

00345
11
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"Aspectos de la Biología reproductiva de
Manihot walkerae Croizat (Euphorbiaceae)
una especie amenazada"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA VEGETAL)
P R E S E N T A :

BIOL. JOSE GONZALO RICARDO WONG

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. FRANCISCO GONZALEZ MEDRANO

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

273150



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Este trabajo forma parte de un proyecto del Instituto de Biología denominado "Las especies amenazadas del sudeste de Texas y norte de Tamaulipas", fue realizado en el Laboratorio del Desarrollo en Plantas (antes Citología) de la Facultad de Ciencias, UNAM y fue apoyado por la beca No 84306 del CONACyT.

Agradezco a cada uno de los integrantes del jurado Dra. Alma Orozco Segovia, Dra. Ana Elena Mendoza Ochoa, M. en C. Francisco González Medrano, M. en C. Johannes Adrianus Maria Verhulst Robben, Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Margarita Collazo Ortega y Dra. Sonia Vázquez Santana por el tiempo que dedicaron en la revisión de este trabajo, sus comentarios fueron muy valiosos para mejorarlo y seguir aprendiendo hasta el final.

En especial al Profe Medrano y a la maestra Judith.

Al Biólogo Homer Alfredo Gamboa Romero del Laboratorio de Microcine, por la toma y ampliación de las fotografías con las que se ilustra este trabajo(y por su amistad).

Agradezco a todos mis compañeros del Laboratorio del Desarrollo en Plantas (antes Citología) por todos los momentos compartidos.

En un trabajo de tesis hay muchas personas involucradas, directa e indirectamente, a todas ellas les agradezco por todos los comentarios e ideas que me dieron, no las menciono por temor a dejar a alguien fuera de la lista lo cual seria injusto.

INDICE

I	Resumen	1
II	Introducción	3
III	Antecedentes	8
IV	Objetivos	10
V	Método	11
	Trabajo de campo	
	1. Descripción de las localidades	11
	2. Colecta del material biológico	11
	3. Fijación del material colectado	11
	Trabajo de laboratorio	
	1 Inclusión	12
	2 Tinción doble safranina-verde rápido en metilcelosolve	12
	3 Inclusión en JB ₄	13
	4 Pruebas histoquímicas	13
	5 Microscopía de luz	14
	6 Microscopía electrónica de barrido	15
	7 Fotomicroscopía	15
	8 Pruebas de germinación	15
VI	Resultados y discusión	19
	1. Descripción de las localidades	21
	2. Ubicación de las flores en la planta	25
	3. Morfología de las flores masculinas	25
	4. Desarrollo del androceo	26
	5. Morfología de la flor femenina	31
	6. Desarrollo del gineceo	31
	7. Morfología y desarrollo de la flor hermafrodita	36
	8. Desarrollo de la semilla	37
	9. Desarrollo de carúncula	44
	10. Papel de la carúncula en la posible dispersión de las semillas	44
	11. Colecta de las semillas y observaciones de campo	47
	12. Pruebas preliminares de germinación	48
	13. Análisis de varianza para las pruebas de germinación	49
VII	Conclusiones	52
VIII	Bibliografía	54

INDICE DE LÁMINAS

Lámina I	28
Lámina II	30
Lámina III	35
Lámina IV	41
Lámina V	43

I. RESUMEN

Manihot walkerae Croizat (Euphorbiaceae) es una especie endémica del sureste de Texas y noreste de Tamaulipas, considerada en peligro de extinción tanto en Estados Unidos como en México. Esta especie es pariente silvestre de *Manihot esculenta* Cranz, planta de gran importancia económica, que se utiliza como alimento en casi todas las regiones tropicales del mundo.

En este trabajo se estudiaron algunos aspectos de la biología reproductora de *Manihot walkerae* tanto en el campo como en el laboratorio. Se describió por primera vez la presencia de flores hermafroditas en la especie, se registró la proporción de flores masculinas, femeninas y hermafroditas por planta, se estudio el desarrollo de las flores masculinas, femeninas y hermafroditas y el desarrollo de la semilla. Se hicieron pruebas histoquímicas para conocer el contenido de la carúncula de la semilla, así como pruebas de germinación en laboratorio para conocer algunos de los factores que intervienen en este proceso.

Manihot walkerae está reportada como una especie monoica con flores estaminadas, localizadas en un racimo subespigado terminal. En promedio posee 62 flores masculinas por planta, las flores femeninas se ubican muy cercanas a la base de la inflorescencia masculina y son en promedio 2.5 por planta. En las poblaciones silvestres de esta especie se detectó un tercer morfo floral, el hermafrodita. Estas flores se encuentran en la misma posición que las flores femeninas, sus dimensiones son similares a éstas pero presentan de 1 a 5 estambres que contienen granos de polen morfológicamente bien formados e iguales a los de las flores estaminadas, y son en promedio 2.5 flores por planta, que sumadas a las femeninas dan 5 flores promedio por planta. Las flores masculinas abren después que las femeninas y liberan granos de polen tricelulares que tienen una gran cantidad de almidón como material de reserva y son normales morfológicamente. Las flores femeninas poseen un ovario tricarpelar y trilobular con 1 óvulo por lóculo. El óvulo es bitégmico con un pico nucelar que se extiende hasta hacer contacto con el obturador. En etapa de flor en anthesis, estos tejidos presentan gran cantidad de almidón.

La semillas se desarrollan tanto en las flores femeninas como en las hermafroditas formándose alrededor de 15 semillas por planta. La semilla madura tiene una carúncula que se origina por proliferación celular del tegumento externo en la zona funicular, esta

carúncula es rica en aceites, lo que sugiere una dispersión biótica, posiblemente por hormigas.

El porcentaje de germinación de las semillas en condiciones de laboratorio fue de 66 %, a una temperatura de 30 °C siempre y cuando se elimine la carúncula y se escarifique esa zona. Durante cuatro años de trabajo de campo no se observaron plántulas, lo que sugiere que la especie puede propagarse vegetativamente y/o que las semillas pasan a formar parte del banco en el suelo, o que éstas son en su mayoría depredadas.

Las plantas que se cultivaron en condiciones de laboratorio presentaron un crecimiento muy pobre y un desarrollo atípico de las estructuras reproductoras.

II. INTRODUCCIÓN

Es indudable la gran importancia que tuvo la agricultura para el desarrollo de las poblaciones humanas tanto en el viejo como en el nuevo mundo (Baker, 1968; Viola y Margolis, 1991; Casas y Caballero 1995).

Con la llegada de Cristóbal Colón a América hubo un gran intercambio de plantas cultivadas entre ambos continentes. Algunas plantas americanas que enriquecieron la agricultura y la alimentación en Europa, África y Asia fueron el maíz, la papa dulce (camote), el tomate, el cacahuete, la yuca, el cacao y la papa, así como variedades de pimientos, frijoles y calabazas (Mc Neill: en Viola y Margolis, 1991).

La importancia de algunas plantas americanas cultivadas es evidente si en la actualidad imaginamos a los italianos sin tomates, a los chinos sin papa dulce (camotes), a los africanos sin maíz y a los irlandeses, alemanes y rusos sin papas para comer.

Actualmente la agricultura sigue siendo una de las actividades más importantes en el mundo, pero el cultivo de las plantas a través de los siglos se ha dado por métodos de selección artificial, dando como resultado cultivos que proporcionan un mayor abastecimiento alimenticio, pero al mismo tiempo ha creado un problema, que estas plantas llamadas domesticadas, pierden su capacidad para competir en condiciones naturales por lo cual su sobrevivencia depende de los campesinos (Hoyt, 1992). Esto se debe a que las plantas domesticadas han sido tan modificadas que han perdido su diversidad genética, lo cual las hace más susceptibles a enfermedades y a fenómenos ambientales. Es por esta razón que son tan deseables las variedades agronómicas (cultivares) de las especies cultivadas, ya que tienen características genéticas que pueden beneficiar a éstas últimas. Las especies silvestres, que son parientes de las especies cultivadas son también de gran importancia, ya que, estos “parientes silvestres” han evolucionado y se han adaptado para

sobrevivir a sequías, inundaciones, variaciones extremas de temperatura y frecuentemente han desarrollado resistencia a estos factores, así como a plagas y a enfermedades que causan grandes pérdidas en las especies cultivadas, de aquí que las especies silvestres sean de tanto valor para el mejoramiento de los cultivares.

El principal problema que las especies silvestres enfrentan, es el peligro de desaparición debido a la modificación o destrucción de sus hábitats. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y el Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF) han calculado que por lo menos 60,000 especies de plantas podrían desaparecer para la mitad del próximo siglo si la destrucción de la naturaleza continúa al ritmo actual y de éstas, no se sabe cuantas son parientes silvestres de las plantas cultivadas, es por eso que la conservación de estos recursos naturales (incluyendo a las plantas cultivadas) es hoy en día uno de los retos más importantes para la humanidad (Hoyt, 1992).

La destrucción de los recursos naturales y la desaparición de muchas especies que esta actividad conlleva, ha hecho que algunos autores establezcan categorías de riesgo de que una especie pueda desaparecer, por ejemplo, Mace y Lande (1991) proponen tres categorías:

- a) CRÍTICA.
- b) EN PELIGRO.
- c) VULNERABLES.

Estas categorías están basadas en términos de la probabilidad de extinción dentro de un periodo de tiempo específico.

La Unión Internacional para la conservación de la naturaleza (UICN) ([/especies/plants/categories.html](#), 1997) maneja 6 categorías:

- a) EXTINTAS (Ex).
- b) EXTINTAS / EN PELIGRO DE EXTINCIÓN (Ex/E).
- c) EN PELIGRO DE EXTINCIÓN (E).
- d) VULNERABLE (V).
- e) RARAS (R).
- f) INDETERMINADAS (I).

basadas en criterios como:

Búsqueda de poblaciones silvestres de los taxa en localidades tipo o similares, taxa cuyo número de poblaciones o individuos ha sido reducido a un nivel crítico, factores que operan en la destrucción del hábitat o modificación del mismo, sobreexplotación de los taxa, taxa con pequeñas poblaciones y taxa sin información.

En México existe la Norma Oficial Mexicana nom-ecol-059-1994 (Diario Oficial de la Federación de fecha 16 de mayo de 1994) y establece 4 categorías:

- a) ESPECIES Y SUBESPECIES EN PELIGRO DE EXTINCIÓN.
- b) ESPECIES Y SUBESPECIES AMENAZADAS.
- c) ESPECIE Y SUBESPECIE RARA.
- d) ESPECIE Y SUBESPECIE SUJETA A PROTECCIÓN ESPECIAL.

que están basadas en:

Disminución de hábitat o poblaciones de taxa silvestres, modificación de hábitat, restricción severa de distribución y sobreexplotación.

En las últimas dos clasificaciones existe la categoría de rara, aunque muchas especies son naturalmente raras por virtud de su ecología, en la actualidad es ampliamente aceptado que

la existencia de especies raras y su desaparición, tiene un origen antropogénico (Spellerberg, 1996).

La mayoría de las especies existen de manera silvestre, y con un programa de muestreo se detecta la presencia de las especies que componen una comunidad, con ello, uno puede elaborar una lista de especies para un hábitat, o detectar la presencia de una especie rara o posiblemente amenazada, así que la conservación de los hábitats que sustentan a las comunidades biológicas ha sido una de las formas en que se ha preservado la biodiversidad (Primack, 1993).

La habilidad de que una especie persista en un área, puede ser predicha usando los métodos de la biología de poblaciones, por ejemplo, con los estudios demográficos se pueden documentar las tendencias de la población (estabilidad, crecimiento o declinación) en un sitio específico, para lo cual se podrían hacer estudios intensos, tomando medidas durante dos o tres años. Hay muchos atributos de las poblaciones que pueden ser estudiados, tales como sobrevivencia, crecimiento y producción de semillas (y/o propagación vegetativa) considerados como los elementos primarios de cualquier monitoreo demográfico (Primack, 1993; Spellerberg 1996).

De acuerdo con Primack (1993), la clave para proteger y manejar una especie rara o en peligro de desaparecer, es entender bien las relaciones de la biología de la especie con su ambiente y como estas influyen en el estatus de las poblaciones. Por ejemplo es importante saber datos sobre su morfología (forma, tamaño, color, textura), fisiología (necesidades para sobrevivir), conducta (floración, polinización, descendencia), genética, distribución, ambientes donde crece y demografía, todos estos datos conforman lo que era conocido como historia natural de una especie y que hoy se le da el nombre de autoecología.

En este trabajo se toman en cuenta varios de los puntos arriba mencionados con respecto a la especie *M. walkerae*, por ejemplo, se describe la morfología y el desarrollo de las estructuras reproductoras, se habla sobre la fenología de las poblaciones, demografía distribución y ambientes donde éstas crecen. Esta información que se aporta es conocimiento básico sobre la biología de *M. walkerae*, información que podrá servir para poder establecer un programa de conservación para la especie.

III. ANTECEDENTES

BREVE DESCRIPCIÓN

Manihot walkerae pertenece a la familia Euphorbiaceae, es una hierba perenne, decumbente, profusamente ramificada que crece aproximadamente 50 cm de largo, los tallos son delgados y las hojas alternas son profundamente pentalobuladas con el lóbulo medio de 2 a 5 cm de largo. Las flores son blancas, algo carnosas, de 5 a 10 mm de largo. El fruto es una cápsula tripartida globular de aproximadamente 1 cm de diámetro, cada fruto produce tres semillas. En esta planta las flores masculinas se encuentran arregladas en una inflorescencia subespigada sobre un eje terminal; las flores femeninas están prácticamente libres del eje donde se encuentra la inflorescencia masculina y son basales a éste (Croizat, 1942; Correll y Marshall, 1970; Rogers y Appan, 1973).

Manihot walkerae también llamada “mandioca de walker”, fue colectada por primera vez por Schott en 1853 en el condado de Starr en Texas, pero fue mal identificada ya que se le determinó como *Manihot cartagenensis*, una especie de América tropical. Algunas colectas posteriores fueron hechas en 1888, 1940 y 1960. El material tipo lo colectó E. J. Walker en 1940 y Croizat en 1942 la reconoció como una especie nueva y la describió (Fish and wildlife service (F.W.S.), 1990). Rogers y Appan (1973) en su monografía de *Manihot*, *Manihotoides* para la Flora Neotrópica, siguen reconociendo a la especie como válida.

La importancia de *Manihot walkerae* radica en que es un pariente silvestre de la especie cultivada *Manihot esculenta* (cassava, yuca o guacamote), planta de gran importancia alimenticia y económica en casi todas las regiones tropicales del mundo (Rogers y Appan, 1973). Se han hecho intentos de hibridizar especies silvestres de *Manihot* con “yuca” (Nassar, 1980). En la Universidad de Maryland, en Estados Unidos, Robert Bertram

(U.S.F.W.S., 1993) ha logrado hibridizar estas dos especies y menciona que la “mandioca de walker” puede aportar genes a *M. esculenta* que le den resistencia a sequías, a suelos salinos y a varias enfermedades, y agrega que podría ser uno de los pocos miembros del género (casi enteramente tropical-subtropical) que posea genes para la resistencia al frío.

Se han hecho varios intentos sin éxito para localizar poblaciones de *M. walkerae* en sitios previamente conocidos y en la vecindad de éstos en Texas (U.S.F.W.S., 1990). Actualmente, se reportó en Estados Unidos una “población” en el condado de Starr la cual cuenta con 1 (un) sólo individuo que vive en condiciones naturales. De las poblaciones transplantadas a la Universidad de Texas en Austin y al Jardín Botánico de San Antonio en Texas, al parecer sólo existe en el primer sitio (Cristobal Best, comunicación personal). En 1990 la agencia de pesca y vida silvestre (USFWS) de Estados Unidos propone que *M. walkerae* sea considerada como una especie en peligro de extinción, con nivel de máxima prioridad (USFWS, 1990).

En México, previo a este trabajo se han localizado tres nuevas poblaciones en el estado de Tamaulipas.

En resumen, dado que *M. walkerae* es una especie endémica del Noreste de Tamaulipas (México) y sureste de Texas (Estados Unidos), que es considerada como en peligro de extinción por éste último país y además que es un pariente silvestre de la especie *M. esculenta*, planta de gran importancia agrícola y económica en distintos países tropicales del mundo y que puede aportar genes para mejorar el cultivo de esta última, resulta evidente la importancia de hacer diversos estudios en *M. walkerae*.

En el presente trabajo se establecieron los siguientes objetivos:

IV. OBJETIVO GENERAL

Conocer algunos aspectos de la biología reproductora de *Manihot walkerae* especie considerada en peligro de extinción, con el propósito de aportar conocimientos básicos sobre el desarrollo y la función de las estructuras reproductoras de la especie y de su unidad de dispersión.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Hacer una descripción del habitat donde se encuentra *Manihot walkerae*.
2. Realizar observaciones de campo para conocer algunos aspectos del ciclo de vida de la especie.
3. Estudiar la variabilidad floral.
4. Estudiar el desarrollo (ontogenia) de los distintos tipos florales.
5. Hacer el estudio del desarrollo de la semilla desde la fecundación hasta semilla madura deshidratada (diáspora).
6. Relacionar la estructura y contenido químico de la carúncula con la dispersión y germinación de la semilla.
7. Determinar las condiciones bajo las cuales se logra la germinación de las semillas de *Manihot walkerae*.

V. MÉTODO

TRABAJO DE CAMPO.

1. DESCRIPCIÓN DE LAS LOCALIDADES.

La descripción de la vegetación se realizó con base en los criterios propuestos por Miranda y Hernández-X (1963), quienes clasifican los tipos de vegetación de México considerando su fisonomía, su estructura y su fenología. En las salidas al campo se colectaron ejemplares de las distintas especies que conforman a la comunidad, los ejemplares se identificaron y se depositaron en el Herbario Nacional de México (MEXU) de la UNAM.

Para los estudios ontogénicos se utilizaron las siguientes técnicas:

2. COLECTA DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

En el campo se colectaron botones de flores femeninas, masculinas, hermafroditas y frutos en diferentes etapas de desarrollo, este material se fijó inmediatamente después de colectarlo.

3. FIJACIÓN DEL MATERIAL COLECTADO.

Los fijadores tienen como objetivo detener el metabolismo celular, preservando los tejidos de la planta, química y estructuralmente sin cambios, esto permite analizarlos posteriormente a nivel histológico. En este trabajo el material colectado se fijo de dos maneras:

- 1) Botones preantesis, flores en antesis y frutos en diferentes etapas de desarrollo se fijaron en FAA (etanol 96%, formaldehído, ácido acético y agua) a temperatura ambiente.
- 2) Los botones florales más pequeños se fijaron en Glutaraldehído-paraformaldehído en amortiguador de S colidina 0.1M con pH 7.2, a una temperatura aproximada de 3 °C durante 6 horas. Posteriormente el material se enjuagó con amortiguador de colidina

0.05M con sacarosa al 0.08% y transportado al laboratorio a temperatura ambiente donde se incluyó en JB₄.

TRABAJO DE LABORATORIO.

1. INCLUSIÓN

El objetivo de la inclusión es proporcionar un soporte al tejido para evitar que éste se disgregue al momento de cortarlo.

El material fijado en FAA se incluyó en paraplast (Johansen, 1940).

Los botones florales que estaban en FAA se lavaron en agua corriente durante 1 hora, se deshidrataron en alcohol etílico a diferentes concentraciones (50, 70, 85, 96 y 100%), posteriormente se pasaron a una mezcla de alcohol-xilol 1:1 e inmediatamente después se pasaron a una mezcla de xilol-paraplast 1:1 por 24 horas para la infiltración del tejido. Finalmente los botones florales se colocaron en paraplast puro por 24 horas y después se pasaron a moldes cúbicos de plástico donde se dejaron endurecer a temperatura ambiente.

El material incluido en paraplast se cortó de 8 a 10µm de grosor en un micrótopo de rotación American Optical 820. Parte de los cortes se tiñeron con safranina-verde rápido en metilcelosolve, utilizando la otra parte de ellos para las pruebas histoquímicas.

2. TINCIÓN DOBLE CON SAFRANINA-VERDE RÁPIDO EN METILCELOSOLVE.

(Engleman comunicación personal)

La tinción con safranina-verde rápido hace más evidentes las estructuras, ayudando así a su interpretación.

Los cortes que se obtuvieron del material que se incluyó en paraplast se desparafinaron con xilol, después se pasaron a una solución de alcohol absoluto-xilol 1:1 y se hidrataron en

alcoholes etilicos graduales (100 y 96%) (3 minutos en cada uno), y posteriormente los cortes se pusieron en safranina al 1% en metilcelosolve en alcohol al 96% por 24 a 48 hrs. Después de estar en safranina, los cortes (lámina por lámina) se lavaron en agua corriente para eliminar el exceso de colorante, posteriormente se diferencia y se deshidrata el tejido simultáneamente con alcohol 96% más ácido pícrico, y después se lava con alcohol 96% más amoniaco (esto detiene la acción del ácido pícrico), se deshidrata en alcohol absoluto para después contrastar con verde rápido en metilcelosolve, se lava en aceite de clavo para sacar el exceso de verde rápido y se aclara con una mezcla de aceite de clavo, alcohol absoluto y xilol, por último se aclara más con lavados de xilol y se montan las laminillas con bálsamo de Canadá.

3. INCLUSIÓN EN JB₄ (Chi y Smutler)

La inclusión en JB₄ permite hacer cortes delgados de hasta 0.5 μm , con lo cual se obtiene un mejor detalle de las estructuras, por esta razón, los botones florales más pequeños se incluyeron en JB₄ para lo cual, se deshidrataron en acetonas graduales y se infiltraron (preinclusión) en una mezcla del componente A del JB₄ más el catalizador por 24 horas. Posteriormente se incluyó en JB₄ con catalizador y endurecedor en ausencia de oxígeno. Al material incluido de la manera anterior se le hicieron cortes de 2 a 3 μm de grosor con navajas de vidrio en un ultramicrotomo Sorvall MT2-B y se tñieron con azul de toluidina.

4. PRUEBAS HISTOQUÍMICAS

Los cortes que se utilizaron para pruebas histoquímicas fueron de dos tipos:

1. Los incluidos previamente en paraplast, los cuales se desparafinaron y

2. Los cortes hechos en fresco en un crióstato a una temperatura de -20°C .

Estos últimos se hicieron a carúnculas de semillas colectadas en el campo.

Con las distintas pruebas realizadas se evidenció la naturaleza química de los diferentes tejidos. Las pruebas histoquímicas utilizadas fueron:

a) AZUL NEGRO DE NAFTOL (ANN) + ÁCIDO PERYÓDICO + REACTIVO DE SCHIFF (APS). (E. M. Engleman comunicación personal)

Evidencia los polisacáridos insolubles del endospermo (rosa intenso) y los cuerpos proteicos (azul).

b) ROJO O DE ACEITE. (E. M. Engleman comunicación personal)

Tiñe de rojo cutícula y grasas.

c) YODO-YODURO DE POTASIO I_2KI (Iugol) (Johansen, 1940)

Tiñe de café obscuro el almidón.

d) PERMANGANATO DE POTASIO (KmnO_4). (E. M. Engleman comunicación personal)

Tiñe de color pardo obscuro los taninos y otros compuestos susceptibles de oxidación.

e) AZUL DE NILO (Curtis, 1986)

Las grasas, aceites y ceras se tiñen de rojo y los ácidos grasos libres y los fosfolípidos de azul.

f) FLOROGLUCINA (D'Ambrogio, 1986)

Tiñe de rojo las paredes celulares lignificadas.

5. MICROSCOPIA DE LUZ

Las laminillas obtenidas tanto de los cortes hechos en paraplast, como en JB₄ se observaron por medio de microscopía de luz.

6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Algunas muestras fijadas en FAA se deshidrataron en acetonas graduales, se desecaron a punto crítico, se pegaron en un portamuestras y se recubrieron de oro para su observación en un microscopio electrónico de barrido Hitachi, modelo S-2460N.

7. FOTOMICROSCOPIA

Una vez seleccionados los cortes se fotografiaron para ilustrar el desarrollo de las estructuras reproductoras masculinas, femeninas, el desarrollo de la semilla y el de la carúncula.

8. PRUEBAS DE GERMINACION

Se colectaron frutos maduros de la población de *M. walkerae* que se desarrolla en el terreno con cultivo de maíz en el Municipio de Abasolo, se transportaron al laboratorio de Citología de la Facultad de Ciencias, UNAM, y se dejaron secar al ambiente sobre papel periódico. Las semillas maduras y deshidratadas se pusieron en un cristizador con agua, se agitaron y se observó que algunas de ellas se precipitaban y otras permanecían flotando. Las pruebas de germinación se realizaron con ambos grupos de semillas, aunque no se esperaba que las semillas que flotaron germinaran, pues es sabido que las semillas que flotan en ocasiones lo hacen por la ausencia de embriones o alguna otra anomalía en su desarrollo. A las semillas se les eliminó la carúncula y se les escarificó en esa zona con papel lija del número cero.

Los factores considerados para las pruebas de germinación fueron 2:

1) Condición de la semilla con dos niveles:

- Semillas hundidas y

Semillas flotantes.

2) Temperatura con dos niveles:

- T. constante.
- T. fluctuante.

La combinación de los distintos niveles de los factores dio por resultado 4 tratamientos de germinación, la cual se evaluó cada tercer día durante 18 días (Cuadro 1.).

El análisis de los resultados se hizo usando el método del análisis de la varianza (ANDEVA), para lo cual fue necesario hacer una transformación arcsénica a los datos (Steel y Torrie, 1988).

Cuadro 1. Tratamientos aplicados en las pruebas de germinación.

FACTOR	NIVEL 1	NIVEL 2
	SEMS. HUNDIDAS	SEMS. FLOTANTES
TEMP. CONSTANTE	TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2
30 °C	SEMS. HUND A 30 °C	SEMS. FLOT A 30 °C
TEMP. FLUCTUANTE	TRATAMIENTO 3	TRATAMIENTO 4
15-25 °C	SEMS. HUND A 15-25 °C	SEMS. FLOT A 15-25 °C

DISEÑO ESTADÍSTICO

Para las semillas de *Manihot walkerae* (hundidas y flotantes) sometidas a los tratamientos de germinación, cuya respuesta se evaluó cada tercer día durante 18 días, se utilizó un modelo con dos criterios de clasificación (condición física de la semilla y temperatura) con interacción.

Para ello se propuso emplear el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Con $r = 1, 2, 3 \dots 6$

r = repeticiones

en donde:

Y_{ijk} es la variable de respuesta y representa el porcentaje de semillas germinadas, registrado en el i -ésimo día después de ponerlo a germinar, sometido al j -ésimo tratamiento de condición o temperatura en la k -ésima repetición.

μ representa la media general.

α_i representa el efecto producido en el i -ésimo día sobre la variable de respuesta.

β_j represent el efecto producido por el j -ésimo tratamiento en la variable de respuesta.

$(\alpha\beta)_{ij}$, representa el efecto conjunto del i -ésimo día y el j -ésimo tratamiento en la variable de respuesta.

ε_{ijk} es el factor de variabilidad asociado a las condiciones no controladas del experimento, el cual se considera con distribución normal e independiente, con media de cero y varianza constante.

El análisis de este modelo consiste en establecer como primer paso, la significancia del término interacción de los factores condición de semillas (hundidas/flotantes) y temperatura (constante/fluctuante) para lo cual se proponen las siguientes hipótesis:

H_0 . No existe interacción de los factores, condición de la semilla y temperatura que influya sobre el porcentaje de germinación.

H_a . Existe interacción de los factores, condición de la semilla y temperatura que influye en el porcentaje de germinación.

En caso de rechazar H_0 se prosigue a analizar las medias del porcentaje de germinación como resultado de la suma de los factores condición de semilla-temperatura por medio del análisis de contrastes ortogonales.

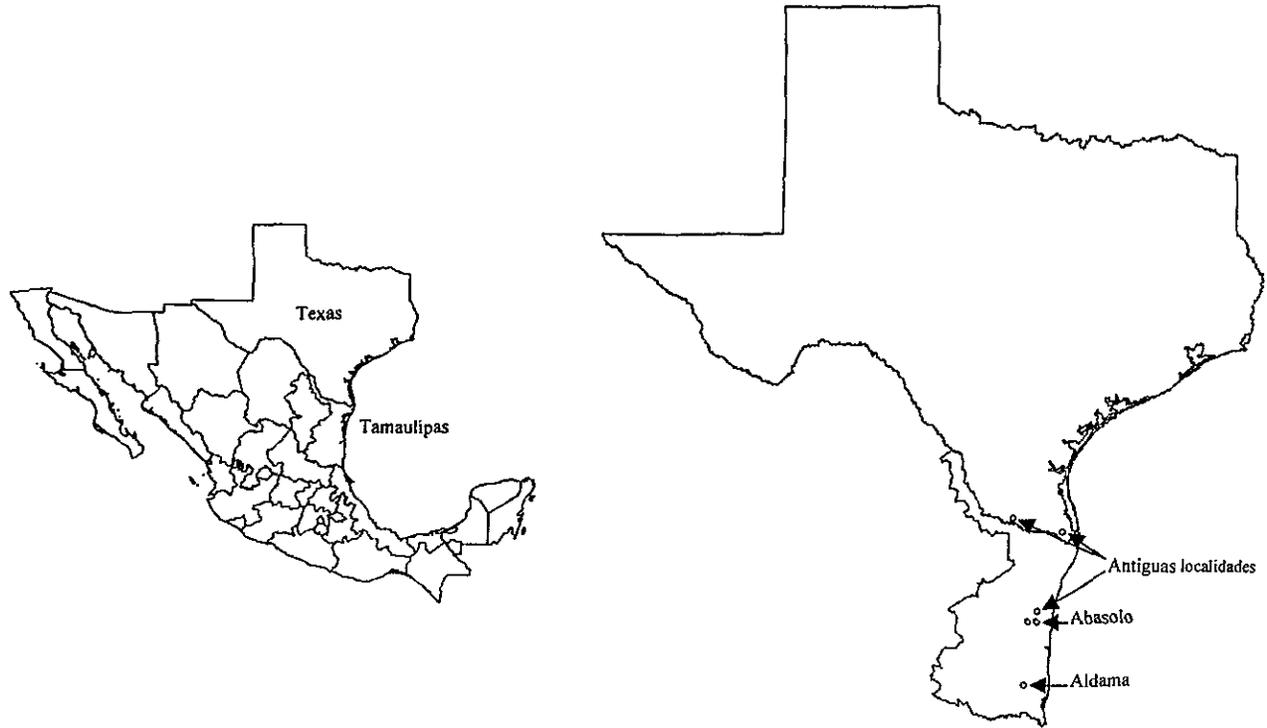
En caso de aceptar H_0 , en la misma tabla de ANDEVA se podrá establecer por separado la significancia de los efectos de los factores bajo estudio. Si se detectan efectos significativos de un factor, se aplicará la prueba de la diferencia honesta significativa de Tukey, con la finalidad de establecer cuales son los niveles que causan las diferencias.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan a continuación corresponden al trabajo realizado durante el período comprendido de julio de 1992 hasta diciembre de 1996. De julio de 1992 a octubre de 1994 se realizaron visitas a las poblaciones cada dos meses y posteriormente cada tres o cuatro meses. Las observaciones que se hicieron en campo fueron:

- a) Determinación de los tipos de vegetación (de acuerdo a Miranda y Hernandez-X), en los cuales crece la especie, para lo cual se hicieron ejemplares de herbario para ver la composición florística de éstos.
- b) Fenología de las poblaciones, para ubicar las épocas en las cuales las plantas presentaban hojas, flores, frutos y semillas.
- c) Búsqueda de plántulas que evidenciaran la propagación y germinación de las semillas.

Las observaciones se hicieron en 3 poblaciones de *Manihot walkerae* que se encuentran en el estado de Tamaulipas: una de estas poblaciones se encuentra en el municipio de Aldama y está constituida aproximadamente por 100 individuos, las otras 2 poblaciones se localizan en el municipio de Abasolo, una de ellas tiene 100 individuos aproximadamente y crece en un terreno de cultivo, la otra está formada por más o menos 150 individuos y se desarrolla en un pastizal (mapa 1), estas dos poblaciones se encuentran a unos 8 km una de la otra. En las visitas que se realizaron se hicieron observaciones sobre el ciclo de vida de las tres poblaciones.



Mapa 1. Mapa de la República Mexicana y Texas ubicando los lugares en donde crecía la especie *Manihot walkerae* y las nuevas localidades en Tamaulipas.

1. DESCRIPCION DE LAS LOCALIDADES.

1) La población de Aldama (P1) se desarrolla en un tipo de vegetación denominado selva baja caducifolia (que corresponde al bosque tropical caducifolio según la clasificación de Rzedowski (1978)). Esta se caracteriza porque los árboles pierden casi todas sus hojas en la época de secas y su altura media es menor a los 15 m y por lo común no se encuentran especies espinosas. Se encuentran en climas semisecos con temperatura media anual entre los 20 y los 29 ° C, con precipitación media anual de 500 a 1,200 mm y a una altura entre los 0 a 1,900 m.s.n.m. (Miranda y Hernandez-X., 1963).

La comunidad de la cual forma parte *M. walkerae* se establece en las estribaciones sureste de la sierra de Tamaulipas a una altura de 220 m.s.n.m., sobre un sustrato rocoso de origen sedimentario con suelos someros y considerados como ricos en materia orgánica (Martínez-Ojeda y González, 1977); la precipitación media anual es de 628 mm y la temperatura media anual de 23.5 °C, que corresponde a un clima Aw de acuerdo con la clasificación de Köppen modificado por Garcia (1964). Esta localidad tiene algunas zonas todavía conservadas, pero la mayor parte está perturbada, lo que permite el desplazamiento de la selva baja caducifolia por un matorral en el cual se encuentra *M. walkerae*. En los manchones conservados de selva el estrato arbóreo es de aproximadamente 12 m de altura, casi el total de las especies dominantes pierden las hojas durante la época seca que va desde noviembre a mayo. Algunas de las especies más representativas que forman parte de este estrato son:

Brosimum alicastrum, *Phoebe tampicensis*, *Bursera simaruba*, *Sapindus saponaria*,
Bumelia laetevirens, *Beaucarnea inermis*, *Ficus padifolia*, *Mirandaceltis monoica*,
Pithecellobium berlandieri, *Lysiloma divaricata*, *Lysiloma acapulcensis*.

El estrato arbustivo en este lugar esta representado por especies como:

Coursetia caribaea, *Sapium appendiculatum*, *Acacia coulteri*, *Sebastiania pavoniana*,
Erythrina herbacea, *Tabernaemontana alba*, *Adelia oaxacana*, *Bernardia myricaefolia*,
Mosiera ehrenbergii

Algunas de las formas biológicas interesantes que se presentan a menudo en este tipo de vegetación son las cactáceas columnares, que en esta localidad están representadas por *Cephalocereus palmeri*. El estrato herbáceo sólo está representado por *Hechtia glomerata* y *Bromelia pinguin*. Las epífitas comunes en esta selva son *Tillandsia ionantha*, *Rhipsalis baccifera* y *Selenicereus coniflorus*.

La mayor parte de la zona está perturbada lo que favorece el desarrollo de un matorral bajo en el que se encuentran especies de: *Citharexylum aff berlandieri*, *Acacia berlandieri*, *Cordia boissieri*, *Cordia pringlei*, *Croton ciliato-glandulosus*, *Croton cortesianus*, *Croton watsoni*, *Karwinskia humboldtiana*, *Eysenhardtia polystachya* y *Manihot walkerae*.

En el estrato herbáceo se encuentran: *Corchocrus* sp, *Eustoma exaltatum*, *Acalypha aff schiedeana*, *A. cf seleriana*, *Lantana camara*, *Lesquerella lasiocarpa*, *Merremia dissecta*, *Amoreuxia wrightii*, *Palafoxia texana*, *Spiranthes* sp y *Waltheria americana*.

Las causas de perturbación en este lugar se deben a la transformación de algunas áreas para cultivo, y el resto está sometido a pastoreo de ganado vacuno y últimamente de ganado caprino, causando un gran impacto sobre la vegetación, pero al parecer *M. walkerae* no es palatable para los animales. En este lugar la especie se encuentra creciendo entre los arbustos y su raíz puede desarrollarse en lugares con suelos algo profundos (20 a 30 cm), o en lugares con poco suelo y en contacto casi directo con la roca, e incluso se puede encontrar en agujeros de las rocas con muy poca tierra.

En la descripción de la especie se menciona que la planta tiene unos 50 cm de longitud, pero en esta población algunas ramas de *M. walkerae* llegaron a medir hasta 2.5 m. El

periodo de floración se observó sólo en el mes de junio de 1992, para septiembre del mismo año ya no se pudieron identificar a las plantas ya que carecían de flores y hojas. Durante los siguientes tres años sólo se observaron plantas con hojas y no se observó floración.

2) En la segunda localidad (municipio de Abasolo), una de las poblaciones (P2), se establece en un terreno de cultivo en el cual se siembra maíz y sorgo. En este lugar el suelo es arenoso y se encuentra sobre una capa de “caliche”, al extraer plantas de *M. walkerae* se observó que en algunas aproximadamente un tercio de la raíz tuberosa de la planta se encontraba creciendo a través de la capa de “caliche”.

En esta población las plantas tienen una altura entre los 10 a 20 cm y su cobertura es de unos 30X40 o 50 cm y el período de floración va de agosto a septiembre y coincide con el crecimiento de las plantas del cultivo que son maíz y sorgo. Para noviembre se observa a las plantas de *Manihot* con frutos y con las últimas flores masculinas.

La tercera población (P3) en el municipio de Abasolo se encontró a fines de 1993, ésta se desarrolla en un suelo igual al del terreno de cultivo, es decir arenoso sobre una capa de caliche, Aquí *M. walkerae* se encuentra formando parte de un pastizal con *Bouteloua*, *Cynodon dactylon* y *Setaria* sp. Este pastizal está invadido por un matorral bajo donde aparecen algunas especies como: *Acacia berlandieri*, *Neopringlia integrifolia*, *Karwinskia humboldtiana*, *Calliandra* sp, *Trichilia* sp, *Prosopis* sp, *Koeberlinia spinosa*, *Cordia boissieri*, *Croton leucophyllus*, *Macrosiphonia macrosiphon*, y *Parthenium* sp.

En esta población (P3) las plantas de *M. walkerae* tienen una altura similar a las plantas de la población P2 (10 a 20 cm), pero con menor cobertura (10X10 cm). En P3 la floración se observó en pocas plantas durante los años siguientes, cuando se observó florecer, fue en los meses de agosto a octubre y sólo se observaron flores masculinas. Aunque no se observaron

las flores femeninas, hubo presencia de frutos en las plantas (1 por planta en promedio), lo cual indica la presencia de éstas últimas.

De las tres poblaciones observadas la única que fue regular en la floración durante los 4 años fue la P2. A partir de ésta, se obtuvieron las muestras para seguir el desarrollo de flores, frutos y semillas.

2. UBICACIÓN DE LAS FLORES EN LA PLANTA

En el extremo terminal de cada rama se encuentra una inflorescencia que corresponde a un racimo subespigado que está constituido principalmente por flores masculinas. En promedio hay 62 flores por planta, aunque este número puede ser mayor ya que surgen nuevos botones florales durante toda la época de floración. Hacia la base de la inflorescencia masculina se encuentran las flores pistiladas, en promedio de 2.5 flores por planta.

La descripción de *Manihot walkerae* señala que es una especie monoica (Croizat, 1942; Correll y Marshall, 1970; Rogers y Appan, 1973). Sin embargo en el presente trabajo se detectó la presencia de un tercer tipo floral: las hermafroditas. Estas flores, cuando se presentan, se encuentran en un promedio de 2.5 flores por planta y ocupan la misma posición que las flores femeninas, es decir éstas son basales a la inflorescencia masculina. De acuerdo con esto, las plantas no son monoicas, sino trimonoicas según Percival (1965) o poligamomonoicas según Dafni (1992).

3. MORFOLOGÍA DE LAS FLORES MASCULINAS

La mayoría de las observaciones y mediciones hechas concuerdan con las descripciones de la literatura. El perianto es casi tubular y ligeramente hinchado en la base, el tubo mide cerca de 8 mm de largo en la antesis, los 5 lóbulos de los tépalos son ampliamente lanceolados de 5-6 mm de largo; las flores presentan de 8 a 10 estambres pareados que surgen de las axilas de las glándulas lobuladas. Rogers y Appan en su monografía (1973) mencionan que ellos sólo encontraron de 6 a 8 anteras a diferencia de las 10 reportadas en la descripción original por Croizat (1942). En las plantas estudiadas en el presente trabajo el número de estambres fue de 8, a 10, nunca 6. Los filamentos miden cerca de 8 mm de

largo y las anteras 2 mm (Lámina I, Fig. C). La especie está reportada como protógina por Correll y Marshall (1970).

4. DESARROLLO DEL ANDROCEO:

Durante el desarrollo, los primordios de anteras tienen una protodermis que envuelve al tejido arquesporial (Lámina II, Fig. A), ésta se divide periclinalmente y da origen al tejido parietal primario, que formará la pared de la antera y al tejido esporógeno (Lámina II, Fig. B). En una etapa posterior el tejido esporógeno se diferencia dando lugar a las células madres de las microsporas, mientras la capa parietal primaria se divide periclinalmente dando origen a dos capas celulares: la capa parietal secundaria externa y la parietal secundaria interna (Lámina II, Fig. C). Más tarde la capa parietal externa tiene división periclinal y formará 2 capas más; la externa se diferenciará en el endotecio y la interna recibe el nombre de capa media.

En la siguiente etapa, la capa media tiene división periclinal y quedará conformada por dos estratos, en este momento la pared de la antera cuenta con 4 capas: la epidermis, el endotecio, la capa media formada por dos estratos y el tapetum que es de tipo secretor (Lámina II, Fig. D). El desarrollo de la antera es de tipo dicotiledóneo, de acuerdo con la clasificación de Davis (1966).

En un estado de desarrollo más avanzado las células madres de las microsporas tienen meiosis y se forman las tétradas envueltas en una pared de calosa, en *M. walkerae* son de dos tipos: decusadas y tetrahédricas (Lámina II, Fig. E).

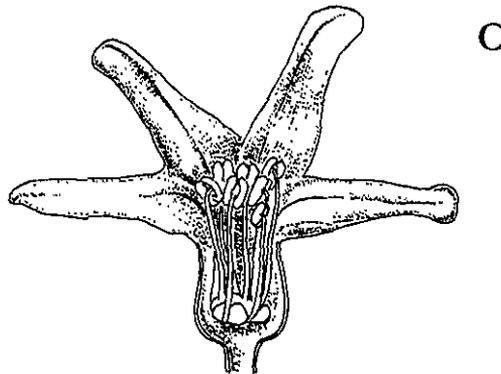
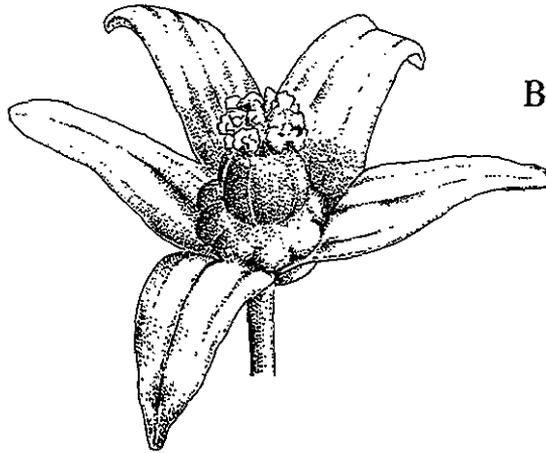
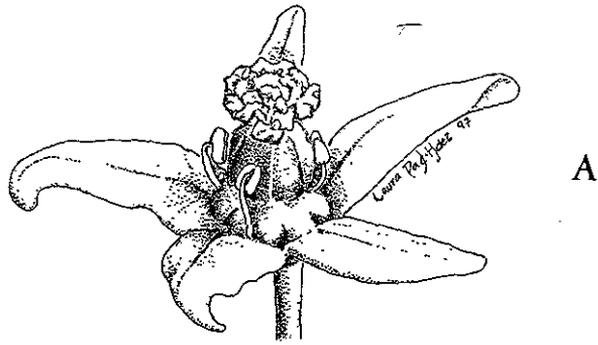
En la etapa de grano de polen joven la pared de la antera consta de: la epidermis, el endotecio, los estratos de la capa media obliterados y restos del tapetum que ha secretado las sustancias que intervinieron en la formación de la pared del grano de polen. El núcleo del grano de polen joven se divide dando origen a la célula vegetativa y a la célula

generatriz, esta última se divide, dando lugar a las células espermáticas o gametos masculinos (Lámina II, Fig. F).

En la flor masculina preantesis, la pared de la antera está formada por sólo dos capas: la epidermis y el endotecio. Los granos de polen son tricelulares al momento de la dehiscencia de las anteras, intactados y con ornamentación de clavos organizadas en rosetas (Lámina II, Fig. G).

Usando la prueba histoquímica doble APS-ANN para detectar proteínas y polisacáridos insolubles, se evidenció una gran cantidad de polisacáridos dentro del grano de polen, que sustentan el desarrollo del tubo polínico durante la fecundación.

Estructuralmente el aparato sexual masculino se desarrolla normalmente y los gametos masculinos se observan morfológicamente bien constituidos.



LAMINA I. Esquema de la morfología de la flor hermafrodita (A), flor pistilada (B) y flor estaminada (C)

LAMINA II. Desarrollo de la pared de la antera y grano de polen desde tejido esporógeno hasta grano de polen maduro.

Figura A. Corte longitudinal mediano de primordio de antera (etapa I). Protodermis (Pd), Tejido arquesporial (Ta).

Figura B. Corte longitudinal mediano de primordio de antera (etapa II). Epidermis (Ep), Capa parietal primaria (Cp), Tejido esporógeno (Te).

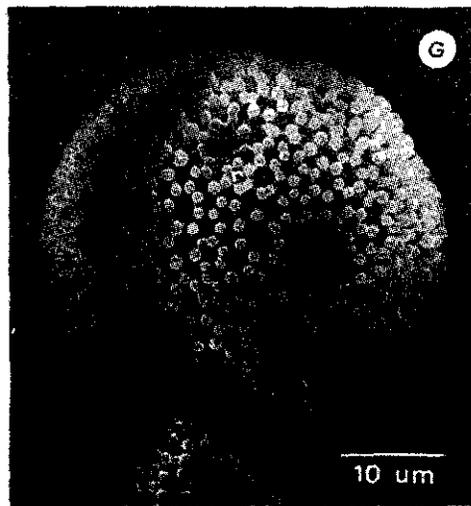
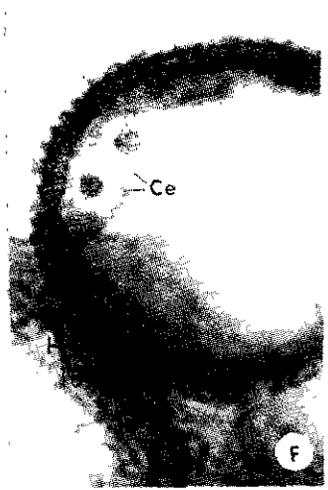
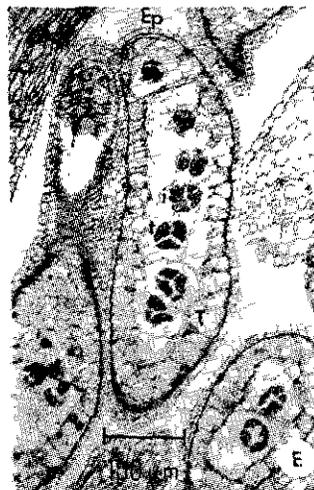
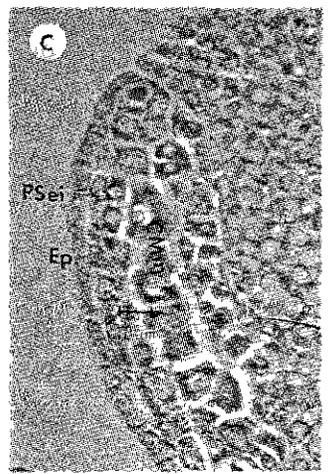
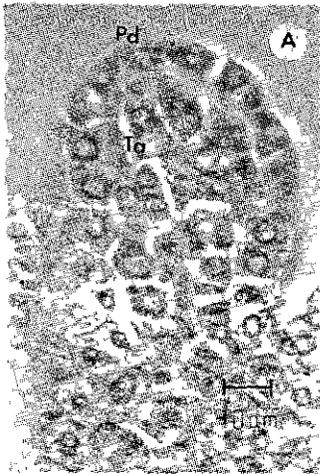
Figura C. Corte longitudinal de antera joven (etapa III). Epidermis (Ep), Capa parietal secundaria externas e interna (PSei), Células madres de las microsporas (CMm).

Figura D. Corte transversal de antera (etapa V). Epidermis (ep), Endotecio (e), Capa media biestratificada (cm), Tapetum (t).

Figura E. Corte longitudinal transmediano de antera (etapa VI). Epidermis (Ep), Tapetum (T), Tétrada isobilateral (i), Tétrada tetrahédrica (t).

Figura F. Corte longitudinal de un grano de polen. Células espermáticas (Ce).

Figura G. Grano de polen con ornamentación de clavos organizadas en rosetas (r), visto al Microscopio Electrónico de Barrido.



5. MORFOLOGÍA DE LA FLOR FEMENINA.

Las observaciones realizadas concuerdan con lo reportado en la literatura. El perianto femenino tiene 5 tépalos libres desde la base que miden aproximadamente 10 mm de largo por 2.5-3 mm de ancho y cuyo extremo es más o menos redondeado (Lámina I, Fig. B). El pistilo presenta un ovario globular del cual salen tres estilos cortos unidos en la base y de cada uno de éstos un estigma muy lobulado; el ovario es sincárpico, tricarpelar, trilocular, con un óvulo en cada lóculo. Después de la fecundación el ovario se transforma en una cápsula globosa de aproximadamente 12 mm de diámetro y con superficie rugosa con tres líneas de dehiscencia. Las semillas son aplanadas, de aproximadamente 8 mm de largo por 6 de ancho, presenta una gran carúncula de aproximadamente 2.5 mm de largo por 4 de ancho, de color amarillento y ligeramente partida dando de frente una apariencia bilabiada.

6. DESARROLLO DEL GINECEO.

En botones florales de aproximadamente 1.5 mm de largo ya se observa el ovario, el estilo y el estigma diferenciados. Dentro del ovario se aprecia un pequeño óvulo con una curvatura cercana a los 90 °, este óvulo presenta los primordios del tegumento externo e interno que se diferencian de la capa subepidérmica (las divisiones son periclinales y empujan a la epidermis que tiene divisiones anticlinales); en esta etapa se diferencia en el interior de la nucela, la célula arquesporrial que se divide dando origen a una célula parietal que continuará dividiéndose intensamente para dar lugar a una crasinucela y a una célula esporógena que funcionará como célula madre de la megaspora (CMM) (Lámina III, Fig. A).

En una etapa posterior del desarrollo, el tejido nucelar aumenta sus divisiones y empieza a ser abundante mientras que los tegumentos están ya diferenciados y continúan su crecimiento (Lámina III, Fig. B). El ovario, estilo y estigma no presentan grandes cambios.

Más tarde se puede apreciar que el crecimiento del tegumento externo (formado por 4 estratos celulares) ha rebasado al tegumento interno que también está formado por 4 estratos celulares y el tejido nucelar ha proliferado formando una protuberancia que se denomina pico nucelar que va más allá de los tegumentos y hace contacto con el obturador ya diferenciado, esta estructura facilita la entrada del tubo polínico al saco embrionario durante la fecundación. En esta misma etapa se puede apreciar que la célula madre de la megospora aumenta su volumen y los cromosomas se condensan, lo cual indica que la célula está lista para entrar en meiosis (Lámina III, Fig. C).

Como resultado de la meiosis se forma una tétrada de megasporas, de las cuales la ubicada en el extremo micropilar será la funcional, las tres restantes degeneran (Lámina III, Fig. D), en este momento el tegumento externo cuenta con 5 estratos celulares y está formando al micrópilo, mientras el tegumento interno sigue conformado por 4 estratos. El óvulo, por lo tanto, es exóstomo.

En la siguiente etapa del desarrollo, como resultado de las divisiones de la megospora funcional, el saco embrionario quedará formado por 2 sinérgidas y 1 ovocélula (que reciben en conjunto el nombre de aparato del huevo), una célula central con 2 núcleos polares y 3 antípodas que se localizan hacia la parte calazal. El tegumento externo está formado por 6 a 7 estratos celulares y el tegumento interno de 8 a 9 capas; el pico nucelar sigue en contacto con el obturador, en estos dos tejidos se observa una gran cantidad de gránulos de almidón (Lámina III, Fig. E).

Por su desarrollo el óvulo es péndulo, anátropo, crasinucelado y el saco embrionario es del tipo *polygonum*. El gameto femenino, o sea la ovocélula está estructuralmente bien constituida y lista para su fecundación. El pico nucelar en contacto con un obturador extenso y masivo son estructuras que favorecen la entrada del tubo polínico a través del

micrópilo y por lo tanto, la fecundación, más aun cuando se trata de un óvulo péndulo como es el caso de *M. walkerae*, además la presencia de almidón en el pico nucelar favorece la nutrición de los tubos polínicos en su trayecto hacia el óvulo.

LAMINA III. Desarrollo de Ovulo

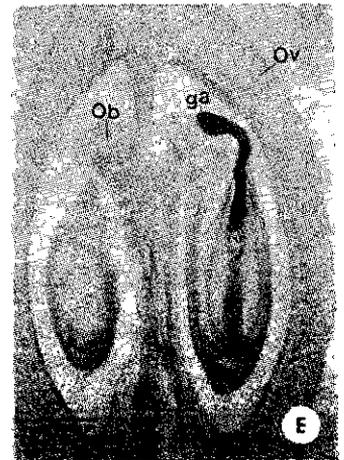
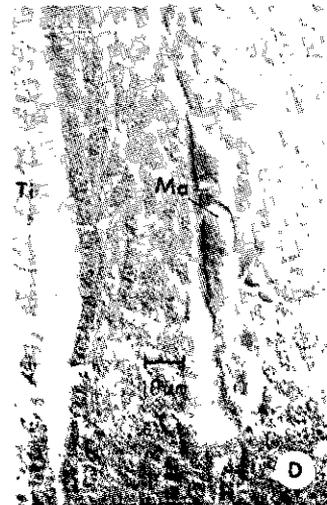
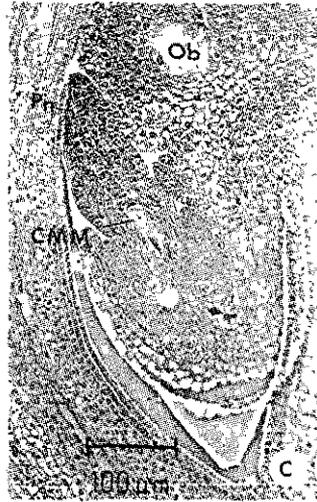
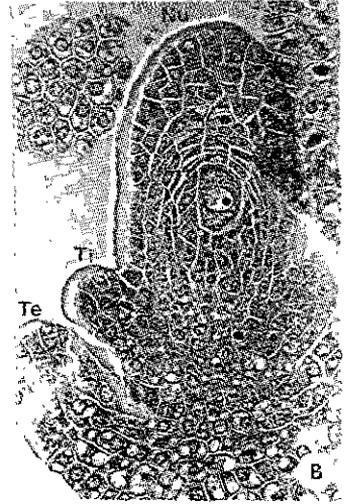
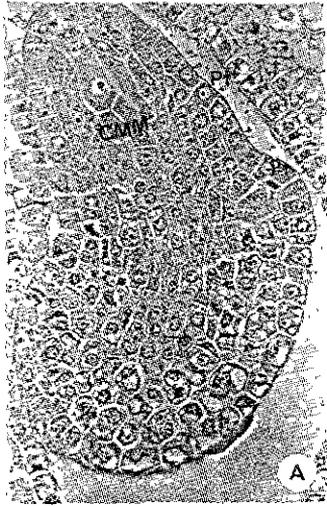
Figura A. Corte longitudinal mediano de óvulo (etapa I). Célula madre de la megaspora (CMM), Primordio de tegumento interno y externo (Pt).

Figura B. Corte longitudinal mediano de óvulo (etapa II). Nucela (Nu), Tegumento interno (Ti) y Tegumento externo (Te).

Figura C. Corte longitudinal mediano de óvulo (etapa III). Obturador (Ob), Pico nucelar (Pn), Célula madre de la megaspora (CMM).

Figura D. Corte longitudinal mediano de óvulo (etapa IV). Tegumento externo (Te), Tegumento interno (Ti), Megasporas abortivas (Ma).

Figura E. Corte longitudinal mediano de flor en anthesis (etapa VII). Ovario (Ov), Obturador (Ob), Granos de almidón en el pico nucelar (ga).



7. MORFOLOGIA Y DESARROLLO DE LA FLOR HERMAFRODITA.

Croizat (1942) en su descripción original de la especie menciona que del disco carnoso de las flores femeninas surgen algunos estambres (no menciona cuantos) aparentemente imperfectos (estaminodios).

Durante el trabajo de campo de la presente investigación se observó que había flores en el sitio descrito para las flores femeninas, pero con estambres y que en éstas, el perianto está compuesto de tépalos libres desde la base y su forma y dimensiones eran como las reportadas para las flores femeninas (Lámina I, Fig. A). El androceo en estas flores presenta de 1 a 5 estambres solamente, en comparación con los encontrados en las flores masculinas que son de 8 a 10, los estambres se desarrollan como en las flores masculinas y los granos de polen son morfológicamente iguales a los producidos en estas últimas. Los estambres de estas flores persisten hasta la etapa de fruto.

El gineceo es de morfología y dimensiones similares al de las flores femeninas, los óvulos se desarrollan igual y después de la fecundación se transforman en semillas.

Considerando a las flores hermafroditas y a las femeninas se obtienen 5 flores por planta en promedio, que teóricamente producirían un total de 15 semillas por planta, pues comúnmente se producen 3 semillas por fruto. Sin embargo es frecuente encontrar algunos frutos que sólo producen una o dos semillas, pues existe la aborción de óvulos o semillas en etapas muy tempranas.

La presencia de flores hermafroditas es un hallazgo en este trabajo pues no se habían descrito para esta especie, por lo que, de considerarse una especie monoica con flores femeninas y masculinas ahora deberá considerarse trimonoica o poligamomonoica.

8. DESARROLLO DE LA SEMILLA

Una vez que se ha llevado a cabo la fecundación, los tegumentos empiezan a tener cambios que concluirán en la formación de la cubierta seminal. En una etapa temprana se observa que las células del tegumento externo en la zona funicular proliferan y empiezan a formar lo que será la carúncula, en esta etapa el tegumento externo, ahora llamado testa, presenta una capa externa (exotesta) uniestratificada, una capa intermedia (mesotesta) compuesta de 5 a 7 estratos y una capa interna (endotesta) uniestratificada de células homogéneas de forma cúbica (Lámina IV, Fig. A). El tegumento interno, ahora llamado tegmen, tiene una capa externa (exotegmen) uniestratificada, la capa intermedia (mesotegmen) está formada de 10 a 14 estratos de células parenquimatosas y la capa interna (endotegmen) es uniestratificada de células en forma cúbica.

En un estado posterior del desarrollo, las células del endotegmen se alargan anticlinalmente formando un parénquima en empalizada y se observa un denso citoplasma (Lámina IV, Fig. B). En este momento ya se está formando el endospermo que es de tipo nuclear, su formación comienza en el extremo micropilar y se va extendiendo hacia la región chalazal, al mismo tiempo la nucela va desapareciendo en esta misma dirección. En la etapa siguiente, las células del endotegmen empiezan a colapsarse y las células de la endotesta y sobre todo las del exotegmen empiezan a diferenciarse, en esta misma etapa el endospermo ha desplazado casi en su totalidad a la nucela y se puede observar a un proembrión de aproximadamente 10 células (Lámina IV, Fig. C). En esta etapa se observa una gran cantidad de gránulos de almidón en el mesotegmen (Lámina IV, Fig. D).

Más tarde las células del exotegmen siguen teniendo un alargamiento en el sentido anticlinal, el endospermo ocupa ya todo el espacio interno y el embrión sigue aumentando su volumen.

En la etapa en la que el embrión tiene una forma globular, el endospermo adyacente a éste empieza a celularizarse (Lámina IV, Fig. E), el endotegmen sigue colapsándose y el exotegmen sigue alargándose y se puede observar una gran cantidad de almidón en la exo y mesotesta así como en el mesotegmen.

En la etapa de embrión acorazonado el endospermo sigue celularizándose hacia la calaza, el endotegmen ha desaparecido, el mesotegmen está formado de células parenquimatosas y el exotegmen con sus células alargadas y curvas presenta engrosamientos en la pared celular y las células de la endotesta siguen alargándose (Lámina IV, Fig. F).

El embrión en forma de torpedo tiene cotiledones delgados de unos 3 a 4 estratos, en esta etapa el endospermo celular ya ocupa todo el espacio interior y la cubierta seminal está formada por unos 5 estratos de mesotegmen, un exotegmen esclerosado formado por células llamadas de malpighi (con reacción positiva a la prueba histoquímica de floroglucina para detectar lignina), la endotesta formando un parénquima en empalizada, la mesotesta compuesta de unos 5 estratos de células de parénquima y la exotesta uniestratificada con poros que se encuentran distribuidos a lo largo de la rafe hasta la zona calazal (Lámina V, Fig. A, B, C, D y E).

La semilla madura lista para la dispersión es de forma aplanada de aproximadamente 8 mm de largo y 6 mm de ancho, su color va del café amarillento claro (2.5Y 6/4) a un café amarillento oscuro (10YR 4/4) (Munsell, 1992) y presenta manchas de color gris rojizo oscuro (2.5YR 3/1) por ambas caras, es muy evidente una estructura carnosa llamada carúncula.

Tobe, en 1989 habla de las dificultades de trabajar embriología vegetal y de la importancia que ésta tiene para los análisis taxonómicos, así, los datos arriba expuestos aportan información embriológica que puede ser útil para el mejor entendimiento de las relaciones

filogenéticas dentro de la familia Euphorbiaceae. De esta manera Kapil y Bhatnagar (1994) validan la taxonomía actual de la familia Euphorbiaceae usando caracteres embriológicos y discuten las posibles relaciones filogenéticas con base en esos caracteres además mencionan en su trabajo que no hay información para el género *Manihot*. Así mismo, Tokuoka y Tobe (1995) también hacen un análisis taxonómico de la familia Euphorbiaceae y discuten el valor taxonómico de algunos caracteres embriológicos para la familia y al igual que Kapil y Bhatnagar (1994), mencionan la falta de estudios embriológicos para muchos géneros de la familia, incluido *Manihot*.

Algo importante de resaltar es que de acuerdo con los resultados obtenidos, la especie *Manihot walkerae* en condiciones naturales, no presenta ninguna alteración durante el desarrollo de los verticilos sexuales, ni en el desarrollo de la semilla. Por otro lado, aunque las plantas que se mantuvieron en condiciones de laboratorio presentaron una floración constante, a nivel histológico mostraron un desarrollo anormal. Algunas de estas anomalías fueron: Las microsporas durante la meiosis presentaron gran cantidad de vacuolas, lo que nos da idea de tejido en franca degeneración, además, después de la meiosis muchas tétradas de microsporas seguían unidas y en ocasiones se podía observar hasta 10 microsporas rodeadas por una sola pared de calosa.

Según las observaciones arriba anotadas *M. walkerae* presenta alteraciones en su desarrollo fuera de su hábitat natural.

LAMINA IV. Desarrollo de semilla

Figura A. Corte longitudinal mediano de semilla joven (etapa I). Tegumento externo que empieza a formar la carúncula (Ca), Capas que forman la testa (Te), Capas que forman el tegmen (Tg), Primeras etapas del endospermo de tipo nuclear (en), Nucela (Nu).

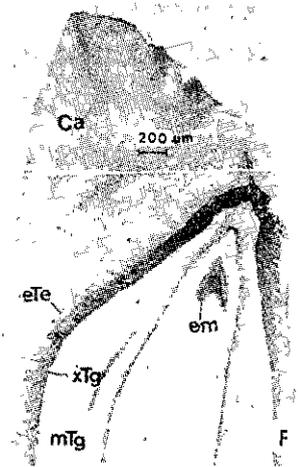
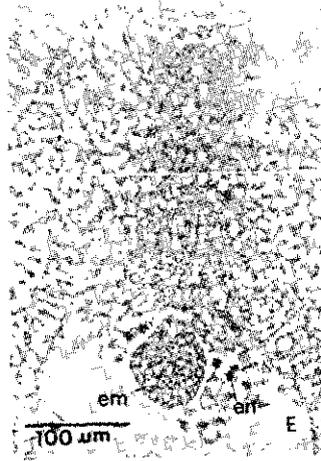
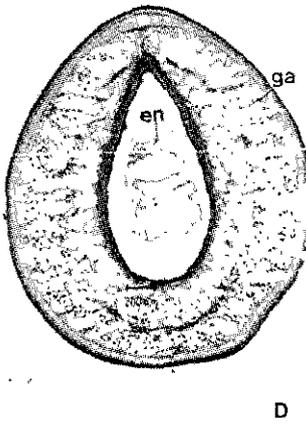
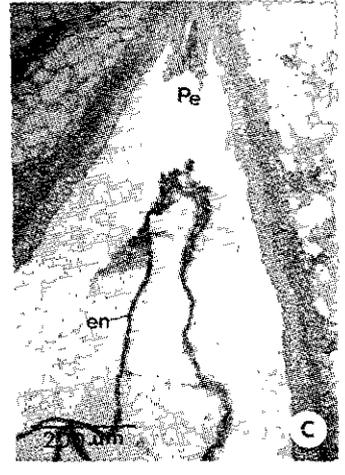
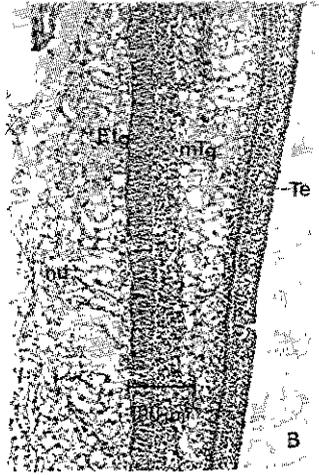
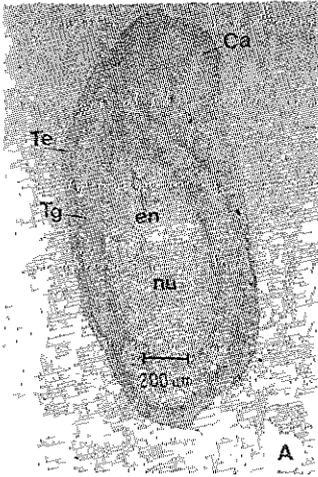
Figura B. Corte longitudinal mediano de semilla joven (etapa I). Células de endotegmen alargándose anticlinalmente (Etg), Mesotegmen formado aproximadamente por 5 capas celulares (mTg), Testa (Te).

Figura C. Corte longitudinal mediano de semilla (etapa III). Proembrión de aproximadamente 10 células (Pe), Endospermo (en).

Figura D. Corte longitudinal transmediano de semillas (etapa III). Granos de almidón en la mesotesta, Endospermo (en).

Figura E. Corte longitudinal mediano de semilla (etapa V). Embrión en etapa globular (em), Primeras células del endospermo (en).

Figura F. Corte longitudinal mediano de semilla (etapa VI). Carúncula (ca), Endotesta con células que empiezan a alargarse (eTe), Exotegmen con células alargadas que empiezan a engrosar sus paredes (xTg), Mesotegmen (mTg), Embrión en forma de corazón (em).



LAMINA V. Desarrollo de semilla (últimas etapas)

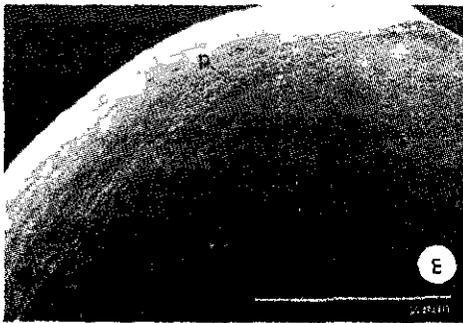
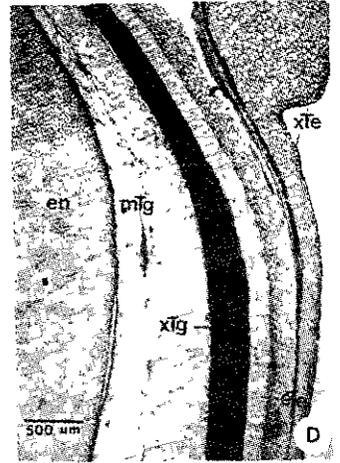
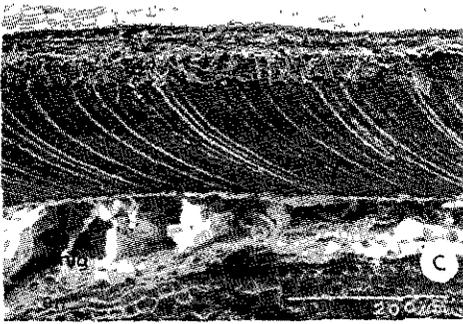
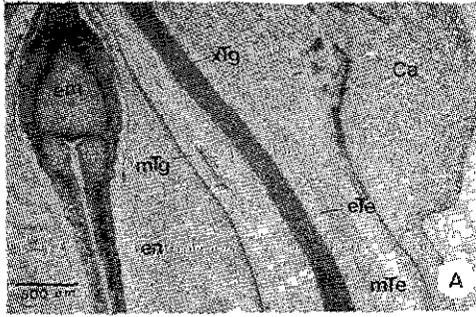
Figura A. Corte longitudinal mediano de semillas (etapa VIII). Carúncula (Ca), Mesotesta con haz vascular (mTe), Endotesta con células alargadas (eTe), Exotegmen con células con paredes lignificadas (xTg), Mesotegmen con células de parénquima (mTg), Células de endospermo (en), Embrión con delgados y largos cotiledones (em).

Figura B. Fotomicrografía al microscopio electrónico de barrido (MEB) de semilla madura deshidratada. Cubierta seminal (Cs), Endospermo (en).

Figura C. Fotomicrografía al microscopio electrónico de barrido (MEB) de semilla madura deshidratada. Capas de la testa (Te), Exotegmen con paredes lignificadas (xTg), Mesotegmen (mTg) y Células de endospermo (en).

Figura D. Corte transversal mediano de semilla madura hidratada. Exotesta con algunos poros (xTe), Endotesta con células alargadas anticlinalmente (eTe), Exotegmen con células lignificadas (xTg), Mesotegmen con células de parénquima (mTg) y células del endospermo (en).

Figura E. Fotomicrografía al MEB de semilla madura deshidratada donde se observan los poros (p) a lo largo de la rafe.



9. DESARROLLO DE LA CARUNCULA.

Una vez que el óvulo se ha desarrollado, puede observarse que en la región de la rafe el extremo terminal del tegumento externo esta engrosado y es ahí de donde se formará la carúncula (Lámina IV, Fig. A). Durante el desarrollo de la semilla esa misma zona sigue aumentando su volumen y por lo mismo causando una separación entre micrópilo y la zona donde se une el óvulo y la placenta. En una semilla madura (hidratada) puede observarse muy bien a la carúncula que está entre el micrópilo e hilo y al mismo tiempo los cubre parcialmente, esta estructura mide unos 4 mm de largo por 5 mm de ancho y está compuesta principalmente de dos tipos de células parenquimáticas: unas 4 o 5 capas de células cercanas a la superficie son de forma alargada y las más internas son isodiamétricas. En *M. walkerae* las pruebas histoquímicas hechas a la carúncula de las semillas para detectar aceites resultaron positivas, observándose gotas de color rojo o rosado con la prueba con Rojo O de aceite y gotas del mismo color con la prueba de Azul de Nilo para detectar grasas totales.

10. PAPEL DE LA CARUNCULA EN LA POSIBLE DISPERSION DE LAS SEMILLAS.

Se ha reportado la dispersión por hormigas (mirmecocoria) para semillas carunculadas de diferentes taxa, Horvits y Beattie (1980) describen la conducta de diferentes especies de hormigas al interactuar con semillas ariladas de *Calathea microcephala* y *C. ovoidensis* (Marantaceae). Dependiendo de la especie de hormiga, las semillas pueden ser colectadas y despojadas totalmente del arilo para después ser dispersadas al depositarlas en los basureros de los nidos donde existen condiciones de humedad y temperaturas particulares, además de ser ricos en nutrientes y proteger a las semillas de posibles depredadores. Otras especies de hormigas no colectan las semillas, sino que en el lugar donde las encuentran, éstas extraen algo de los arilos y en ocasiones los muerden. Al hacer cortes de las semillas con arilos y

después de realizar pruebas histoquímicas a los cortes, encontraron que éstos tenían gran cantidad de gotas de lípidos.

Aunque en la localidad donde se colectaron las semillas de *M. walkerae* se observaron varios hormigueros de las llamadas comúnmente hormigas rojas, no se pudieron ver hormigas colectando semillas. Sin embargo en el laboratorio pudo observarse que al día siguiente de poner a secar algunas semillas de *M. walkerae* sobre una mesa, éstas tenían una gran cantidad de hormigas de las que invaden el área. Al revisar algunas de estas semillas al microscopio estereoscópico, se comprobó que presentaban varios hoyos en la carúncula. Los resultados positivos a las pruebas histoquímicas con Rojo O de aceite y azul de nilo en esta estructura, indican que contiene aceites, los cuales pueden ser responsables de que las hormigas se vean atraídas. Además el haber encontrado en el laboratorio las carúnculas de las semillas mordisqueadas, sugiere la idea de que las semillas de esta especie pueden ser dispersadas por estos insectos. Si las hormigas son vectores de las semillas de *M. walkerae* podrían estar influyendo en la dinámica poblacional y en la distribución de las plantas, si esto es así podría ser la explicación del por qué en la población de Aldama algunas plantas de *M. walkerae* se encuentran en hoyos sobre las rocas. Para responder a preguntas como éstas es necesario hacer más estudios sobre la posible interacción hormigas-semillas, como los realizados en las especies de la familia Marantaceae por Horvitz y Beattie (1980), Horvitz (1981) y Horvitz y Schemske, (1984).

PROPAGACION DE *M. walkerae*.

Durante 4 años y medio de visitas a las poblaciones de *M. walkerae* no se observaron plántulas, ni cerca ni lejos de las plantas madre lo que sugiere:

- 1) Que las semillas quedan almacenadas en un banco en el suelo.

2) Que éstas en su mayoría son depredadas y que la especie puede propagarse vegetativamente.

Con respecto al primer punto se puede mencionar que la población de *M. walkerae* que crece en el terreno de cultivo fue la que presentó una floración anual regular, produciendo en teoría 1,500 semillas aproximadamente, por lo cual se esperaría encontrar plántulas en esta población, pero durante las visitas que se hicieron a esta localidad no se encontraron éstas. En el presente estudio se encontró que la cubierta seminal cuenta con una capa bastante gruesa de esclerénquima empalizada, lo que le confiere a las semillas una gran resistencia mecánica e impermeabilidad por lo cual es probable que éstas puedan incorporarse a un banco en el suelo, además por estas características pueden ser clasificadas como semillas duras (Mayer y Poljakoff, 1978).

Con respecto a la depredación Nartey (1978) menciona que en *Manihot esculenta* el endospermo de las semillas es tan abundante que al momento de la germinación se le puede observar sobre los cotiledones como una gelatina, y es entonces cuando hongos y bacterias aprovechan para infestarlo impidiendo de esta manera el establecimiento de la plántula, en *M. walkerae* el endospermo también es abundante así que es posible que al germinar la semilla, ésta pueda ser atacada por microorganismos y la plántula no establecerse.

Durante las visitas a la población que crece en el terreno de cultivo en el ejido Morales se encontraron enterrados algunos fragmentos de raíz tuberosa que contaban ya con ramas y hojas lo cual indica que la especie puede propagarse vegetativamente. La especie *M. esculenta* es propagada principalmente por estacas que se obtienen al fragmentar la raíz de ésta, en *M. walkerae* aunque la raíz tuberosa es más pequeña, parece que sucede algo similar.

11. COLECTA DE LAS SEMILLAS Y OBSERVACIONES DE CAMPO

Las semillas que se utilizaron para las pruebas de germinación se obtuvieron de frutos maduros hidratados cosechados en el campo, estos frutos se envolvieron en papel periódico y se dejaron secar al ambiente. El fruto al secarse abre y arroja a las semillas (dispersión de tipo explosiva), por lo que se esperaría que las semillas fueran arrojadas lejos de la planta madre. La distancia de dispersión depende de la fuerza, el ángulo y la altura con que la semilla es arrojada de la planta madre (Beer y Swaine, 1977; Swaine y Beer, 1977) (Fig. 1). En las visitas que se hicieron al campo se observaron semillas de *Manihot walkerae* justo debajo de las plantas, de acuerdo con el modelo de Beer y Swaine la explicación es que los frutos en esta especie se encuentran por debajo del follaje de la planta, a escasos centímetros del suelo y en ocasiones en contacto directo con éste, estas características podrían ser la causa por la cual las semillas no pueden ser arrojadas muy lejos y es por eso que se les encuentra cerca de la planta madre.

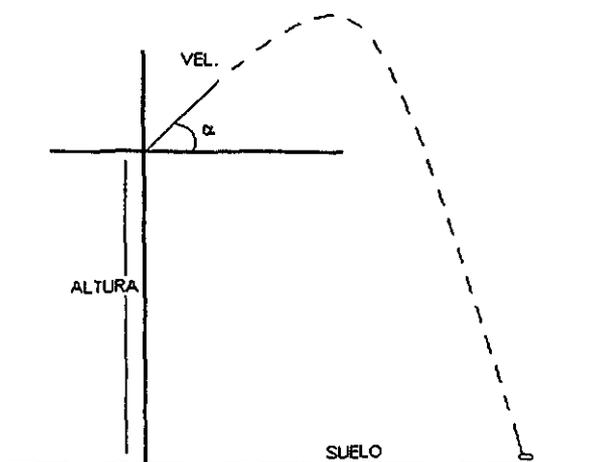


Figura 1. Esquema donde se muestra que la distancia que viaja una semilla depende de la velocidad, el ángulo y la altura a la que ésta es arrojada desde la planta madre.

12. PRUEBAS PRELIMINARES DE GERMINACIÓN.

Bianchini y Pacini (1996), proponen que en *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), la carúncula ayuda en la deshidratación, hidratación y germinación de las semillas y relacionan estos procesos con las intercomunicaciones que encuentran en la estructura celular de la carúncula. Por otro lado, Nartey (1978) en su trabajo con *Manihot esculenta* menciona que para mejorar la germinación en esa especie hay que eliminar la carúncula y escarificar ligeramente en esa zona y que el proceso puede ser mejor si las semillas se ponen a germinar a una temperatura de 30 °C. Tomando las cita anteriores como referencia se decidió hacer una prueba preliminar de germinación con las semillas de *Manihot walkerae*. En ese momento se contaba con solo 20 semillas así que se colocaron éstas en dos condiciones:

- 1) 10 semillas con carúncula (intactas) en una caja petri con papel absorbente y
- 2) 10 semillas sin carúncula y escarificadas en la zona micropilar en otra caja petri.

Ambas cajas se colocaron a una temperatura constante de 25 °C y con un fotoperiodo de 12 horas oscuridad y 12 horas luz, haciendo revisiones cada tercer día.

En la caja con la condición “semillas intactas” no hubo germinación después de 20 días, además, se observó que en esta caja las semillas tenían hongos en la cubierta seminal pero principalmente en la carúncula.

En la segunda caja con la condición “semillas sin carúncula y escarificadas” se presentó la primera semilla germinada al día 14 y para el día 20 había 5 semillas germinadas. En esta caja las plántulas resultantes de la germinación no estaban contaminadas, en cambio las semillas que no germinaron presentaban hongos sobre la cubierta seminal.

Por lo anterior, se puede mencionar que las semillas de *M. walkerae* sólo germinan (en condiciones de laboratorio) cuando son despojadas manualmente de sus carúnculas y

además se escarifican en esa zona. Esta conclusión esta apoyada también por el análisis que se hizo a los cortes de la carúncula, en los cuales no se observaron las intercomunicaciones celulares reportadas para la carúncula de *R. Communis*.

13. ANALISIS DE VARIANZA PARA LAS PRUEBAS DE GERMINACIÓN.

La experiencia de las pruebas preliminares de germinación sirvió para realizar las pruebas de germinación. En el análisis de la varianza que se les hizo a los datos registrados durante las pruebas de germinación se puede ver en la tabla 1 que no hay evidencia significativa ($\alpha=0.05$) de interacción de los factores probados (semillas hundidas-flotantes y de la temperatura constante-fluctuante) que influyera en el porcentaje de germinación (F_c 1.81 n.s.=0.19). En la misma tabla se puede observar que tampoco hay diferencia significativa para cada uno de los factores probados por separado, semillas hundidas-flotantes ($F_c= 0.1$ n.s.= 0.75) y temperatura constante-fluctuante ($F_c= 0.27$ n.s.= 0.61).

De acuerdo con estos resultados se puede decir que no hay diferencia significativa en la germinación entre las semillas hundidas y flotantes que se someten a temperaturas constantes de 30 °C o fluctantes de 15-25 °C (Gráfica 1 y 2). Por lo tanto, se puede concluir que las semillas de *M. walkerae* germinan a los 15 días (en promedio) después de que se les elimina la carúncula y se les escarifica en esa zona con un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. En observaciones posteriores se encontró que modificando la temperatura a 35 °C, las semillas germinan dentro de los primeros 3 días y su porcentaje es mayor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA GERMINACION DE SEMILLAS DE *Manihot. walkerae* HUNDIDAS, FLOTANTES, Y SOMETIDAS A TEMPERATURA CONSTANTE (30°C) Y FLUCTUANTE (15-25°C).

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F _c	F _t	NIVEL SIGNI.
EFEC. PRINCI. A: CONDICION	60.48375	1	60.48	0.1	4.35	0.7587
B:TEMPERATURA	167.69	1	167.69	0.27	4.35	0.6102
INTERACCION A vs B	1,100.80	1	1,100.80	1.81	4.35	0.1928
ERROR	12121.380	20	606.06			
TOTAL	13450.35	23				

N.S.= No significativo

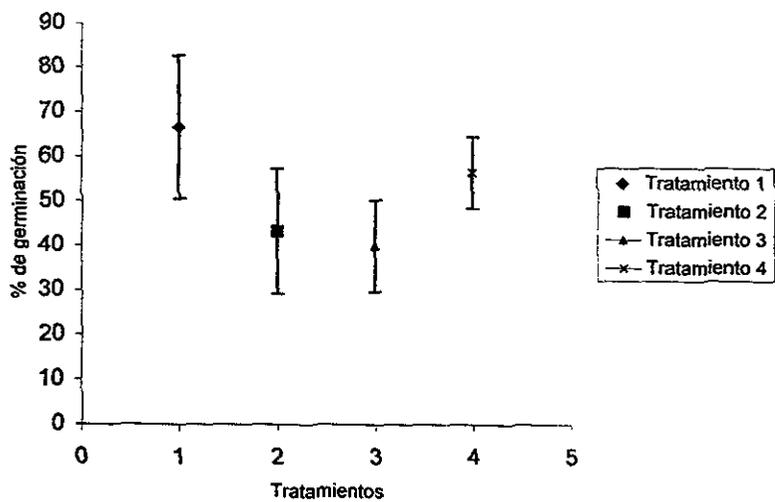


Figura 2. Gráfica mostrando el porcentaje de germinación promedio de semillas sometidas a los 4 diferentes tratamientos.

VII. CONCLUSIONES

- De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana nom-ecol-059-1994 y las observaciones realizadas en este trabajo se puede decir que *M. walkerae* puede considerarse en la categoría de “especie amenazada”, ya que las localidades en las que se encuentra creciendo están sometidas a una gran perturbación. En la localidad de Aldama, la vegetación es alterada por pastoreo de ganado vacuno y caprino, aunque parece que la especie no es palatable para los animales, el impacto que éstos ejercen sobre la comunidad es muy grande pues pisan, tiran o comen muchas de las plantas que crecen en los alrededores donde se encuentra *M. walkerae*. En la población que se encuentra en el terreno de cultivo en el municipio de Abasolo, además del pastoreo de ganado vacuno existe el riesgo del uso de herbicidas ya que se observó que en un terreno adyacente se usan estas sustancias y no se ha encontrado ni un solo ejemplar de esta especie.
- Otras consideraciones surgidas de este trabajo son: la formación de los órganos y estructuras reproductoras de esta especie en estado silvestre es normal, produciéndose granos de polen, óvulos y semillas viables. Las plantas conservadas en condiciones de laboratorio presentan una floración continua durante todo el año, pero el desarrollo de las estructuras reproductoras es anormal. Esta observación es importante si se considera la conservación de la especie fuera de su hábitat natural.
- Las semillas poseen latencia por testa dura, característica que puede permitir su incorporación al banco de semillas en el suelo y germinar cuando naturalmente se escarifiquen y las condiciones sean propicias para ello.

- La ausencia de plántulas en las poblaciones durante el tiempo que duro este estudio, plantea un problema para la propagación de la especie a través de semillas, por lo que se propone verificar la existencia de semillas en el suelo, realizar pruebas de geminación en el campo, y hacer estudios sobre la relación semilla-hormiga entre otros.
- El haber encontrado pedazos de raíz con ramas y hojas sugiere que la especie puede propagarse vegetativamente.
- La dispersión y escarificación de las semillas podría hacerse a través de la relación carúncula-hormiga.
- Por último, el estudio de esta especie tan importante económicamente, continúa enfocándose ahora a esclarecer el tipo de reproducción que presentan las únicas poblaciones silvestres de *M. walkerae* en el mundo, las cuales se encuentran en México.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Anónimo <http://www.wcmc.org.uk:80/species/plants/categories.html>
- Baker, H. G. 1968. Las plantas y la civilización. Herrero Hermanos Sucesores S.A. México D.F. 193pp.
- Beer, T. y M. D. Swaine. 1977. On the theory of explosively dispersed seeds. *New Phytol.* 78 681-694.
- Bianchini, M. y E. Pacini. 1996. The caruncle of *Ricinus communis* L. (Castor Bean): Its development and role in seed dehydration, rehydration and germination. *Int. J.Plant Sci.* 157 (1) 40-48.
- Casas, A. y J. Caballero. 1995. Domesticación de plantas y origen de la agricultura en mesoamérica. *Ciencias*, No 40 36-45.
- Chi, E. y Edward, S. Dept. of Pathology, School of Medicine, University of Washington, Seattle, Washintong. En: folleto de Polyscience.
- Correll, D.S. y Marshall, C. J. 1970. *Manual of the vascular plants of Texas.* Texas Research Foundation. Renner, Texas.
- Croizat, L. 1942. New and critical Euphorbiaceae chiefly from the southeastern United States. *Bulletin of the Torrey Botanical Club.* 69(6) : 445-460.
- Curtis, P J. 1986. *Microtecnia vegetal.* Editorial Trillas Mèxico D.F.
- Dafni, A. 1992. *Pollination ecology: A practical approach.* Oxford University Press. 250pp.

- Davis, G. L. 1966. Systematic embryology of the angiosperms. John Wiley and Sons, Inc., New York. 528pp.
- D'Ambrogio, de A. A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Editorial Hemisferio Sur S. A. Buenos Aires, Argentina.
- García, A. E. 1964. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Offset Larios, México D.F. 71p.
- Harper, L. J. 1981. The meanings of rarity. The biological aspects of rare plant conservation. Hugh Synge. 189-203pp.
- Horvitz, C.C. 1981. Analysis of how ant behaviors affect germination in a tropical myrmecochore *Calathea microcephala* (P. And E.) Koernicke (Marantaceae) microsite selection and aril removal by neotropical ants, *Odontomachus*, *Pachycondyla*, and *Solenopsis* (Formicidae). *Oecologia*. 51 47-52.
- Horvitz, C. C. and A. J. Beattie. 1980. Ant dispersal of *Calathea* (MARANTACEAE) seeds by carnivorous ponerines (FORMICIDAE) in a tropical rain forest. *Amer. J. Bot.* 67(3): 321-326.
- Horvitz, C. C. y D. W. Shemske. 1984. Effects of ants and an ants-tended herbivore on seed production of a neotropical herb. *Ecology*. 65(5) 1369-1378.
- Hoyt, E. 1992. Conservando los parientes silvestres de las plantas cultivadas. Ed. IBPGR, UICN y WWF. 52pp.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York. 523pp.
- Kapil, R. N. & A. K. Bhatnagar. 1994. The contribution of embryology to the systematics of the Euphorbiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 81:145-159.

- Mace, M. G. y R. Lande. 1991. Assessing extinction threats: Toward a reevaluation of IUCN threatened species categories. *Conservation Biology*. Vol. 5 No 2 148-157.
- Martínez-y-Ojeda E. y F. González-Medrano. 1977. Vegetación del sudeste de Tamaulipas, México. *Biotica* 2(2):1:45pp.
- Miranda, F. y E. Hernández-X. 1963. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Bol. Soc. Bot. México*. 28: 29-179.
- Munsell, 1992. Munsell soil color charts. United States Department of Agriculture. Kollmorgen, Maryland.
- Nartey, F. 1978. *Manihot esculenta* (Cassava): Cyanogenesis, Ultrastructure and Seed Germination. University of Copenhagen, Institute of Plant Physiology. Denmark.
- Nassar, N. M. A. 1980. Attempts to hybridize wild *Manihot* species with cassava. *Economic Botany*. 34 (1). 13-15.
- Norma oficial mexicana nom-ecol-059-1994, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. Publicada en el Diario Oficial de la Federación de fecha 16 de mayo de 1994.
- Percival, S. M. 1965. *Floral Biology*. Pergamon Press. 243pp
- Primack, Richard B. 1993. *Essentials of conservation biology*. Sinauer Associates, Inc. 564 pp. Massachusetts, U.S.A.
- Rabinowitz, D. 1981. Seven forms of rarity. In: *Biological aspects of rare plant conservation*. H. Singe Ed. 205-217pp. John Willey and Sons, New York.

- Rogers, J. D. y S. G. Appan. 1973. Flora neotropica. Monograph No 13: Manihot, Manihotooides (Euphorbiaceae). Hafner Press, New York.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Editorial Limusa. México.
- Spellerberg, Ian F. 1996. Conservation Biology. 242 pp. Longman Singapore Publishers. Singapore.
- Steel, R. G. D. y James, H. T. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. Mc Graw-Hill, México. 622 pp.
- Swaine, M. D. y T. Beer. 1977. Explosive seed dispersal in *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae). *New Phytol.* 78: 695-708.
- Tobe, H. 1989. The embryology of angiosperms: Its broad application to the systematic and evolutionary study. *Bot. Mag. Tokio* 102: 351-367.
- Tokuoka, T. and H. Tobe. 1995. Embryology and systematics of Euphorbiaceae *sens. lat.*: A review and perspective. *J. Plant Res.* 108: 97- 106.
- U.S. Fish and wildlife service. 1990. Endangered and threatened wildlife and plants; proposed rule to list the plant *Manihot walkerae* (Walker's manioc) as endangered. F.W.S. Federal register. Vol. 55 (190): 39989-39992.
- U.S. Fish and wildlife service. 1993. Walker's Manioc (*Manihot walkerae*) Recovery Plan. USDI Fish and wildlife Service, Albuquerque, New Mexico. 57 pp.
- Viola, H. J. y C. Margulis. 1991. Seeds of change. Smithsonian Institution. Printed in the United States.