta más de 1000 núcleos libres, en algunos géneros como *Cycas* éstos son rodeados por membranas, en *Dioon* aunque se forman paredes éstas se desintegran exceptuando las del extremo calácico del embrión, en *Zamia* sólo se forman membranas en los núcleos del extremo calácico, las células del extremo calazal forman el proembrión y las del micropilar aportan la reserva nutritiva (Scagel *et al.*, 1984).

El embrión se diferencia en 3 zonas (casquete pro-embrión, suspensor, haustorio), el suspensor se alarga hasta más de 7 cm en *Ceratozamia*, el casquete pro-embrión consta de dos

cotiledones (Stewart y Rothwell, 1993), aunque la mayoría de las cicadofitas presentan poliembriónia sólo un embrión llega a madurar (Scagel *et al.*, 1984).

Al llegar la germinación, los cotiledones se alargan, la radícula emerge por el micrópilo, después de establecerse el sistema radicular primario las hojas emergen, los cotiledones sin embargo se mantienen unidos al megagametofito absorbiendo nutrientes para el brote en desarrollo, aún cuando el gametofito femenino se haya secado, mantienen su posición en la semilla y conexión con la plántula por dos años aproximadamente (Scagel *et al.*, 1984; Stewart y Rothwell, 1993).

Las semillas de las cicadas modernas presentan similitudes con las semillas de las Pteridospermas o helechos con semilla, de las cuales se admite que evolucionaron los dos órdenes: las Bennettitales y las Cycadales.

Distribución geográfica de las cícadas

Las cícadas constituyen uno de los grupos más reducidos e interesantes de plantas vasculares actuales, consideradas como las espermatofitas más primitivas por lo que se les ha llamado "organismos pancrónicos". cuentan con 11 géneros distribuidos en tres familias (Stevenson *et al.*, 1990, Johnson y Wilson, 1990), los cuales se restringen a regiones relativamente limitadas de los trópicos y subtropicos (tablas 1 y 2), lo que parece indicar que están siguiendo un proceso de extinción, en mayor medida *Microcycas*, *Encephalartos* y algunas especies de *Macrozamia* (Scagel *et al.*, 1984).

La distribución actual de las cícadas es una reminiscencia de su distribución mayor durante el Mesozoico y el Cenozoico Inferior (Stewart y Rothwell, 1993).

Tabla 2.- Lista de géneros de cícadas actuales

Genero	Autor	Especies	Distribución
<i>Bowenia</i>	Hook. f.	2	Australia
<i>Ceratozamia</i>	Brongn.	12	México, Guatemala, Belice
<i>Chigua</i>	Brongn	2	Colombia
<i>Cycas</i>	L.	46	Australia, India, China, Japón, Madagascar y E. África
<i>Dioon</i>	Lindley	12	México, Honduras, Nicaragua
<i>Encephalartos</i>	Lehmann	58	África
<i>Lepidozamia</i>	Regel	2	Australia
<i>Macrozamia</i>	Miquel	22	Australia
<i>Microcycas</i>	(Miq.) A. DC.	1	Cuba
<i>Stangeria</i>	T. Moore	1	Sud África
<i>Zamia</i>	L.	44	Neotrópicos (América)

Tomado de Stevenson *et al.*, 1990 y modificado con datos de Osborne, 1995.

Los principales centros de endemismo para las cícadas están localizados en Australia, México y Sud África, en México existen tres géneros y es el país con el mayor número de especies de cícadas, cuenta con alrededor de 35 de un total mundial de aproximadamente 200. *Dioon* y *Ceratozamia* están confinadas casi enteramente a México, donde *Zamia* también es abundante (Vovides, 1989; Stevenson *et al.*, 1990; Osborne, 1995).

La familia Zamiaceae.

Johnson (1959, citado por Vovides, 1983), dividió a las Cycadaceae en 3 familias: Cycadaceae, Stangeriaceae y Zamiaceae, esta última cuenta con los cinco géneros americanos: *Ceratozamia*, *Chigua*, *Dioon*, *Microcycas* y *Zamia*.

Zamiaceae tiene aproximadamente 148 especies en el mundo distribuidas en zonas tropicales y subtropicales, se encuentran generalmente en poblaciones aisladas, aunque algunas veces forman densas colonias locales, sus miembros se consideran en peligro de extinción principalmente por la destrucción de su hábitat y la colecta excesiva e ilegal para su comercio como plantas ornamentales (Vovides, 1983).

Los individuos de la familia Zamiaceae son plantas perennes, dioicas, en forma de palma, tronco aéreo o subterráneo, generalmente erecto columnar sin ramificaciones aunque existen algunos ejemplares con ramificaciones dicotómicas, hojas escasas a numerosas, pinnadamente compuestas, dispuestas en espiral sobre el tallo en una corona, persistentes, rectas, dobladas o circinadas en la yema, folíolos pocos hasta más de 50 (Vovides, 1983).

Semillas globosas a ovoides, grandes, a menudo variablemente anguladas por compresión, la testa presenta dos capas una externa carnosa llamada sarcotesta, roja, anaranjada o café oscura, rodeando la capa interior (esclerotesta) delgado y endurecido (Vovides, 1983).

Uno de los géneros más característico, altamente valorado como ornamental y en gran medida por ello amenazado es *Ceratozamia* que por su crítica situación, se ha incluido en el apéndice I de CITES, el más restrictivo en cuanto al manejo de las especies incluidas en él.

Ceratozamia se distribuye desde México hasta Guatemala, en México especialmente en las laderas orientales de la sierra madre oriental (Vovides, 1983).

Ceratozamia hildae

Ceratozamia hildae de acuerdo con Vovides y Rees (1980) es una cicada endémica de México que crece en los bosques de *Quercus* hacia la zona montañosa de la Huasteca Potosina entre los 850 y 900 msnm en terrenos empinados, calizos de arcilla negra, cohabitando con *Dioon edule* y *Zamia fischeri*.

Es una planta perenne, no ramificada, con tallo globoso de 8-20 cm de largo por 5-9 cm de ancho, casi totalmente subterráneo, cubierto por bases foliares alternando con brácteas tomentosas. Presenta 2-6 hojas perennes, de 8-180 cm de longitud, a lo largo del raquis se encuentran dos ranuras laterales en la parte adaxial, el peciolo y raquis son escasamente espinosos y ligeramente pubescentes, 30 o más folíolos, sésiles, en fascículos de 3 a 4 folíolos, alternos, lámina lanceolada de 9-15 cm de largo por 1-3 cm de ancho (Vovides y Rees, 1980).

Los conos son solitarios y pedunculados, los masculinos cilíndricos de 9-15 cm de largo por 0.9-1.4 cm de diámetro, presenta 38-80 esporangios por microesporófilo de la zona media, los conos femeninos hasta de 4 cm de largo por 3-4 cm de diámetro, los macrosporófilos presentan 2 cuernos separados por 0.8-1 cm. Las semillas son redondas de 1.2 cm de diámetro, el número cromosómico es: $2n = 16$ (Vovides y Rees, 1980).

Esta especie difiere notablemente de las especies cercanas del género en su consistente agrupamiento de los folíolos en el raquis y la textura papirácea de éstos, por lo que se le conoce entre los horticultores de Estados Unidos como "Bamboo cycad" (Landry y Wilson, 1979), "pata de gallo" en México figura 1 (Vovides com. pers.).



Figura 1.- Hoja de *Ceratozamia hildae*, se observan los folíolos sésiles agrupados en fascículos, los folíolos distribuidos de manera alterna a lo largo del raquis el cual muestra escasas espinas.

Precios, Saqueo y Destrucción.

A pesar de que todo el Orden Cycadales esta protegido por CITES (1995) y en nuestro país por la SEMARNAP, el saqueo es constante y sin discriminación.

Los costos varían según la especie, talla, lugar de venta y presentación. En el mercado Madreselva de Nativitas en Xochimilco (ciudad de México) en el mes de julio de 1996 se encontró *Cycas revoluta* que se vendían como bonsai en \$ 140.00, la misma especie con un tamaño mayor se vendía entre \$ 500.00 y \$ 1,200.00, un ejemplar de *Zamia sp.* tenía un valor de \$ 600.00, individuos de *Dioon sp.* tenían un costo de \$ 2,500.00, todas las plantas exceptuando la que presentaban como bonsai, tenían una altura de 1 a 2.5 m, lo que permite suponer que son plantas adultas y difícilmente propagadas por los comerciantes. Estos costos, aunque parecen altos para México, no son comparables con los que se pagan en otros países por cicadas que son sustraídas furtivamente de México y es posible que los colectores ilegales no paguen más de un jornal (7 a 30 pesos) a los peones que utilizan para colectarlas.

Las cicadas que provienen del campo, aún teniendo raíces y haberlas sacado sin daños, llegan a tener muchos problemas de aclimatación *ex situ*, por lo que la sobrevivencia de las plantas extraídas de su hábitat puede ser muy baja (Vovides, 1995).

La colecta ilegal de plantas en nuestro país no sólo abastece el mercado interno, también es fuente de material para el mercado externo, prueba de ello es la información en la tabla 3, en la que aparecen, además de las cicadas, otras familias, los datos que se presentan son los que se han detectado o los que se han dado a conocer, pero en la realidad éstos deben ser más numerosos.

Tabla 3.- Algunos datos conocidos de exportaciones ilegales de plantas desde México (Tomado de Chávez, 1993).

Año	Cantidad	Referencia
1977 a 1982	ca. 130.000	Vovides, 1989
1978	1.000.000 Orquideas, Cactáceas, Cicadas	"
1979	6,503	"
1980	12,391	"
1980	30.000 cada mes	Gilbert, 1984
1981	30.000 cada mes	Tang, 1985
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 más 10 ton de semillas	Sánchez-Mejorada (com. pers.)
1985 a 1986	10,000 Orquideas, Cactáceas, Agaves, Cicadas	
---	22,000	Vovides, 1989
1989 a 1991	Decomisados 640,000 individuos; Zamiáceas, Cactáceas, Agaváceas, Orquideas, Liliáceas, Bromeliáceas	SEDUE, 1991

Entre otros factores que afectan a las poblaciones naturales de estas plantas se encuentra la destrucción de sus hábitats, principalmente por talas para cultivar los suelos "ganados" a la selva. Asimismo, ocurre la destrucción deliberada de plantas por ser tóxicas, se sabe que cuando se ingieren provocan entre otros daños, parálisis y posteriormente la muerte, al menos una especie Australiana fue casi exterminada con arsénico para impedir que el ganado vacuno las comiera (Scagel *et al.*, 1984).

Usos

Por su follaje, las cicadas parecen palmas o helechos arborescentes, son muy cotizadas como plantas de ornato. *Cycas revoluta* es vendida en Estados Unidos con el nombre de palmera de pascua "Easter palm" (Scagel *et al.*, 1984), aquí en México las ceratozámias y zamias están entre las más apreciadas como ornamentales (Vázquez-Torres, 1990).

En algunos estados de la República Mexicana (Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca y Chiapas) se llegan a comer las semillas cocidas de varias especies de *Dioon*, *Ceratozamia* y *Zamia* (Vázquez-Torres, 1990). El almidón extraído y cocinado de la médula y del córtex del tallo de *Zamia pumila* se emplea como alimento (Sago) en algunos lugares de E. U. como Florida (Scagel *et al.*, 1984; Vázquez-Torres, 1990). En Asia se extrae látex de *Cycas* para su uso (Scagel *et al.*, 1984). Asimismo en nuestro país son utilizadas *Zamia*, *Dioon* y *Ceratozamia* como remedios contra mordeduras de serpientes, antineurálgicos y vermífugos (Chávez, 1993).

Cultivo tradicional.

Las cicadas se pueden propagar naturalmente por yemas situadas en el tallo, se ha observado que cuando los tallos sufren alguna herida se puede inducir el desarrollo de yemas, los horticultores aprovechan esta capacidad como método para tratar de lograr su propagación la cual resulta lenta y azarosa (Scagel *et al.*, 1984).

También se propagan por semillas, y aunque la mayoría es con semillas de procedencia silvestre, hay algunas experiencias que cabe mencionar, como es el caso del Dr. Andrés Vovides en México (Jardín Botánico "Francisco Javier Clavijero", Xalapa Veracruz), quien asesora a campesinos de la zona de Bosque Oscuro (Veracruz) para la propagación de *Dioon edule*, parte de la producción está destinada a la reintroducción a su hábitat, esto promueve que los campesinos protejan las poblaciones naturales contra saqueos y deforestación a la vez que cuentan con una fuente de ingresos con mayores ganancias que las obtenidas por sus cultivos de cítricos (Vovides com. pers.; Vovides, 1995).

CULTIVO DE TEJIDOS.

Como alternativa a la propagación sexual y asexual "convencionales", se han implementado técnicas *in vitro*, para el cultivo de tejidos, que además de proporcionar una cantidad de regenerantes mucho mayor en un tiempo menor, tiene ventajas adicionales como la obtención de plantas libres de patógenos, haploides e incluso poliploides, plantas transgénicas, clonales, etc.

Estas técnicas han dado excelentes resultados en múltiples especies y con distintos objetivos. *Coffea spp.* ha sido propagada por embriogénesis somática a partir de hojas (van Boxtel y Berthouly, 1996; Berthouly y Michaux-Ferriere, 1996), plantas ornamentales como las rosas, claveles, crisantemos, orquídeas se propagan habitualmente por organogénesis o embriogénesis, plantas transgénicas mediante la utilización de *Agrobacterium tumefaciens* se obtuvieron en clavel (Hsia y Korban, 1996; van Altvorst *et al.*, 1996), especies leñosas útiles en la industria del papel como son diversas especies de *Eucalyptus* también se han propagado vía embriogénesis somática (Termignoni *et al.*, 1996), los alcances son tales, que se propagan sin mayor problema especies como *Dryopteris affinis* una pteridophyta mediterránea (Fernández *et al.*, 1996), las especies a las cuales por obvias razones se les ha prestado mucha atención son las comestibles, mención especial merecen las gramíneas, cucurbitáceas y la zanahoria (*Daucus carota*), las primeras por ser la base alimenticia de miles de millones de personas y por la cantidad de artículos publicados y la tercera por ser un modelo muy utilizado, cualquier área y cualquier ensayo que se ocurra puede ser encontrado que ya se aplicó con estas especies, un ejemplo es la embriogénesis somática. Otros cultivos comestibles en que se utiliza la embriogénesis son por ejemplo ajo, espinaca, papa y soya (Chee, 1992; Ladyman y Girard, 1992; Nickle y Yeung, 1993; Whune y Young, 1996; Komai *et al.*, 1996; Říhová y Tupý, 1996; Li y Grabau, 1996). Muchos ensayos se realizan e intentan y la transformación genética no es la excepción, un cultivo básico como lo es el frijol se transformó con el bombardeo de partículas de oro recubiertas con plásmidos (Whune y Minamikawa, 1996), la fruticultura también ha incursionado en las técnicas *in vitro*, *Phoenix dactylifera* se propaga por embriogénesis somática, en esta área (fruticultura) la transformación también se desarrolla; con partículas de tungsteno cubiertas con plásmidos se han bombardeado células embriogénicas de *Citrus spp.* (Yao *et al.*, 1996; Veramendi y Navarro, 1996). Las técnicas *in vitro* han tenido una gran aplicación en las especies en peligro de extinción, polen de *Ginkgo biloba* fue sembrado en condiciones asépticas y se logró la formación de células espermáticas inmaduras y la proliferación de callo, utilizando embriones cigóticos inmaduros se logró la embriogénesis somática de esta especie (Tulecke, 1957; Laurain *et al.*, 1996). Familias consideradas endémicas

del Continente Americano y que en nuestro país tuvieron su origen y/o radiación adaptativa además de tener gran importancia cultural y económica como las Agavaceae y Cactaceae no pueden ni deben dejarse de lado y mucho menos por investigadores connacionales. Una especie considerada en peligro de extinción *Agave victoria-reginae*, además de ser muy hermosa y tener gran potencial ornamental, se ha propagado via embriogénesis somática a partir de hojas jóvenes (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996). *Lophophora williamsii* especie envuelta en un halo de misticismo también se micropropaga, utilizando areolas se induce la formación de brotes (Ortiz-Montiel y Alcántara, 1997).

Como se puede ver la regeneración de nuevos individuos por medio del cultivo de tejidos puede ocurrir por dos vías: organogénesis y embriogénesis somática, en la primera con la formación de primordios de órganos como las raíces y brotes, es posible llegar a obtener nuevos individuos completos, mientras que en la embriogénesis se desarrollan embriones adventicios, estructuras bipolares, anatómica y morfológicamente semejantes a embriones cigóticos que lo único que tienen que cumplir para desarrollar un nuevo individuo es la germinación, es por esta valiosa razón que muchos estudios están abocados a la obtención de embriogénesis somática.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

Se considera que los estudios de embriogénesis somática se han realizado formalmente desde hace 40 años, cuando Steward *et al.* (1958) y Reinert (1958) (citados por Ammirato, 1989), lograron generar *in vitro* embriones somáticos de zanahoria, con lo que se abrió un campo enorme para el cultivo de tejidos vegetales. Chávez (1993) señala que La Rue en 1948 y 1954 describió una estructura que desarrolló un brote y raíces en la parte inferior y la encontró semejante a las plántulas de *Zamia* obtenidas a partir de semillas. Los resultados de La Rue revelaron el desarrollo de embriones somáticos, más aún de embriones somáticos haploides pues los obtuvo a partir de megagametofito, por ello debe ser considerado como el primero en obtener embriogénesis somática, es hasta recientemente que se le está dando tal reconocimiento, Attree y Fowke (1993) también comparten tal opinión.

No obstante que son ya 50 años desde que La Rue inició los cultivos *in vitro* de cicasas, éstos han sido escasos y más aún los estudios de embriogénesis somática *in vitro* como lo muestra la tabla 4. Aunque al principio la mayoría de los investigadores trabajaron con *Zamia pumila*, recientemente se han incrementado las especies estudiadas y se han logrado resultados via embriogénesis somática, utilizando como explantes no sólo embriones cigóticos maduros o

inmaduros y megagametofitos, sino tejidos somáticos como hojas jóvenes de plantas adultas, lo cual es un resultado muy significativo pues no se había podido lograr en ninguna gimnosperma.

En general los cultivos *in vitro* de cicadas han presentado problemas muy severos de oxidación e hiperhidratación, lento desarrollo y falta de respuestas morfológicas como se ha reportado en los cultivos que han resultado embriogénicos provenientes de megagametofitos, embriones cigóticos (Chávez *et al.*, 1992a y c. Jäger y van Staden, 1996) y de hojas jóvenes de plantas adultas de *C. mexicana* (Chávez *et al.*, 1992b y Chávez 1993) y *Ceratozamia hildae* (Litz *et al.*, 1995).

Hasta ahora, son pocos los reportes en los cuales los embriones somáticos de cicadas han llegado al estado de plántula y solo en el laboratorio del TREC y del Jardín Botánico de la UNAM se ha explorado su establecimiento en suelo (Moon com. pers.). Menos frecuente ha sido en cultivos organogénicos, por ejemplo cultivos de *Stangeria eriopus*, mantenidos en luz en los cuales se formaron estructuras verdes circinadas típicas de una hoja de cicada (Osborne y Van Staden, 1987) o en megagametofitos de *C. mexicana*, *Z. pumila*, *Z. fischeri*, *Z. furfuracea* (Chávez *et al.*, 1992 a, c).

Los estudios *in vitro* de *C. hildae* se restringen a dos: la obtención de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos y megagametofitos (Chávez *et al.*, 1992 a) y a partir de hojas de individuos adultos (Litz *et al.*, 1995), en ninguno de ellos se aborda una solución a la necrosis por oxidación, al control de la hiperhidratación ni se describen en detalle las diferentes etapas de los embriones somáticos.

Tabla 4.- Respuestas morfológicas *in vitro* en Cicadas, tomado de Chávez (1993) y actualizado con datos de 1995 y 1996.

Especie	Explant	Respuesta	Referencia
<i>Ceratozamia hildae</i>	M	C, R, B, ES	Chávez <i>et al.</i> , 1992a
	E	C, ES	Litz <i>et al.</i> , 1995
	H	ES	
<i>Ceratozamia euryphyllidia</i>	H	C, R, B, ES	Chávez <i>et al.</i> , en revisión
<i>C. mexicana</i>	M	C, R, ES	De Luca <i>et al.</i> , 1979
	Mespg	C	De Luca <i>et al.</i> , 1980
<i>C. mexicana</i> var. <i>robusta</i>	M	C, R, B, ES	Chávez <i>et al.</i> , 1992a y b
	E	C, ES	
	H	C, ES	

Tabla 4.- Respuestas morfogenéticas *in vitro* en Cicadas, tomado de Chávez (1993) y actualizado con datos de 1995 y 1996.

Especie	Expiante	Respuesta	Referencia
<i>Cycas circinalis</i>	M L	C ---	Norstog y Rhamstine, 1967
<i>C. revoluta</i>	RII	C	Brown y Feas, 1966
	M	R cor	De Luca <i>et al.</i> , 1979
	M	R cor	De Luca <i>et al.</i> , 1980
	Mespg	---	De Luca y Sabato, 1980
	F. Col. I pi	C, B y CLP	Rinaldi y Leva, 1995
	E.	C	Tadere <i>et al.</i> , 1995
<i>Encephalartos aliensteini</i>	Mespg	Espem	De Luca y Sabato, 1979
<i>E. caffer</i>	Masc	---	Osborne, 1988
<i>E. cupidus</i>	R, I	C	Koeleman y Small, 1982
	II	---	Osborne, 1988
<i>E. dyerianus</i>	E	C, ES	Jäger y van Staden, 1996
<i>E. eugene-maraisii</i>	R, T	C	Koeleman y Small, 1982
	H	---	Osborne, 1988
<i>E. jerox</i>	Masc, Micfls	C	Osborne, 1988
<i>E. inopinus</i>	R, I	C	Koeleman y Small, 1982
	II	---	Osborne, 1988
<i>E. lunatus</i>	R, T	C	Koeleman y Small, 1982
<i>E. latifrons</i>	P	C	Osborne, 1988
<i>E. lehmannii</i>	R, T	C	Koeleman y Small, 1982
	H	---	
<i>E. lemboboensis</i>	R, I	C	Koeleman y Small, 1982
<i>E. natalensis</i>	R, I	C	
	h	C	Osborne, 1988
	II, p E	---	Jäger y van Staden, 1996
<i>E. paucidentatus</i>	R, T	C	Koeleman y Small, 1982
<i>E. transvenosus</i>	R, T	C	Koeleman y Small, 1982
<i>E. umbeluziensis</i>	M	C	De Luca <i>et al.</i> , 1979
<i>E. villosus</i>	M	C	Laliberte <i>et al.</i> , 1983
<i>E. woodi</i>	h, Lb	C	
	Masc, Micfls	C	Osborne, 1988

Tabla 4.- Respuestas morfológicas *in vitro* en Cicadas, tomado de Chávez (1993) y actualizado con datos de 1995 y 1996.

Especie	Explante	Respuesta	Referencia
<i>Macrozamia riedlei</i>	M	R cor	Lamont y Ryan, 1977
<i>M. communis</i>	M	C, R cor	De Luca <i>et al.</i> , 1980
<i>Microzycas calocoma</i>	M	C, R	Peña y Grillo, 1982
<i>Stangeria eriopus</i>	r	B	Osborne y Van Staden, 1987
	H	---	Osborne, 1988
<i>Zamia fischeri</i>	M	C, B, ES	Chavez <i>et al.</i> , 1992c
	E	C, ES	Chávez com. pers.
<i>Z. furfuracea</i>	M	C, B, ES	Chávez <i>et al.</i> , 1992c
	E	C, ES	
<i>Z. pumila</i>	M	C, R, B, ES	La Rue, 1948
	M	C, R, B, ES	La Rue, 1954
	Mespg.	TP	
	M, E	C, R, ES	Norstog, 1965
	E	C, R, B	Brown y Teas, 1966
	M, E	C, ES	Norstog y Rhamstine, 1967
	cambium	C	Mustoe, 1967
	M	C	Riviera Rosa, 1980 (no publicado)
	E	C, R, B, ES	Webb <i>et al.</i> , 1983
	E	E cor	Monnier y Norstog, 1984
	E	E cor	Monnier y Norstog, 1986
	M	C, B, ES	
	N	C, ES	Chávez <i>et al.</i> , 1992c
E	C, B, ES		
35 especies de <i>Ceratozamia</i> , <i>Cycas</i> , <i>Dioon</i> , <i>Encephalartos</i> , <i>Lepidozamia</i> , <i>Macrozamia</i> , <i>Stangeria</i> , <i>Zamia</i>	M, H, R cor, Ov, Hip, Mielts y otras partes	C	Henson, 1980

B = brote, C = callo, CEP = "Callo" embriónico putativo, Cot = cotiledón, E = embrión, E cor = embrión cotiledonar, Epi = epicotilo, ES = embriones somáticos, Esperm = espermátogénesis, BH = base de hoja, h = hoja joven, H = hoja de planta madura, Hip = hipocótilo, inm = inmaduro, M = megagametofito, Masc = eje cono masculino, Mielts = microsporofilas, Mespg = microsporangios, N = nucela, Ov = óvulo, Pe = peciolo, pf = peciolo de foliolo, R = raíz, R cor = raíz coraloides, rH = ráquis de hoja, r = radícula, TP = tubo polínico, --- = sin respuesta.

En múltiples estudios con éxito sobre embriogénesis somática en coníferas, se utilizaron los medios de cultivo: White (W), Litvay (L), Murashige y Skoog (MS), Schenk y Hildebrandt (SH), Campbell y Durzan (CD), Gupta y Durzan (DCR) y últimamente para cicadas el B5 modificado (que se denominará Litz de aquí en adelante), estos medios son muy ricos en sales, nitratos y amonio (Chávez, 1993).

HIPERHIDRATACION DE CULTIVOS.

Los cultivos *in vitro* sufren anomalías anatómicas, fisiológicas y morfológicas que dan a éstos una apariencia vidriosa translúcida y un crecimiento anómalo, este fenómeno ha sido llamado vitrificación (Ziv, 1991).

Recientemente se ha reconsiderado el término vitrificación el cual es utilizado para nombrar dos cosas diferentes, por este motivo no es correcto su uso para nombrar las anomalías de los cultivos *in vitro*. Se han acuñado otros términos para sustituirlo (cultivos vidriosos, translúcidos, vitreos, vitrecentes, invitroficación y succulencia) y referirse a las anomalías asociadas, el término hiperhidratación es el que quizá sea el más adecuado ya que hace referencia a un excedente de agua en los tejidos y órganos (Debergh *et al.*, 1992).

Las anomalías morfológicas y anatómicas que a menudo se presentan son; cortos entrenudos, brotes arrosados, hojas gruesas, alargadas arrugadas y/o rizadas, brillantes, translúcidas con superficie reducida o hipertrofiada, color anormal, la formación de brotes y raíces casi no se presenta, hipolignificación del sistema vascular, hojas con defectuoso tejido epidérmico, cutícula delgada, estomas no funcionales o con inadecuada función, organización anormal en la grana de cloroplastos y con poca clorofila, defectuosa conexión vascular entre tallo y raíz (Debergh *et al.*, 1992). Se ha observado que este fenómeno de la hiperhidratación se combina con el proceso de poliembriogénesis en los cultivos embriogénicos de gimnospermas, entran en ciclos repetitivos de morfogénesis dando origen a múltiples embriones somáticos anormales y pocos normales que ya formados pueden desorganizarse para dar origen a nuevos embriones somáticos los cuales logran una escasa o nula maduración.

Existen factores que pueden inducir la hiperhidratación cuando otros no son optimizados como: medio nutritivo, contenedores, atmósfera, explantes, pero manejando estos mismos se puede llegar a controlarla (Debergh *et al.*, 1992).

La consistencia del medio, concentración y tipo de agente gelificante, la presencia de una capa líquida en el medio gelificado, concentración y tipo de citocinina, concentración de sales y la presencia de ciertos elementos minerales en abundancia están entre las causas (atribuibles al

medio) que pueden inducir hiperhidratación, la cual ocurre más frecuentemente en medios líquidos que en sólidos y en aquellos con poco agente gelificante. Entre las medidas para tratar de evitar la hiperhidratación se encuentran: el incremento de calcio y disminución del cloro o el NH_4^+ , otras técnicas incluyen pectina, agar hidrolizado, fluoroglucinol, fructosa, galactosa, metionina, retardantes del crecimiento (Debergh *et al.*, 1992), ABA, paclobutrazol (Roberts y Matthews, 1995).

ÁCIDO ABCSÍICO (ABA)

Hacia los años 30's, se descubrió el primer regulador del crecimiento vegetal (del grupo de las auxinas), posteriormente en los 50' se descubrieron otros reguladores: giberelinas, citocininas y etileno, en 1965 dos grupos de investigación convergieron en el descubrimiento del ácido abscísico. Hoy se sabe de otras sustancias que tienen efecto regulador en el crecimiento vegetal y que no son netamente hormonas vegetales como poliaminas, brasinólidos, ácido salicílico, ácido jasmónico y derivados, oligosacarinas, etc. Como no es claro que todos estos compuestos tengan el efecto a distancia, característico de las hormonas, se les conoce como reguladores del crecimiento vegetal o fitorreguladores (Moore 1989; Granell y Carbonell, 1995).

No siempre resulta fácil establecer si es una sustancia o la proporción de varias las que dan el efecto fisiológico, existen al menos tres factores relacionados con el efecto de las hormonas; su concentración, la presencia y características del receptor, así como presencia de los elementos involucrados en la cadena de traducción de la señal (Granell y Carbonell, 1995).

El ABA es un sesquiterpenoide que se sintetiza en cloroplastos y plastidios de los vegetales, se han propuesto dos vías para la síntesis del ABA, la primera a partir del mevalonato pasando por farnesil pirofosfato y la segunda, una vía alternativa, iniciando con un carotenoide (violaxantina) vía la xantoxina (Moore, 1989). El ABA se involucra entre otras cosas con la dormancia de yemas y semillas, abscisión, la regulación de la apertura estomática y la maduración de semillas (George y Sherrington, 1994; Moore, 1989).

En cultivos de tejidos vegetales el ABA es utilizado para promover el desarrollo normal de embriones somáticos *in vitro* y evitar su germinación temprana (von Arnold y Hakman, 1988; Emons *et al.*, 1993; Roberts y Matthews, 1995).

OBJETIVOS:

General.

Promover el desarrollo normal de embriones somáticos en sus diferentes etapas, mediante el uso de ácido abscísico.

Particulares.

Describir la morfología de las distintas etapas ontogénicas de embriones somáticos de *Ceratozamia hildae*.

Describir los efectos del ácido abscísico sobre la maduración de embriones somáticos de *Ceratozamia hildae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de la parte experimental, se contó con cultivos embriogénicos, iniciados en 1987 a partir de embriones cigóticos de *Ceratozamia hildae*. Los cultivos fueron resebrados, separando y clasificando los embriones somáticos de acuerdo al estado de desarrollo que presentaban, tomando como base los criterios descritos por von Arnold y Hakman (1988) para *Picea abies* y modificándolos según las características del desarrollo de la especie aquí en estudio.

Las fases de desarrollo que se tomaron como modelo fueron:

Fase 1.- "**Callo**" embriogénico (CE), nombrado así por su apariencia a simple vista, pero en realidad es una masa de embriones y suspensores que se pueden observar bajo el microscopio.

Fase 2.- **Embriones somáticos en etapa precotiledonar** (EP).

Fase 3.- **Embriones somáticos que presentaron cotiledón(es)** y pueden presentar un incipiente brote en forma de yema (EC).

Fase 4.- **Embriones somáticos en germinación** (EG), presentan los cotiledones, el brote bien desarrollado y la raíz puede ser incipiente.

OBJETIVOS:

General.

Promover el desarrollo normal de embriones somáticos en sus diferentes etapas, mediante el uso de ácido abscísico.

Particulares.

Describir la morfología de las distintas etapas ontogénicas de embriones somáticos de *Ceratozamia hildae*.

Describir los efectos del ácido abscísico sobre la maduración de embriones somáticos de *Ceratozamia hildae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de la parte experimental, se contó con cultivos embriogénicos, iniciados en 1987 a partir de embriones cigóticos de *Ceratozamia hildae*. Los cultivos fueron resebrados, separando y clasificando los embriones somáticos de acuerdo al estado de desarrollo que presentaban, tomando como base los criterios descritos por von Arnold y Hakman (1988) para *Picea abies* y modificándolos según las características del desarrollo de la especie aquí en estudio.

Las fases de desarrollo que se tomaron como modelo fueron:

Fase 1.- "Callo" embriogénico (CE), nombrado así por su apariencia a simple vista, pero en realidad es una masa de embriones y suspensores que se pueden observar bajo el microscopio.

Fase 2.- Embriones somáticos en etapa precotiledonar (EP).

Fase 3.- Embriones somáticos que presentaron cotiledón(es) y pueden presentar un incipiente brote en forma de yema (EC).

Fase 4.- Embriones somáticos en germinación (EG), presentan los cotiledones, el brote bien desarrollado y la raíz puede ser incipiente.

OXIDACIÓN DE TEJIDOS Y ÓRGANOS.

Algunos tejidos y órganos, en cultivo *in vitro* tienden a oxidarse, se toman café se deshidratan y llegan a morir, esto puede ser un serio problema cuando el material es muy sensible.

Para evitar la oxidación, a los cultivos se les coloca en oscuridad y/o se le agrega al medio algún compuesto antioxidante como; carbón activado (Tadera *et al.*, 1995; Jäger y van Staden, 1996), polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico (Chávez *et al.*, 1992a y b), ácido cítrico, entre otros.

Algunos cultivos de cicadas se han tratado con distintos compuestos dando buenos resultados. Para *Cycas revoluta* la adición de carbón activado al medio de cultivo evitó eficientemente la oxidación y posterior necrosis del callo (Tadera *et al.*, 1995; Rinaldi y Leva, 1995), para el caso de *Zamia pumila*, *Z. fischeri*, *Ceratozamia hildae*, *C. mexicana* y *C. euryphyllidia* el Ác. ascórbico al parecer disminuye la oxidación (Chávez *et al.*, 1992a y b).

En el intervalo 5.7 y 5.8 del pH se ha visto que se da un cambio sustancial en su valor después del autoclaveado, éste es corregido por el material biológico que se cultiva en él (Skirvin *et al.*, 1986), *C. hildae* al igual que todas las cicadas, presenta un lento crecimiento, lo que podría estar asociado a que el pH no se corrija tan rápido como para evitar que se dañe el tejido. Se ha sugerido que los cambios en el pH después del autoclaveado son menos pronunciados con el incremento de los niveles de agar (Singha, 1982).

Por estas razones es importante la delimitación de las diferentes etapas embriogénicas, se sabe que los embriones cigóticos de las cicadas generalmente presentan dos cotiledones (Stewart y Rothwell, 1993) y ocasionalmente presentan más, para *Ceratozamia* Chamberlain (1957) señala que el embrión tiene un sólo cotiledón aunque eventualmente también puede presentar dos, en otros trabajos (Chávez *et al.*, 1992b; Litz *et al.*, 1995) mencionan que algunos embriones somáticos pudieron resultar con 1 ó 2 cotiledones sin embargo no establece una clara descripción de éstos, el conocimiento detallado de las diferentes etapas embriológicas *in vitro* de *C. hildae* y el manejo de los cultivos sometiéndolos a factores que puedan reducir o eliminar la necrosis por oxidación y la hiperhidratación se tendrá que alcanzar antes de que un sistema de regeneración y propagación resulte efectivo para continuar con el estudio y conservación de *C. hildae*, por lo anterior se proponen los siguientes objetivos.

Para el cultivo de *C. hildae* se utilizó el medio Litz basal (tabla 5), de acuerdo a Chávez *et al.* (1992a, b y c) y Litz *et al.* (1995), este medio consiste en una combinación de los macronutrientes del B5 (Gamborg *et al.*, 1968); de los micronutrientes y compuestos orgánicos del MS (Murashige y Skoog, 1962) y de los compuestos orgánicos de Norstog y Rhamstine (1967), al medio se le adicionaron 60 g/l de sacarosa y 8.5 g/l de agar Bacteriológico, el pH se ajustó a 5.7, según el caso, con HCl 0.1 N ó KOH 0.1 N antes de ser esterilizado por 15 minutos a 1.5 Kg/cm² y 120 °C.

A lo largo de estos años los cultivos se han mantenido en medio Litz sin reguladores del crecimiento y sólo para su proliferación, el medio se suplementó con 0.1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), se han incubado en oscuridad a 25 ± 2° C.

Tabla 5.- Medio de Cultivo B5 modificado (Litz)

MACRONUTRIENTES		mg/l
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
Fosfato de Sodio	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150
Nitrato de Potasio	KNO_3	2500
Sulfato de Amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134
MICRONUTRIENTES		mg/l
Yoduro de Potasio	KI	0.83
Ac. Bórico	H_3BO_3	6.3
Sulfato Manganoso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
Sulfato de Zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Molibdato de Sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Sulfato Cúprico	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Cloruro de Cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
EDTA sal disódica	Na_2EDTA	37.3
Sulfato Ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
COMPUESTOS ORGANICOS		mg/l
Glicina	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NO}_2$	2
Myo-inositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	100
Tiamina (vit B1)	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$	0.1
Piridoxina (vit B6)	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	0.5
Ac. Nicotínico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0.5
L-Glutamina	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$	400
Ac. L-Ascórbico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	100
Hidrolizado enzimático de caseína		100
L-Arginina	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2$	100
L-Asparagina	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100
Sacarosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	60000
Agar Bacteriológico		8500

Para los diferentes tratamientos se utilizó, el medio Litz a dos distintas concentraciones de sus sales y compuestos orgánicos (50-100%) y se adicionó una solución de ABA en distintas concentraciones (0, 1, 5, 10, 20, 30 μM) (tablas 6 a la 9). Debido a que el ABA es termolábil y no resiste la esterilización en autoclave fue esterilizado por filtración con swinnex 13 y 25 mm, con membrana (filtros) millipore tipo HA con un tamaño de poro de 0.45 μm y juntas de silicona, después de filtrar la solución de ABA, se agregó bajo condiciones asépticas (en una campana de flujo laminar) al medio de cultivo ya esterilizado en autoclave, posteriormente se vaciaron 20 ml en cada caja de petri 15 x 100 mm de vidrio esterilizadas dejándose abiertas hasta la gelificación del medio, y entonces se taparon y sellaron con "ega-pac" hasta su utilización.

Las diferencias que existieron en cuanto a material utilizado en número de inóculos y tratamientos fueron debidas a la escasez de material biológico con que se contó, cuando el material lo permitió se establecieron dos lotes (Litz al 50 % y 100 %) para cada tratamiento ensayado, con la presencia de ABA durante 30 ó 45 días; después de estos periodos, los inóculos fueron transferidos a medio Litz sin reguladores de crecimiento e incubados en completa oscuridad a 25 ± 2 °C.

"Callo" embriogénico (CE): como se contó con suficiente material biológico se pudieron ensayar varias combinaciones con un número relativamente considerable de explantes, se sembraron diez inóculos por caja de petri, una caja por tratamiento de ABA y así mismo para cada concentración del medio, la permanencia en el tratamiento duró 30 y 45 días (tabla 6).

Tabla 6.- Combinaciones de ABA y Litz para CE

Medio Litz	ABA(μM)						Sacarosa
100 %	0	1	5	10	20	30	100 %
50 %	0	1	5	10	20	30	100 %

Embriones somáticos en fase precotiledonar (EP): se sembraron cinco inóculos por caja, una caja por concentración de ABA y solo se utilizó Litz al 100 %, el tratamiento duró 30 días (tabla 7).

Tabla 7.- Combinaciones ABA para EP

Medio Litz	ABA(μ M)						Sacarosa
100 %	0	1	5	10	20	30	100 %

Embriones cotiledonares (EC): se sembraron cuatro embriones (en promedio de 10.7 ± 4.2 mm de longitud) por caja, una caja por tratamiento, el tratamiento duró 30 días y se utilizó Litz al 50 y 100 % (tabla 8).

Tabla 8.- Combinaciones de ABA y Litz para EC

Medio Litz	ABA(μ M)						Sacarosa
100 %	0	1	5	10	20	30	100 %
50 %	0	1	5	10	20	30	100 %

Embriones en germinación (EG): se sembraron tres embriones somáticos por caja, una caja por tratamiento, el tratamiento duró 30 días (tabla 9).

Tabla 9.- Combinaciones de ABA y Litz para EG

Medio Litz	ABA(μ M)						Sacarosa
100 %	0	1	5	10	20	30	100 %
50 %	0	1	5	10	20	30	100 %

La toma de datos se realizó al inicio y al término del tiempo del tratamiento y continuó cada mes, los posteriores subcultivos fueron cada tres meses, se midió la longitud de los explantes y se tomaron algunas características como el color, cambio de color, consistencia.

RESULTADOS

Las observaciones realizadas dieron como resultado la separación y descripción de cuatro distintas fases de desarrollo "callo" embriogénico, embriones precotiledonares, embriones cotiledonares, embriones en germinación, las cuales pueden ser utilizadas y aplicadas a otras especies de cicadas con algunas diferencias morfológicas.

No obstante que las manipulaciones de separación de los embriones se hicieron con mucho cuidado, el entrelazamiento de los largos suspensores, la asincronía de las respuestas morfogénicas y la abundante poliembriogénesis impidieron tener cultivos exclusivos de una sola fase de desarrollo (homogéneos) y un número preciso y uniforme en cada tratamiento (CE, EP y EC).

Fase 1. "Callo" embriogénico o cultivos embriogénicos (CE). A simple vista tenían aspecto húmedo, de callo nodular y color ámbar, de consistencia suave y desmenuzable, vistos bajo microscopio de disección consistían de masas de pequeños y numerosos embriones somáticos con cuerpo semiesférico formado de células redondas pequeñas, con denso citoplasma y pequeñas vacuolas, la presencia del suspensor no fue evidente (figura 2).

Fase 2. Embriones somáticos en etapa precotiledonar (EP). Blancos con cuerpo firme, alargado y un suspensor de longitud variable, bajo microscopio se puede observar una prominencia en su parte subapical que daría origen a la zona del brote, de la zona adyacente y completamente apical se originó el cotiledón, con estas características los embriones resultaron monocotiledóneos, por otro lado los embriones dicotiledóneos se desarrollaron a partir de un ápice dividido en dos secciones, cada una dió lugar a un cotiledón (figura 3).



Figura 2.- "Callo" embriónico (CE), nodular y de consistencia húmeda.



Figura 3.- Embriones somáticos en etapa precotiledonar (EP), los embriones se entrelazan con los suspensores.

Fase 3. Embriones somáticos cotiledonares (EC). Presentan una superficie lisa, mantenidos en oscuridad tuvieron un color blanco, algunos con tono rosado en la zona del brote que en ocasiones se continuó hasta el cotiledón, en condiciones de iluminación el color fue verde claro hasta verde intenso y la zona del brote presentó un color rojo verde, el brote generalmente fue pubescente y en ocasiones se desarrolló glabro; aunque algunos embriones fueron dicotiledóneos la gran mayoría resultaron monocotiledóneos (90 %), presentan restos del suspensor comúnmente oxidado y deshidratado que se mantenía unido firmemente al cuerpo del embrión por su parte basal y siguiendo un eje embrionario (figura 4).

Fase 4. Embriones somáticos en germinación (EG). De incipiente color ámbar a blanco en condiciones de oscuridad, la mayoría con un cotiledón que en esta etapa comenzó a desecarse por su parte apical, en embriones más desarrollados la desecación llegó hasta la zona del brote con lo que sólo quedaron restos del cotiledón, el meristemo apical se encontró cubierto por una o varias escamas (brácteas) a esta zona se le nombró como brote, el brote estuvo bien definido y regularmente fué pubescente aunque algunas veces glabro, de color rosa a rojo intenso, en esta etapa todavía se encontraron restos del suspensor de color café y deshidratado, éste se presentó unido entre la raíz y el cotiledón, la raíz incipiente o bien desarrollada de consistencia firme a esponjosa, la formación de las hojas fue aleatoria (figura 5).



Figura 4.- Embriones somáticos cotiledonares (EC), a) y b), muestran dos embriones con un solo cotiledón (C) y con el brote pubescente (B), en la figura 4 b) podemos apreciar restos del suspensor oxidado y deshidratado, unido al cuerpo del embrión por su parte basal (S).

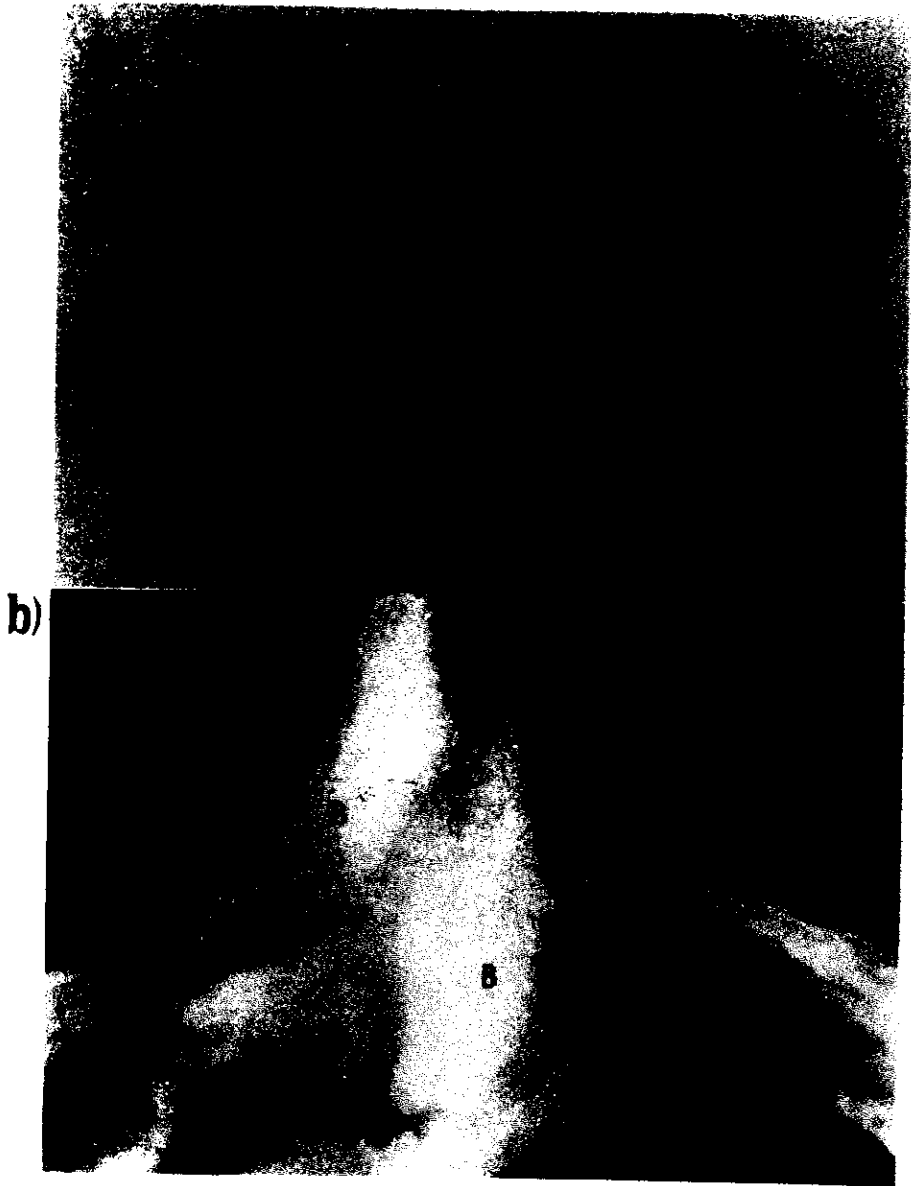


Figura 3. **Embriones somáticos en germinación (EG)**. 3 a) observamos un embrión con un cotiledón, brote pubescente, raíz y suspensor oxidado y deshidratado. 3 b) acercamiento del brote de un embrión dicotiledóneo, presenta dos brácteas cubriendo la zona del brote

Los resultados de los experimentos con ABA en las diferentes fases de desarrollo (1, 2, 3 y 4) son presentados en las tablas 10 a la 18.

Tabla 10. Longitud en mm alcanzada por el "Callo" embriogénico en medio Litz basal a lo largo de 7 meses de seguimiento. Los cultivos fueron pretratados con ABA por 30 días. Cada dato es el promedio de diez inóculos por tratamiento con su desviación estándar (\pm DE).

meses	ABA (μ M)/30 días					
	30	20	10	5	1	0
0	7 \pm 1.9	7.2 \pm 1.9	9.3 \pm 1.5	5.4 \pm 0.7	6.5 \pm 0.9	6.5 \pm 1.5
1	9.3 \pm 3.0	6.9 \pm 1.8	9 \pm 1.5	6.5 \pm 0.9	6.9 \pm 0.8	6.9 \pm 1.3
2	7.2 \pm 1.8	7.8 \pm 0.8	7.1 \pm 1.4	7.1 \pm 1.4	7.2 \pm 1.6	7.4 \pm 1.5
3	7.1 \pm 1.6	7.3 \pm 0.9	6.4 \pm 1.2	6.3 \pm 1.1	7.2 \pm 1.7	7.2 \pm 1.4
4	7.3 \pm 1.8	7.4 \pm 0.8	6.7 \pm 0.9	6.7 \pm 1.1	7.2 \pm 1.6	7.2 \pm 1.6
5	7 \pm 1.4	7.2 \pm 1.4	6.7 \pm 1.0	6.8 \pm 1.5	7.4 \pm 1.2	8 \pm 1.1
6	7 \pm 1.1	7.2 \pm 1.3	6.6 \pm 1.2	6.9 \pm 1.3	7.5 \pm 1.4	7.8 \pm 1.5
7	6.9 \pm 1.3	7.3 \pm 1.2	6.6 \pm 1.2	6.7 \pm 1.6	7.33 \pm 1.3	7.8 \pm 1.0

Tabla 11. Longitud en mm alcanzada por el "Callo" embriogénico en medio Litz basal a lo largo de 8 meses de seguimiento. Los cultivos fueron pretratados con ABA por 45 días. Cada dato es el promedio de diez inóculos por tratamiento con su desviación estándar (\pm DE).

meses	ABA (μ M)/45 días					
	30	20	10	5	1	0
0	6.3 \pm 1.4	7.2 \pm 0.9	6.6 \pm 1.6	6.3 \pm 1.6	7.3 \pm 1.3	7.5 \pm 1.1
1	6.5 \pm 1.1	7.5 \pm 0.5	7.0 \pm 1.3	6.4 \pm 1.6	7.6 \pm 1.7	7.9 \pm 1.2
2	10.1 \pm 1.5	7.5 \pm 1.4	9.1 \pm 1.6	6.4 \pm 0.9	7 \pm 1.1	6.4 \pm 1.3
3	11 \pm 2.3	6.9 \pm 1.4	9.6 \pm 1.6	6.2 \pm 0.6	7.3 \pm 0.8	6.8 \pm 0.9
4	12.6 \pm 2.6	7.1 \pm 1.9	9.6 \pm 1.3	6.2 \pm 0.4	7.2 \pm 0.9	7 \pm 0.9
5	14.2 \pm 3.1	7.1 \pm 1.6	9.5 \pm 1.4	6.1 \pm 0.3	7.2 \pm 0.9	6.8 \pm 0.7
6	17 \pm 8.0	7.2 \pm 2.3	9.7 \pm 2.0	6.8 \pm 0.8	7.4 \pm 1.2	6.9 \pm 0.9
7	16.5 \pm 6.6	7.2 \pm 2.3	9.5 \pm 1.9	6.1 \pm 0.6	7.0 \pm 1.2	6.7 \pm 0.8
8	17.8 \pm 4.4	7.3 \pm 2.2	9.8 \pm 1.7	6.5 \pm 0.8	7.3 \pm 1.3	6.6 \pm 0.7

Tabla 12. Longitud en mm alcanzada por el "Callo" embriogénico en medio Litz al 50% y 100% de sacarosa, a lo largo de 7 meses de seguimiento. Los cultivos fueron pretratados con ABA por 30 días. Cada dato es el promedio de diez inóculos por tratamiento más su desviación estándar (\pm DE).

meses	ABA (μ M)/30 días					
	30	20	10	5	1	0
0	7.8 \pm 1.2	6.9 \pm 1.8	7.4 \pm 1.6	5.3 \pm 0.9	7.5 \pm 1.1	5.5 \pm 1.8
1	8.3 \pm 1.0	9.2 \pm 2.2	8.9 \pm 1.7	5.8 \pm 0.8	8.1 \pm 1.3	6.7 \pm 1.5
2	5.5 \pm 1.1	8.3 \pm 1.7	7.3 \pm 2.3	7.4 \pm 0.8	6.9 \pm 1.6	8 \pm 1.7
3	5.8 \pm 1.4	10.3 \pm 2.6	8.4 \pm 2.9	8.2 \pm 1.6	6.8 \pm 1.5	7.6 \pm 1.5
4	5.9 \pm 1.3	9.9 \pm 3.0	8.9 \pm 3.2	8.6 \pm 2.0	6.8 \pm 1.5	7.4 \pm 1.6
5	5.9 \pm 0.7	12.7 \pm 4.0	9.1 \pm 2.9	9.7 \pm 1.9	6.7 \pm 1.7	7.9 \pm 2.2
6	5.7 \pm 0.7	12.9 \pm 4.1	9.1 \pm 3.1	9.8 \pm 1.8	6.6 \pm 1.8	7.7 \pm 2.1
7	5.8 \pm 0.8	12.8 \pm 4.3	8.9 \pm 2.1	9.8 \pm 1.8	6.6 \pm 1.8	7.7 \pm 2.1

Tabla 13. Longitud en mm alcanzado por el "Callo" embriogénico en medio Litz al 50% y 100% de sacarosa, a lo largo de 8 meses de seguimiento. Los cultivos fueron pretratados con ABA por 45 días. Cada dato es el promedio de diez inóculos por tratamiento con su desviación estándar (\pm DE).

meses	ABA (μ M)/45 días					
	30	20	10	5	1	0
0	5.4 \pm 0.5	6.7 \pm 1.6	5.9 \pm 1.0	7.3 \pm 1.1	6.5 \pm 1.0	7.7 \pm 1.8
1	5.7 \pm 0.5	8.3 \pm 1.8	7.4 \pm 1.3	7.5 \pm 1.1	6.8 \pm 1.1	7.6 \pm 1.6
2	8.4 \pm 1.3	10.4 \pm 1.8	10.4 \pm 2.6	6.6 \pm 1.1	8.2 \pm 1.6	6.9 \pm 1.8
3	8.0 \pm 1.1	10.5 \pm 2.1	11.1 \pm 2.6	6.5 \pm 1.3	8.2 \pm 1.3	6.9 \pm 1.8
4	7.9 \pm 1.1	11.4 \pm 2.7	12.4 \pm 3.2	6.4 \pm 1.3	8.0 \pm 0.9	7.0 \pm 1.7
5	7.2 \pm 1.8	14.2 \pm 3.6	13.5 \pm 4.0	6.5 \pm 1.0	8.1 \pm 1.3	6.6 \pm 1.5
6	9.4 \pm 2.9	13.9 \pm 4.4	13.4 \pm 4.4	6.8 \pm 1.3	8.9 \pm 1.2	7.3 \pm 1.5
7	9.6 \pm 2.9	14.1 \pm 5.0	14 \pm 4.6	6.5 \pm 1.0	8.3 \pm 1.2	7.3 \pm 1.7
8	10 \pm 2.9	14.1 \pm 5.0	13.5 \pm 4.3	6.7 \pm 1.0	8.6 \pm 0.9	7.2 \pm 1.7

Tabla 14. Longitud en mm alcanzada por los embriones precotiledonares en medio Litz basal, a lo largo de 7 meses de seguimiento. Los cultivos fueron pretratados con ABA por 30 días. Cada dato es el promedio de cinco inóculos por tratamiento con su desviación estándar (\pm DE).

meses	ABA (μ M)/30 días					
	30	20	10	5	1	0
0	9 \pm 3.4	8.2 \pm 1.3	7.2 \pm 0.5	8.5 \pm 2.7	8.5 \pm 2.4	9.5 \pm 2.5
1	9.7 \pm 3.6	9.5 \pm 1.0	11.7 \pm 1.5	12 \pm 4.2	12.0 \pm 2.2	12.0 \pm 3.6
2	9.5 \pm 5.8	10 \pm 0.8	13.5 \pm 2.9	12 \pm 3.6	14.0 \pm 1.1	15.0 \pm 1.0
3	9.5 \pm 4.9	10.7 \pm 1.3	14.5 \pm 2.5	12.7 \pm 4.1	16.7 \pm 1.9	16.0 \pm 2.0
4	11.7 \pm 6.6	14.7 \pm 2.0	16 \pm 2.2	13.2 \pm 5.4	18.7 \pm 1.5	17.0 \pm 3.0
5	12.5 \pm 7.4	15.7 \pm 5.1	15.7 \pm 3.5	14.0 \pm 4.4	22.0 \pm 2.7	16.0 \pm 2.7
6	16.7 \pm 6.0	16.7 \pm 5.1	16.5 \pm 2.9	14.7 \pm 4.9	22.2 \pm 3.2	17.7 \pm 4.9
7	18 \pm 11.2	20 \pm 7.0	18.7 \pm 2.1	16.2 \pm 7.4	24.5 \pm 4.4	21.0 \pm 5.2

Tabla 15. Longitud en mm alcanzado por los embriones cotiledonares mantenidos en medio Litz basal, a lo largo de 7 meses de seguimiento. Los cultivos fueron pretratados con ABA por 30 días. Cada dato es el promedio de cuatro inóculos por tratamiento con su desviación estándar (\pm DE).

meses	ABA (μ M)/30 días					
	30	20	10	5	1	0
0	10.4 \pm 4.8	8.4 \pm 2.7	9.0 \pm 1.6	6.6 \pm 2.6	10.4 \pm 2.7	12.2 \pm 2.6
1	10.6 \pm 4.3	8.8 \pm 3.8	9.0 \pm 1.6	7.0 \pm 2.5	10.6 \pm 3.3	12.6 \pm 2.3
2	10.6 \pm 4.3	9.2 \pm 4.2	9.2 \pm 1.3	7.4 \pm 2.7	9.8 \pm 2.9	12.6 \pm 2.3
3	12.2 \pm 2.9	9.4 \pm 3.4	9.0 \pm 1.4	7.6 \pm 2.7	10.6 \pm 4.0	12.6 \pm 2.3
4	13.4 \pm 2.8	9.6 \pm 3.6	8.8 \pm 1.3	7.8 \pm 2.9	11.4 \pm 3.8	12.6 \pm 2.3
5	16.2 \pm 6.9	10.2 \pm 3.6	9.4 \pm 1.7	7.6 \pm 2.9	12.4 \pm 4.8	12.6 \pm 2.3
6	15.8 \pm 7.6	9.0 \pm 4.6	9.0 \pm 1.4	7.6 \pm 3.0	11.0 \pm 3.0	12.6 \pm 2.3
7	19.8 \pm 8.5	15.6 \pm 8.7	8.8 \pm 1.5	9.4 \pm 4.1	14.6 \pm 4.9	12.6 \pm 2.3

Tabla 16. Longitud en mm alcanzado por los embriones cotiledonares cultivados en medio Litz al 50% y 100% de sacarosa, a lo largo de 7 meses de seguimiento. Los cultivos fueron pretratados con ABA por 30 días. Cada dato es el promedio de cuatro inóculos por tratamiento con su desviación estándar (\pm DE).

meses	ABA (μ M)/30 días					
	30	20	10	5	1	0
0	8.6 \pm 1.9	12.0 \pm 4.3	9.4 \pm 5.4	15.2 \pm 5.5	15.0 \pm 3.5	11.8 \pm 4.0
1	9.0 \pm 4.0	13.8 \pm 4.5	12.4 \pm 4.2	12.4 \pm 4.3	14.8 \pm 5.8	16.4 \pm 5.5
2	8.5 \pm 3.1	14.2 \pm 4.9	11.8 \pm 4.5	12.4 \pm 4.3	14.6 \pm 5.3	16.6 \pm 5.7
3	9.2 \pm 2.6	12.8 \pm 3.9	10.8 \pm 3.3	11.8 \pm 3.3	14.6 \pm 5.7	14.0 \pm 5.0
4	13.2 \pm 8.3	13.2 \pm 4.0	10.8 \pm 3.3	15.0 \pm 9.6	14.4 \pm 5.6	15.4 \pm 4.2
5	11.7 \pm 5.6	13.2 \pm 4.3	11.6 \pm 4.2	15.4 \pm 10.4	14.8 \pm 5.3	16.4 \pm 5.5
6	13.2 \pm 6.6	13.4 \pm 4.6	11.6 \pm 3.9	15.6 \pm 10.9	14.8 \pm 5.3	16.8 \pm 5.0
7	11.7 \pm 5.5	13.6 \pm 4.7	11.6 \pm 4.1	15.4 \pm 10.5	14.8 \pm 5.3	14.6 \pm 4.6

Tabla 17. Longitud en mm alcanzada por los embriones en germinación sembrados en medio Litz basal, a lo largo de 7 meses de seguimiento. Los cultivos fueron pretratados con ABA por 30 días. Cada dato es el promedio de tres embriones por tratamiento con su desviación estándar (\pm DE).

meses	ABA (μ M)/30 días					
	30	20	10	5	1	0
0	19.0 \pm 5.3	28.0 \pm 9.5	17.3 \pm 2.5	24.3 \pm 5.1	16.3 \pm 5.0	21.3 \pm 4.1
1	20.3 \pm 2.5	28.7 \pm 9.0	21.0 \pm 3.6	17.0 \pm 2.7	25.0 \pm 6.2	15.0 \pm 2.0
2	19.0 \pm 5.3	28.3 \pm 8.4	20.7 \pm 3.8	16.3 \pm 2.5	24.3 \pm 5.1	17.7 \pm 3.0
3	19.3 \pm 5.5	28.0 \pm 7.8	20.7 \pm 3.8	16.0 \pm 2.0	25.3 \pm 4.9	17.7 \pm 3.5
4	19.3 \pm 3.8	28.0 \pm 7.8	19.0 \pm 6.0	17.3 \pm 2.5	27.0 \pm 4.0	19.0 \pm 6.6
5	28.3 \pm 8.4	19.0 \pm 4.4	20.7 \pm 3.8	17.0 \pm 1.7	28.0 \pm 3.6	22.3 \pm 8.1
6	19.3 \pm 3.8	28.3 \pm 8.4	19.33 \pm 5.5	17.3 \pm 2.3	28.0 \pm 3.6	22.3 \pm 8.1
7	21.3 \pm 8.5	28.3 \pm 7.5	20.67 \pm 3.8	16.7 \pm 2.0	28.0 \pm 3.6	24.0 \pm 8.2

Tabla 18. Longitud en mm alcanzada por los embriones en germinación cultivados en medio Litz al 50% y 100% de sacarosa, a lo largo de 7 meses de seguimiento. Los cultivos fueron pretratados con ABA por 30 días. Cada dato es el promedio de tres embriones por tratamiento más su desviación estándar (\pm DE).

meses	ABA (μ M)/30 días					
	30	20	10	5	1	0
0	16.7 \pm 3.0	19.0 \pm 3.5	17 \pm 4.4	22.0 \pm 9.5	18.7 \pm 3.2	26.0 \pm 1.0
1	17.0 \pm 2.6	20.0 \pm 3.6	17.7 \pm 2.3	22.3 \pm 9.3	16.0 \pm 3.6	21.7 \pm 6.7
2	16.7 \pm 3.2	22.0 \pm 3.5	17.7 \pm 2.3	25.7 \pm 6.0	18.3 \pm 2.9	25.3 \pm 0.6
3	16.7 \pm 2.5	17.7 \pm 2.0	20.7 \pm 6.0	26.0 \pm 6.6	16.7 \pm 3.8	22.3 \pm 4.7
4	16.7 \pm 2.5	20.0 \pm 3.6	21.7 \pm 7.6	26.0 \pm 6.6	17.7 \pm 4.9	25.3 \pm 0.6
5	16.7 \pm 2.5	19.7 \pm 3.5	21.0 \pm 5.6	25.0 \pm 8.0	18.3 \pm 2.9	25.3 \pm 0.6
6	16.7 \pm 2.5	19.7 \pm 3.5	20.7 \pm 6.7	25.0 \pm 8.0	18.7 \pm 3.2	25.0 \pm 1.0
7	16.3 \pm 3.0	19.7 \pm 3.5	14.7 \pm 4.5	24.7 \pm 8.5	18.7 \pm 2.3	25.0 \pm 1.0

Las fases más desarrolladas EC y EG presentaron una mayor necrosis por oxidación que en las primeras dos fases CE, EP, ésta ocurrió con el simple subcultivo de los explantes, la coloración cambió de blanca a café en la primer semana de cultivo y en la mayoría de los casos se tornó hasta una coloración café-negra al final del seguimiento, el crecimiento que tuvieron sólo ocurrió en los cotiledones y nunca se desarrollaron a etapas posteriores, en algunos casos proliferaron embriones nuevos de los explantes iniciales, la superficie lisa turgente cambió en la mayoría a una superficie rugosa, el CE mantuvo su color ámbar y su crecimiento no se detuvo, los EP permanecieron de color blanco y con la superficie lisa y turgente.

El análisis para buscar grupos homogéneos entre tratamientos del "callo" embriogénico expuestos al ABA durante 45 y 30 días se muestra en la tabla 19, se observa que en el "callo" embriogénico expuesto por 45 días al ABA y subcultivado posteriormente en medio Litz basal (tabla 19a), los tratamientos 10 μM y 30 μM difieren del testigo, en la tabla 19b observamos los grupos formados con los tratamientos expuestos al ABA durante 30 días y subcultivados en medio Litz al 50 %, en esta tabla se muestra que el tratamiento con 20 μM de ABA es el único que se diferencia del testigo, finalmente en la tabla 19c encontramos dos tratamientos 10 μM y 20 μM que difieren del testigo, en todos los casos señalados podemos atribuir las diferencias a la utilización del ABA.

Los últimos datos de las tablas 10 a la 14 y que corresponden a los promedios de la longitud alcanzada por el "callo" embriogénico al final del experimento, se representan en las figuras 6 a la 10, la gráfica 6 muestra los datos del "callo" embriogénico expuesto durante 30 días al ABA y subcultivado en medio Litz basal, en la figura 7 los datos del "callo" embriogénico expuesto durante 45 días y cultivado en Litz basal, las figuras 8 y 9 muestran los datos del "callo" embriogénico expuestos durante 30 y 45 días al ABA respectivamente y subcultivados en medio Litz al 50 %, en la última figura fueron graficados los datos de los embriones precotiledonares.

Tabla 19.- Análisis de rango múltiple (Tukey), para "Callo" embriogénico, a) expuestos por 45 días a ABA y subcultivados en medio Litz basal. b) expuestos por 30 días a ABA y subcultivados en medio Litz al 50 % y c) expuestos por 45 días al ABA y subcultivados en medio Litz al 50 %.

a) Tratamiento	Número	Promedio	Grupos homogéneos
0	10	6.5	X
5	10	7.3	X
1	10	6.6	XX
20	10	9.8	XX
10	10	7.3	X
30	10	17.8	X

b) Tratamiento	Número	Promedio	Grupos homogéneos
30	10	17.8	X
0	10	6.5	XX
1	10	6.6	XX
10	10	7.3	XX
5	10	7.3	XX
20	10	9.8	X

c) Tratamiento	Número	Promedio	Grupos homogéneos
0	10	6.5	X
1	10	6.6	X
5	10	7.3	X
30	10	17.8	XX
10	10	7.3	XX
20	10	9.8	X

figura 6.- Promedio de la longitud final de "callo" embriogénico, cultivado en medio Litz basal durante 7 meses, pretratado por 30 días en ABA.

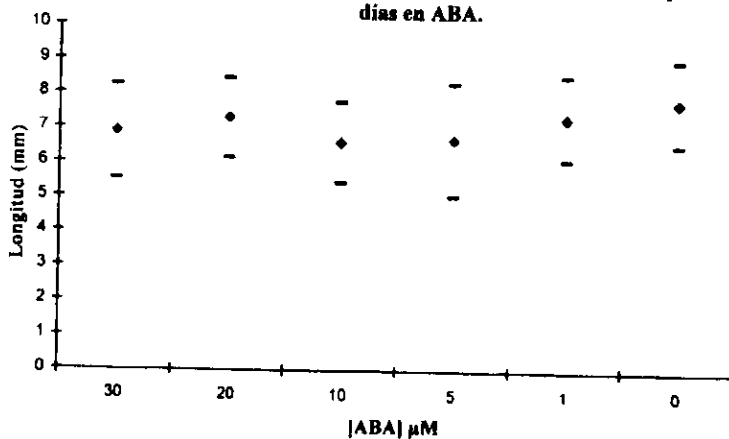


Figura 7.- Promedio de la longitud final de "callo" embriogénico, cultivado en medio Litz basal durante 8 meses, pretratado por 45 días en ABA.

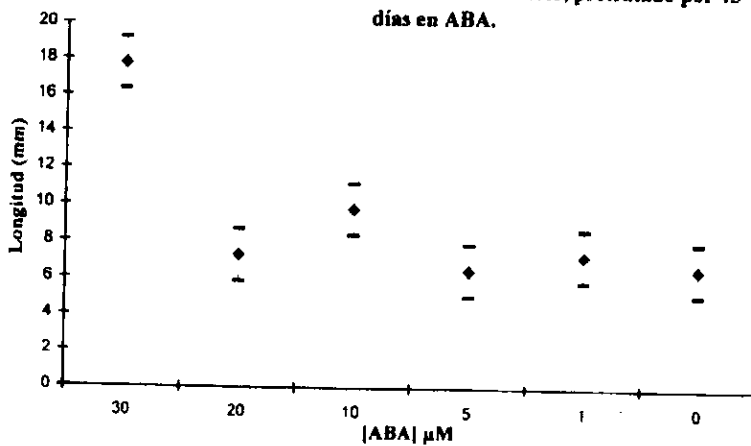


Figura 8.- Promedio de la longitud final de "callo" embriogénico, cultivado en medio Litz al 50 % durante 7 meses, pretratado por 30 días en ABA.

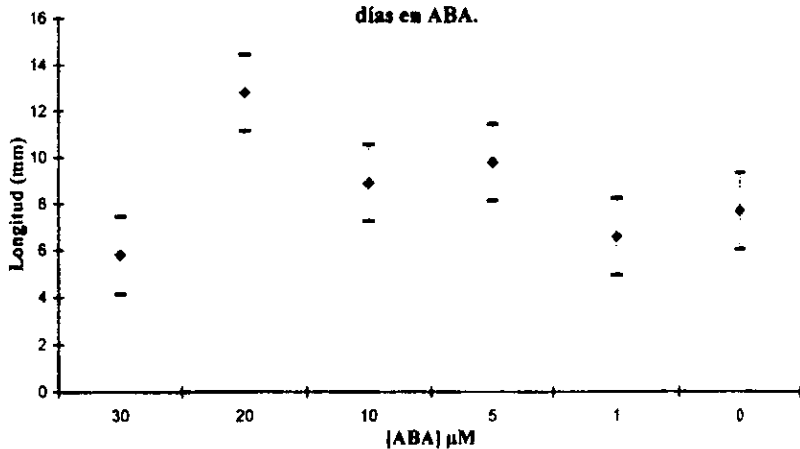


Figura 9.- Promedio de la longitud final de "callo" embriogénico, cultivado en medio Litz al 50 % durante 8 meses, pretratado por 45 días en ABA.

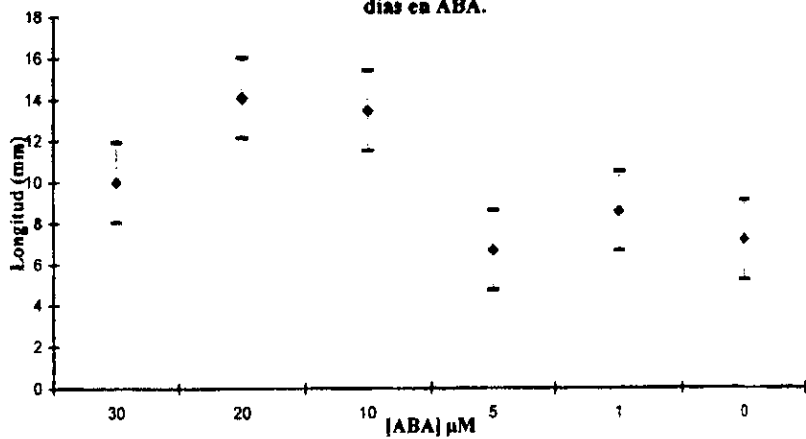
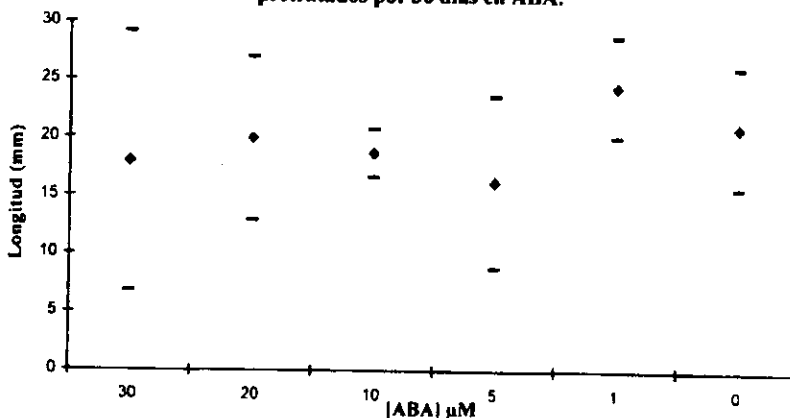


Figura 10.- Promedio de la longitud final de los embriones precotiledonares, cultivados en medio Litz al 50 % durante 7 meses, pretratados por 30 días en ABA.



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La separación de las distintas etapas de desarrollo embrionario en *C. hildae* se apegan, casi estrictamente, a las establecidas por von Arnold y Hakman (1988) para cultivos embriogénicos *in vitro* de coníferas y sólo en los embriones somáticos en germinación se dan algunas variantes, al parecer debido principalmente a que los cultivos de *C. hildae* se mantuvieron en completa oscuridad por lo que no presentaron clorofila, la raíz no emergió en todos los casos y el desarrollo de las hojas fue aún menos frecuente, cuando se presentan se podría hablar de una fase posterior a la 4 y que sería la de plántula.

También fue notable que la gran mayoría de los embriones somáticos presentaron un cotiledón (90 %), aunque naturalmente las cicadas en los embriones cigóticos presentan dos cotiledones y ocasionalmente se presentan más (Stewart y Rothwell, 1993). Las observaciones concuerdan con lo reportado por Chamberlain (1957) para embriones cigóticos de *Ceratozamia* los cuales pueden presentar naturalmente un solo cotiledón, el mismo autor refirió un trabajo donde los embriones presentaron uno y dos cotiledones, así mismo Chávez *et al.* (1992 a y b) reportaron embriones somáticos de *Ceratozamia mexicana* como monocotiledóneos en cultivos obtenidos de megagametofitos y embriones cigóticos, y en cultivos provenientes de folíolos de plantas adultas formaron embriones dicotiledóneos, para *Ceratozamia hildae* reportaron

embriones monocotiledóneos y dicotiledóneos para cultivos de megagametofito y de embrión cigótico, pero no establecieron proporciones ni hicieron una descripción detallada de los mismos (Chávez *et al.*, 1992a y b).

La cubierta que llegó a presentar el brote de los embriones somáticos *in vitro* es otro carácter notable, las cícadas naturalmente presentan escamas llamadas brácteas que cubren a las hojas nuevas y al meristemo apical, en todas las especies de la familia encontramos una o más escamas (brácteas) por cada hoja en los embriones (Chamberlain, 1957) lo que hace pensar que lo mismo sucede *in vitro* y que dicha cubierta podría ser una escama, Chávez *et al.* (1992a) describieron una estructura que cubría el ápice de los embriones y con todas las reservas del caso la detallan como una estructura semejante a un coleoptilo. En los embriones más desarrollados que fueron observados, una de las estructuras que los caracterizan son estas brácteas que cubren al meristemo, las cuales dan paso a las hojas y sin embargo éstas no emergieron, posiblemente porque las condiciones de incubación inhibieron su desarrollo con la participación de los componentes del medio nutritivo y/o las condiciones fisiológicas de los embriones. Esta falta de respuesta no es particular para esta especie, en trabajos sobre embriogénesis somática en angiospermas y gimnospermas se hace mención de las deformaciones que se presentan y sobre todo lo poco frecuente que es el desarrollo del brote (Nickle y Young, 1993; von Arnold *et al.*, 1996; Whune y Yeung, 1996)

En principio lo anterior contribuye a conocer un poco más sobre aspectos morfológicos de la embriología de *C. hildae* y quizás de todas las cícadas y de ahí profundizar en el conocimiento de su germinación. Pues se confirma el patrón general de distintas etapas descritas por von Arnold y Hakman (1988) al cual también se apegan las descripciones de Norstog (1965), Norstog y Rhamstine (1967).

De acuerdo a los datos de las tablas 10 a la 18, se puede decir que los mejores resultados en general se obtuvieron en las dos primeras etapas de desarrollo y que tales resultados fueron promovidos por los tratamientos de ABA aplicados, es decir los embriones en las fases 1 y 2, mantuvieron su crecimiento y presentaron una menor oxidación o ésta no ocurrió, además, esto se vió reflejado en el análisis de varianza (ANOVA) realizado con el paquete estadístico statgraphics ver. 2.1, con un nivel de significancia del 0.05 %, este análisis indicó que sólo en los cultivos de "callo" embriogénico (en medio basal con pretratamiento por 45 días con ABA y los cultivos pretratados por 30 y 45 días con ABA cultivados en medio al 50%) se presentan diferencias significativas promovidas por los tratamientos es decir, mayor desarrollo, en tanto que para el resto de los cultivos ("callo" embriogénico con 45 días en ABA y medio basal, los embriones

precotiledonares, embriones cotiledonares y los embriones en germinación) no se encontraron diferencias significativas, no obstante que se ha reportado que el ABA normaliza el desarrollo de los embriones somáticos y aumenta la conversión a etapas más avanzadas, también se ha reportado que no todos los embriones ni todas las etapas responden favorablemente a la fitohormona (von Arnold y Hakman, 1988; Nickle y Yeung, 1993; von Arnold *et al.*, 1996).

Los tratamientos señalados para los cultivos de "callo" embriogénico, tuvieron un efecto promotor del crecimiento, con base en la prueba de Tukey los mejores resultados en general se presentaron en los lotes pretratados con ABA por 45 días, siendo el óptimo el cultivado en medio Litz basal y en particular el medio adicionado con 30 μM de ABA, que tuvo una diferencia estadísticamente significativa con todas las demás; también existieron diferencias significativas de los tratamiento 10 μM y 20 μM con el testigo (Tabla 19), von Arnold y Hakman (1988) sugirieron que los mejores resultados los obtuvieron en medio LP al 50 % y aunque a diferencia de ellos aquí se trabajó con medio Litz también la mayor respuesta se tuvo en los medios al 50 %.

Parte de lo anterior se observa en las figuras 6, 7, 8 y 9, éstas muestran los datos del último mes de respuesta de las tablas 10 a la 13 en gráficas, en la primer figura no se observa ninguna diferencia entre los tratamientos; en la figura 7, para el "callo" embriogénico tratado con 30 μM resulta notorio el crecimiento mucho mayor, en tanto que los cultivos tratados con 10 μM no presentaron un crecimiento tan significativo, en el análisis de rango múltiple de la tabla 19a se observa que estos dos tratamientos tienen una diferencia estadísticamente significativa con el tratamiento testigo; la figura 8 muestra que los mejores tratamientos fueron el de 20 μM el cual promovió tallas mayores y difiere estadísticamente de los demás tratamientos excepto del 5 μM ; en la figura 9 los tratamientos con ABA 20 y 10 μM fueron los que más promovieron el crecimiento y estadísticamente difieren de los otros (Tabla 19c) siendo el óptimo a 20 μM de ABA.

Los embriones precotiledonares crecieron en todos los tratamientos, pero fué mayor en los tratamiento con 0, 1 y 20 μM de ABA, como lo muestra la figura 10, para este caso y para las fases 3 y 4 no se realizó la prueba de Tukey para buscar grupos homogéneos, debido a que como ya se dijo no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Los datos de las fases 3 y 4 no se presentan graficados pues representan casi una constante. Estos cultivos no respondieron positivamente a los tratamientos y no crecieron principalmente por los problemas de oxidación que fueron recurrentes a lo largo del experimento, los embriones iniciales se oxidaron, de algunos proliferaron nuevos embriones somáticos, los cuales sufrían este mismo proceso, a pesar de que el medio Litz está suplementado con Ác. ascórbico, éste no eliminó

la oxidación, este ácido está catalogado como termolábil por Sigma (1990) pero a pesar de eso se le adicionó al medio antes de ser autoclaveado ya que Elmore *et al.*, 1996 (citado por Bonga y von Anderkas, 1992) citan que algunos productos de su rompimiento pueden actuar también como agentes antioxidantes.

Se sabe que el ABA incrementa rápidamente sus niveles endógenos cuando las plantas son expuestas a alguna condición inductora de estrés (inanición, inundación, heridas y sequía) así mismo se sabe que el ABA es precursor de dos compuestos con actividad oxidativa (ác. fáséico y el ácido dihidrofáséico) los cuales incrementan sus niveles en condiciones de estrés (Moore, 1989) además de presentar efecto en la acumulación de taninos (Robbins *et al.*, 1996), esto puede explicar el comportamiento de los explantes. Los de mayor tamaño y más consolidados como lo son los embriones fase 3 y 4, al presentar cortes en sus estructuras, rápidamente verían incrementados sus niveles de compuestos oxidativos, con la consiguiente oxidación y muerte de los mismos.

Una explicación de la poca respuesta se podría encontrar en las diferentes concentraciones del ABA que se utilizaron, sin embargo von Arnold *et al.* (1996) demostró para *Picea abies* que el tratamiento óptimo de ABA se encontró en un rango de 16 a 60 μM por 1 a 3 meses, dependiendo de la línea celular que utilizaron, nuestro intervalo es de 1 a 30 μM y la duración está en 1 a 1.5 meses, por lo que podemos decir que las concentraciones y el tiempo, están entre los utilizados comúnmente para otras gimnospermas.

Uno de los factores para tratar de reducir la hiperhidratación es el gelificante del medio de cultivo, en principio se utilizaron 8.5 g/l de agar como indican Chávez *et al.* (1992 a y b) y Litz *et al.* (1995) pero al presentarse problemas de hiperhidratación se optó por incrementarlo a 9 g/l, esto dió buen resultado evitando la hiperhidratación en un porcentaje alto y hubo una definición en la morfología de los embriones, la menor liberación de agua por el medio de cultivo y una atmósfera menos húmeda (más seca) dentro de los frascos de cultivo pareció favorecer la maduración de los embriones somáticos para pasar de una etapa a la siguiente.

Los cultivos embriogénicos de *Ceratozamia hildae* tienen el potencial de desarrollarse hasta el estado cuatro en medio Litz al 100 % sin reguladores de crecimiento, sin embargo este desarrollo es demasiado lento y heterogéneo, la investigación debe tender a optimizar el medio de cultivo para una proliferación rápida, eliminando la oxidación y la hiperhidratación, para esto se tendrán que realizar más ensayos con ABA tomando en cuenta la concentración del ABA y el tiempo de exposición, ya que esto es crítico para un alto rendimiento (von Arnold y Hakman, 1988).

BIBLIOGRAFÍA

- Amirato, P. V. 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter. No 57:2-16.
- Attree, S. M. and L. C. Fowke. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 35: 1-35.
- Berthouly, M. and N. M. Michaux-Ferriere. 1996. High frequency of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 44:169-179.
- Bonga, J. M. and P. von Anderkas. 1992. *In Vitro Culture of Trees*. Kluwer academic publishers. Netherlands. 236 p
- Chamberlain, C. J. 1957. *Gymnosperms structure and evolution*. University of Chicago Press, Chicago. Illinois. 165 p.
- Chávez, V. M., R. E. Litz and K. Norstog. 1992 a. *In vitro* morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 30:93-98.
- Chávez, V. M., R. E. Litz and K. Norstog. 1992 b. Somatic embryogenesis from leaf callus of mature plant of the gymnosperm *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Cycadales). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28:59-63.
- Chávez, V. M., R. E. Litz and K. Norstog. 1992 c. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 30:99-105.
- Chávez, V. M. 1993. Embriogénesis somática a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis de Doctorado en Ciencias. Fac. Ciencias. Univ. Nac. Autón. México. 148 p.
- Chávez et al., sometido a revisión. *Plant Cell Reports*.

Chee, P. P. 1992. Initiation and Maturation of Somatic Embryos of Squash (*Cucurbita pepo*). HortScience. 27(1):59-60.

CITES. 1995. Apéndices I, II y III to the convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. U.S. Fish & Wildlife Service, Washington, D. C.

Cronquist, A. 1987. Division Pinophyta: Gimnospermas. pp. 369-409. In Cronquist (Ed.) Introducción a la Botánica. Cia. Editorial Continental. México D.F.

Debergh, P., J. Aitken-Christie, D. Cohen, B. Grout, S. von Arnold, R. Zimmerman and M. Ziv. 1992. Reconsideration of the term "vitrication" as used in micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 30:135-140.

Emons, A. M. C., A. Samallo-Droppers and C. van der Toorn. 1993. The influence of sucrose, manitol, L-proline, abscisic acid and gibberellic acid on the maturation of somatic embryos of *Zea mays* L. from suspension cultures. J. Plant Physiol. 142: 597-604.

Fernández, H., A. M. Bertrand and R. Sánchez-Tames. 1996. Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* sp. *affinis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 45:93-97.

George, E. F. and P. D. Sherrington. 1994. Plant Growth Regulators. pp. 284-330. In: E. F. George, and P. D. Sherrington (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Limited. Great Britain.

Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res. 50:151-158.

Granell, A. y J. Carbonell. 1995. Las hormonas vegetales. Investigación y Ciencia. (abril):40-48.

Hsia, C. and S. S. Korban. 1996. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 44:1-6.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Jäger, A. K. and J. van Staden. 1996. Somatic embryogenesis in *Encephalartos cycadifolius*. *Plant Cell Reports*. 15:437-440.

Johnson, L. A. S. and K. L. Wilson. 1990. Cycadophytina. pp. 362-377. In: K. Kubitzki (Ed.) *The Families and genera of Vascular Plants*. Springer-Verlag, Germany.

Komai, F., and Okuse, T. Harada. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in culture of root segments of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Science*. 113:203-208.

La Rue, C. D. 1948. Regeneration in the megagametophyte of *Zamia floridana*. *Bull. Torrey Bot. Club*. 75(6): 597-603.

Ladyman, J. A. R. and B. Girard. 1992. Cucumber Somatic Embryo Development on Various Gelling Agents and Carbohydrate Sources. *HortScience*. 27(2):164-165.

Landry, G. P. and M. C. Wilson. 1979. A new species of *Ceratozamia* (Cycadaceae) from San Luis Potosi. *Brittonia*. 31(3):422-424.

Laurain, D., J. C. Chénieux and J. Trémouillaux-Guiller. 1996. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Ginkgo biloba*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 44:19-24.

Li, J. and E. A. Grabau. 1996. Comparison of somatic embryogenesis and embryo conversion in commercial soybean cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 44: 87-89.

Litz, R. E., P. A. Moon and V. M. Chávez. 1995. Somatic embryogenesis from leaf callus derived from mature trees of the cycad *Ceratozamia hildae* (Gymnospermae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 40:25-31.

Moore, T. C. 1989. *Biochemistry and physiology of plant hormones*. 2a Ed. Springer-Verlag, N. Y. 329 p.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15:473-497.

Nickle, T. C. and E. C. Yeung. 1993. Failure to establish a functional shoot meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryos of *Daucus carota* (Apiaceae). *American Journal of Botany*. 80(11):1284-1291.

Norstog, K. 1965. Induction of apogamy in megagametophytes of *Zamia integrifolia*. *Amer. Jour. Bot.* 52(10): 993-999.

Norstog, K. and E. Rhamstine. 1967. Isolation and culture of haploid and diploid cycad tissues. *Phytomorphology*. 17:374-381.

Ortiz-Montiel, J. G. y R. Alcántara. 1997. Propagación *in vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coulter). *Cact. Suc. Mex.* XLII. 3-6.

Osborne, R. and J. van Staden. 1987. *In Vitro* Regeneration of *Stangeria eriopus*. *HortScience*. 22(6):1326.

Osborne, R. 1995. The world cycad census and a proposed revision of the threatened species status for cycad taxa. *Biological Conservation*. 71:1-12.

Reinert, J. 1958. Morphogenese und die induktion von adventiveembryonen and gewebekulturen aus karotten. *Planta*. 58:318-333.

Řihová, L. and J. Tupý. 1996. Influence of 2,4-D and lactose on pollen embryogenesis in anther culture of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 45: 269-272.

Rinaldi, L. M. R. and A. R. Leva. 1995. *In vitro* organogenesis from diploid tissues of cycas *revoluta* Thumb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 43: 37-41.

Roberts A. V. and D. Matthews. 1995. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 40:191-193.

Robbins, M. P., T. E. Evans and P. Morris. 1996. The effect of plant growth regulators on growth, morphology and condensed tannin accumulation in transformed root cultures of *Lotus corniculatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 44:219-227.

Rodriguez-Garay, B., A. Gutiérrez-Mora and B. Acosta-Dueñas. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 46: 85-87.

Scagel, R. F., R. J. Bandoni, J. R. Maze, G. E. Rouse, W. B. Schofield y J. R. Stein. 1984. El Reino Vegetal. Omega. Barcelona. 778 p.

Sigma. 1990. Sigma Cell Culture Reagents. 1990. Catalog/Price list sigma. Chemical Company St. Louis.

Sedesol, 1993. Norma Oficial Mexicana Nom-Pa-Crn-001/93 que determina las especies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas, raras, endémicas, amenazadas, en peligro de extinción y las sujetas a protección especial. *Diario oficial* (2-ago-1993). pp 12-33.

Singa, S. 1982. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus sp.* "Almey" and *Pyrus communis* "Seckel". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107(4):657-660.

Skirvin, R. M., M. C. Chu, M. L. Mann, H. Young, J. Sullivan, and T. Fermanian. 1986. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Reports*. 5:292-294.

Stevenson D. W., R. Osborne and J. Hendricks. 1990. A World List of Cycads. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 57:200-206.

Steward, F. C., Mapes, M. O. and Mears, K. 1958. Growth and Organized Development of Cultured Cell. *Am. J. Bot.* 45:705-708.

Stewart W. N. and Rothwell. 1993. Cycads: origins and relationships. pp. 338-349. *In*: W. N. Stewart and Rothwell (Eds.) *Paleobotany and the Evolution of Plants*. Cambridge University Press. USA, Cambridge, New York, Australia, Stanford.

- Tadera, K., H. Ginjya, R. Sawada, Y. Motani, Y. Aikawa, A. Nozaki, F. Yagi and Y. Minami. 1995. Cycasin formation in tissue culture of Japanese cycad. *Phytochemistry*. 38(5):1199-1201.
- Termignoni, R. R., P. Wang and C. Hu. 1996. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 45:129-132.
- Tulecke, W. 1957. The pollen of *Ginkgo biloba*: *in vitro* culture and tissue formation. *Am. J. Bot.* 44:602-608.
- van Altvorst, A., H. Kochorst, J. de Jong and H. J. M. Dons. 1996. Transgenic carnation plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of petal explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 169:169-173.
- van Boxtel, J. and M. Berthouty. 1996. High frequency of somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 44: 7-17.
- Vázquez-Torres, M. 1990. Algunos Datos Etnobotánicos de las Cícadas en México. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 57: 144-147.
- Veramendi, J. and L. Navarro. 1996. Influence of physical conditions of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 45: 159-164.
- 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., D. Clapham, U. Egertsdotter and L. H. Mo. 1996. Somatic embryogenesis in conifers a case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies*. *Plant Growth Regulation*. 20:3-9.

- Vovides, A. P. y J. Rees. 1980. Datos adicionales sobre *Ceratozamia hildae* Landry et Wilson. 1979 (Zamiaceae). *Biotica*. 5(1):1-4.
- Vovides, A. P. 1983. Flora de Veracruz (Zamiaceae). I.N.I.R.E.B. Xalapa, Ver. Méx. fascículo 26. 31pp.
- Vovides, A. P. y Ch. M. Peters. 1987. *Dioon edule*: la planta más antigua de México. *Ciencia y Desarrollo* No. 73 año 13:19-24.
- Vovides, A. P. 1989. Problems of endangered species conservation in Mexico: cycads an example. *Encephalartos (Journal of the cycad society of Southern Africa)*. December. No 20:29-35.
- Vovides, A. P. 1995. La colección nacional de cícadas en el Jardín Botánico "Francisco Javier Clavijero". *Amaranto*. 8(1):35-41.
- Webb, D. T. 1982. Importance of the Megagametophyte and Cotyledons for Root Growth of *Zamia floridana* DC. Embryos *in vitro*. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd.106: 37-42.
- Whune, J. and T. Minamikawa. 1996. Transformation and regeneration of French bean plants by the particle bombardment process. *Plant Science*. 117:131-138.
- Whune, J. and W. Young. 1996. Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of *Allium fistulosum* L. *Plant Science*. 114:215-220.
- Yao, J., J. Wu, A. P. Gleave, B. A. M. Morris. 1996. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. *Plant Science*. 113:175-183.
- Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. pp 45-90. *In: P. C. Debergh and R. H. Zimmerman (Eds.) Micropropagation* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.