



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Germinación y morfología de plántulas de *Dioon edule* var. *angustifolium* (Miq.) Miq. (Zamiaceae)”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A N

**Alvarado Velasco Baldomero Gilberto
Gutiérrez Salazar Laura Elena**

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ



MÉXICO, D.F.

ABRIL 2009



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.

DEDICATORIA

Baldomero Gilberto Alvarado Velasco:

A mi madre Concepción Velasco López que siempre me ha apoyado, cuidado y aconsejado toda la vida.

A mi padre que en paz descansa por darme los valores más firmes de mi persona.

A mí querida esposa Evangelina por su cariño y comprensión.

A mis hijos Fernanda y Gilberto que me impulsan y me dan fuerza para alcanzar mis metas.

Laura Elena Gutiérrez Salazar

A mi familia.

En particular a mi padre Alfonso Gutiérrez Torres y mis hermanos Pilar y Sergio.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por habernos acogido en sus aulas y formarnos como profesionistas y sobre todo permitirnos realizar trabajos profesionales durante nuestro desempeño laboral.

Al M. en C. Carlos Castillejos Cruz por su profesionalismo en la dirección, dedicación y paciencia en la realización del presente trabajo.

A los miembros del jurado Doctor Eloy Solano Camacho, Biól. Juan Romero Arredondo, M. en C. Sonia Rojas Chávez y Biól. Roberto Cristóbal Guzmán quienes revisaron el escrito y lo mejoraron con su experiencia profesional.

A la M. en C. Sonia Rojas Chávez por su colaboración en el trabajo de campo, así como su ayuda en el trabajo de impresión.

Finalmente nuestros agradecimientos a aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron y nos impulsaron para dar termino a esta tesis.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	1
I INTRODUCCIÓN.....	2
II ANTECEDENTES.....	4
2.1 Las Gimnospermas.	4
2.2 Biología de cicadáceas.....	6
2.3 Diversidad de Cycadophyta.....	14
2.4 Descripción de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> (Miq.) Miq.....	15
2.5 Importancia biológica y económica de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i>	16
2.6 Semillas de Cycadophyta	17
2.7 Germinación en las gimnospermas.....	18
2.8 Latencia en Cicadaceae.....	19
III HIPOTESIS.....	20
IV OBJETIVOS.....	20
4.1 Objetivo general.....	20
4.2 Objetivos particulares.....	20
V MATERIAL Y MÉTODO.....	21
5.1 Recolección de conos, semillas y caracterización ecológica del hábitat	21
5.2 Morfología de conos y semillas.....	21

5.3 Determinación del grado de madurez de los embriones.....	22
5.4 Viabilidad.....	23
5.5 Tratamientos pregerminativos.....	23
5.6 Escarificación, siembra y porcentaje de germinación.....	24
5.7 Morfología de plántulas.....	25
VI RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
6.1 Recolecta.....	27
6.2 Morfología de conos y semillas.....	31
6.3 Obtención de semillas y maduración de embriones.....	34
6.4 Pruebas de viabilidad.....	35
6.5 Germinación.....	36
6.6 Morfología de la plántula y desarrollo postemergente.....	38
VII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
VIII LITERATURA CITADA.....	49

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Ciclo reproductivo en cícadas.....	9
2. Posición horizontal de las semillas y condiciones del invernadero rustico para la siembra de semillas de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i>	24
3. Estructuras de la plántula de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> que fueron medidas para determinar el grado de crecimiento y diferenciación.....	26
4. Distribución agregada de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> en pendientes pronunciadas en suelo pedregoso.....	27
5. <i>Peromyscus mexicanus</i> roedor que se alimenta y dispersa las semillas de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i>	31
6. Corte transversal del microestróbilo o cono masculino de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i>	32
7. Cono femenino de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i>	32
8. Secuencia de maduración de las semillas de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i>	34
9. Gráfica de germinación acumulada de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> ..	37
10. Semilla germinada de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> , nueve días después de la siembra.....	39
11. Semilla de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> que muestra el hipocótilo elongado con una capa mucilaginosa marron.....	40
12. Semillas de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> con raíces primarias a los	

84 días de la siembra.....	41
13. Semilla de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> con raíz napiforme y estrías.....	42
14. Semilla de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> de 124 días que muestra el inicio del crecimiento de raíces secundarias.....	43
15. Radícula de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> con fisura y yema pilosa.....	44
16. Hoja de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> con versación circinada, en etapa de desarrollo temprano.....	45
17. Secuencia del desarrollo de la hoja de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> .	46

CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Diversidad y distribución de las familias, géneros y especies de la división Cycadophyta.....	14
2. Número de semillas de <i>Dioon edule</i> var. <i>angustifolium</i> en función de su forma y ubicación dentro del cono.....	33

RESUMEN

Se describió la morfología reproductiva, germinación y emergencia de plántulas de *Dioon edule* var. *angustifolium*, bajo condiciones de invernadero. Las semillas de esta especie midieron 2.3 centímetros de largo por 1.75 centímetros de ancho en promedio y pesaron 4.4 gramos. La germinación alcanzó 84% a los 36 días de siembra, para ello a las semillas se les retiró la sarcotesta, fueron remojadas en agua durante 24 horas y se escarificaron en la región del micrópilo, lijándolas levemente. La germinación se consideró en el momento de la aparición de la radícula. A los 180 días de siembra emergió la plúmula, misma que presentó una vernación circinada, semejante a la de los helechos. A los 195 días de siembra, la plúmula midió 6.3 centímetros de largo y a los 210 días creció hasta 10.2 centímetros. Después de 365 días de siembra, el peciolo mostró un tamaño de 10.5 centímetros de largo y 0.1 centímetros de ancho. El largo del raquis fue de 5.8 centímetros. Los folíolos fueron 34 en promedio con un tamaño que varía de (0.8)1.5 a 3.1 centímetros.

INTRODUCCIÓN

Las cícadas (división Cycadophyta) son plantas que por su distribución localizada, ciclo de vida muy largo, poca capacidad reproductiva y crecimiento lento, presenta graves amenazas a su supervivencia. La mayoría de sus géneros y especies se encuentran clasificadas en alguna categoría de riesgo (Sánchez *et al.* 2007). Las principales amenazas para las cícadas son la destrucción del hábitat y la recolección de plantas en la naturaleza (Donaldson, 2003). Estas amenazas varían en las diferentes regiones. La destrucción del hábitat es la principal en Asia, América del Sur, América Central y el Caribe; en tanto, la recolección en la naturaleza es la principal en África. Incluso en las regiones donde la destrucción del hábitat es la principal amenaza, la extracción de plantas también puede constituir un riesgo, siendo la recolección con fines de comercio el factor principal para un gran número de cícadas en todos los países donde se distribuyen (Donaldson ,2003).

Puede considerarse que las cícadas son las plantas más amenazadas del mundo. De acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, por sus siglas en inglés) y según Donaldson (2003), el 52 % de las especies conocidas están clasificadas como amenazadas (Críticamente en peligro, en peligro o vulnerables). De este modo, *Dioon edule* está considerada por la UICN vulnerable y la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2001) la coloca como una especie amenazada de extinción. Esta situación se debe a que ha sido usada con fines comestibles y ceremoniales desde la época prehispánica. En la actualidad estas plantas se extraen y son comercializadas como

ornamentales y en algunas poblaciones siguen siendo ceremoniales. Sus semillas son comestibles, aunque aparentemente sólo se consumen en épocas de gran escasez de alimentos (Glafiro *et al.* 2004). Sus hojas tiernas son venenosas para el ganado, por lo que en muchos agostaderos las plantas se eliminan de manera sistemática. Ante esta situación, *Dioon edule* var. *angustifolium* requiere de estudios básicos que permitan regenerar sus poblaciones en su hábitat natural, entre ellos se encuentra la descripción de su morfología reproductiva y la germinación de sus semillas, al conocer estos aspectos primarios de su biología, las comunidades humanas que la extraen de su medio natural, iniciarían con su cultivo y domesticación. Además, *Dioon edule* var. *angustifolium* es una especie endémica de México.

Por otro lado, Dehgan (1983), Pavón (1999), Sánchez (2003) e Iglesias y Alba (2004), mencionaron que la germinación de las semillas de esta especie es difícil y en algunos de estos trabajos se indica que las semillas tardan hasta un año en germinar.

II ANTECEDENTES

2.1 Las gimnospermas

Las gimnospermas son un grupo de aproximadamente 820 especies que se caracterizan por la producción de semillas desnudas, de hecho el nombre de este grupo deriva de las palabras griegas *gymnos*, desnudo y *sperma*, semilla. Son plantas leñosas, pueden ser árboles, arbustos e incluso lianas, por lo general son monoicas. Se les agrupa en cuatro divisiones Coniferophyta, Cycadophyta, Ginkgophyta y Gnetophyta. Las coniferofitas comprenden la gran mayoría de las especies existentes (Santamarina, 1980; Vidakovic, 1991; Judd *et al.* 1999; Raven *et al.* 1999).

En la división Cycadophyta se encuentran plantas con aspecto de palmera y que se desarrollan en muchas regiones tropicales y subtropicales. Estas se originaron desde el Mesozoico y declinaron durante el Cretácico y Terciario. Su distribución restringida parece indicar que se encuentran al final de su historia evolutiva (Cronquist, 1977; Scagel, 1983; Moore, 1998).

Las Cycadales o cícadas tienen caracteres primitivos presentes desde hace aproximadamente 200 millones de años al presente y de todas las gimnospermas vivientes, son el grupo más antiguo (Vovides y Peters, 1987).

Las cícadas han sobrevivido hasta nuestros días de manera relictual y presentan distribución geográfica restringida, la mayoría son pantropicales. En la actualidad sólo están catalogadas alrededor de 210 especies vivientes, incluidas en tres familias Cycadaceae, Stangeriaceae y Zamiaceae (Stevenson, 1992).

Las familias Cycadaceae y Stangeriaceae se encuentran principalmente en Oceanía, Asia y sur del continente africano. La primera familia está representada tan solo por el género *Cycas*, en tanto que la segunda contiene a los géneros *Stangeria* y *Bowenia* (Judd *et al.* 2008).

La familia Zamiaceae, con unas 90 especies, está presente tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo. Contiene ocho géneros: *Ceratozamia*, *Chigua*, *Dioon*, *Encephalartos*, *Lepidozamia*, *Macrozamia*, *Microcycas* y *Zamia*. Únicamente *Chigua*, *Ceratozamia*, *Dioon* y *Zamia* son exclusivos de América. En México los géneros *Ceratozamia* y *Dioon*, excepto *Dioon mejiae*, son típicamente endémicos, estos géneros representan el 95% de la riqueza de cícadas en el nivel nacional. De hecho, el número de especies de cícadas en el país (alrededor de 45) tal vez sea la mayor del mundo. Un caso notorio es el estado de Veracruz, que contiene diez especies. Contradictoriamente, hasta antes de 1975 sólo era conocido el 50% de las cícadas del país; a partir de 1980 y hasta la fecha se siguen describiendo nuevas taxa del grupo (Rzedowski, 1978; Whitelock, 2004). De manera similar a lo que ocurre en el resto de países en los que existen cícadas, en la actualidad casi todas las especies mexicanas enfrentan serios problemas de supervivencia en su medio natural. *Dioon edule* no es la excepción; es una especie amenazada por diversas presiones antropogénicas (Vazquez-Torres *et al.* 1999). Las causas son poblaciones escasas, destrucción del hábitat como talas, quemas, pisoteo por el ganado, ampliación de la frontera agrícola y ganadera, entre otras.

2.2 Biología de las cicadáceas

A las cícadas se les conoce como 'fósiles vivientes', lo cual indica que han cambiado muy poco durante millones de años (Grealuch y Adams, 1976; Rost *et al.* 1988). Las especies de cícadas difieren entre sí en su forma de crecimiento, comportamiento de producción de conos masculinos y femeninos, tamaño y número de los mismos; tamaño de semilla, longevidad, polinización, agentes de dispersión, tolerancia a la sequía y a la sombra, así como su capacidad para resistir incendios. Estos factores influyen en su distribución (Negrón-Ortiz y Gorchov, 2000).

A pesar de las numerosas diferencias entre las especies, todas las cícadas comparten algunas características, entre ellas: crecen con relativa lentitud, tienen una corteza primaria conformada de parénquima y rica en fécula, que las hace vulnerables al moho, por lo tanto, la mayoría de las especies viven en suelos bien drenados, de lo contrario, sus tallos se dañarían fácilmente, en este contexto, cuando las plantas se extraen de su hábitat natural la mortalidad es alta. Además, todas las especies son dioicas, sus embriones se desarrollan lenta pero continuamente hasta la germinación de la semilla, la cual sucede pocos meses después de la dispersión, en consecuencia la vida de las semillas es relativamente corta y está sometida a daños por desecación. Presentan raíces coraloides-contráctiles, las cuales realizan una doble función, contienen cianobacterias que fijan nitrógeno atmosférico que les permite sobrevivir en medios pobres en nutrientes, como afloramientos de piedra caliza, dunas y acantilados escarpados; por otro lado, las raíces contráctiles, evitan que el meristemo apical alcance la superficie del suelo, sobre todo en estadio de plántulas protegiéndolas de sequías e incendios (Keppel, 2001).

2.2.1 Polinización

Los estudios realizados en los últimos 15 años han mostrado que los insectos son los principales polinizadores de muchas cícadas, la mayoría son especies de escarabajos y tisanópteros que polinizan a estas especies, algunas de ellas polinizan una sola especie. La especificidad de estas interacciones ha planteado cuestiones sobre si los sistemas de polinización fracasarán al disminuir las poblaciones de cícadas. Estudios en poblaciones silvestres indican que cuando las cícadas disminuyen a menos de 150 plantas, la abundancia de polinizadores disminuye y las plantas experimentan frecuentemente una reducción en la producción de semillas. Cuando las poblaciones se reducen a menos de 50 plantas, con frecuencia los polinizadores ya no las visitan (Newell, 1983).

2.2.2 Fecundación

La fecundación es un proceso poco estudiado en las cícadas y está caracterizado por el desarrollo de células espermáticas multiflageladas, poco comunes en las plantas con semillas actuales. Estas células desde que fueron observados en 1896 por Ikeno, han representado un hito en la historia de la morfología vegetal. En el caso de la familia Zamiaceae las células espermáticas son de gran tamaño, aproximadamente 180 micrómetros de diámetro y para el caso de *Dioon edule* llegan a alcanzar los 230 a 300 micrómetros al momento del desarrollo del tubo polínico. Estas células pueden presentar de cientos a miles de flagelos, en el caso de *Zamia pumila* se han encontrado cerca de 50 000 (Gifford y Foster, 1988).

La fecundación en las Cícadofitas inicia con el transporte del grano de polen, constituido por una célula protálica, una generativa y la célula del tubo al óvulo. La

célula del tubo polínico se elonga y conduce a la célula generativa hasta la cámara arquegonial. Durante esta etapa la célula generatriz se divide y forma dos células espermáticas, mismas que presentan un movimiento libre y vigoroso dentro del tubo polínico, cuando la célula protálica y la célula del tubo polínico se desintegran, las dos células espermáticas son descargadas dentro de la cámara arquegonial junto con una pequeña cantidad de líquido, éste permite a las células espermáticas moverse y penetrar al interior del arquegonio para llegar a la célula huevo. En esta fase una de las células espermáticas penetra al citoplasma de la célula huevo y se lleva a cabo la fertilización (fig. 1). Es importante destacar que varias células espermáticas pueden entrar al arquegonio, pero sólo uno de los núcleos masculinos logrará fertilizar, mientras que los otros degeneran (Gifford y Foster, 1988).

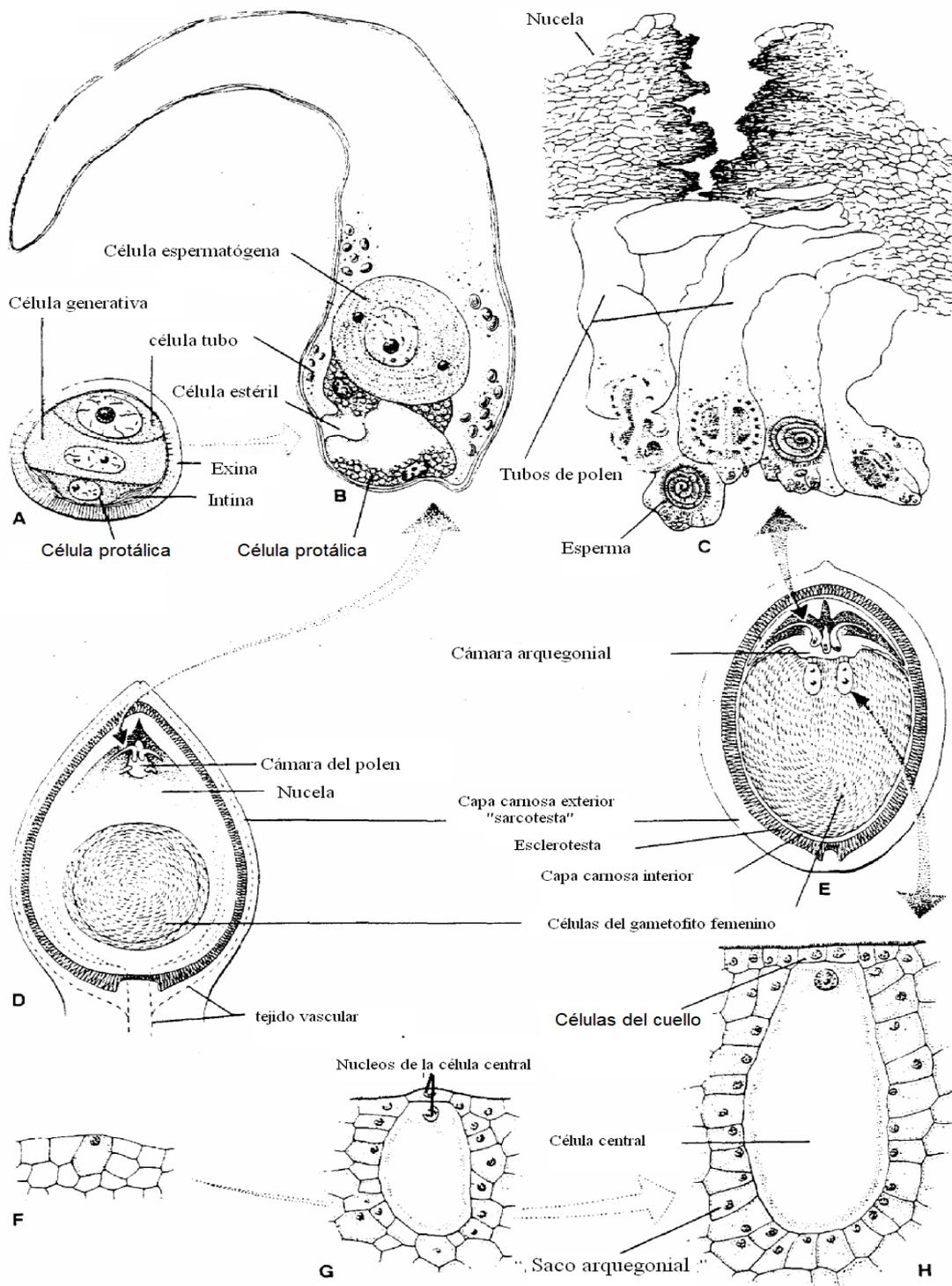


Fig. 1. Ciclo reproductivo en cícadas. A-C desarrollo del gametofito masculino en *Cycas*; D, diagrama de una sección longitudinal del óvulo de *Dioon edule* en una etapa temprana del desarrollo del tubo polínico; E, Diagrama de la sección longitudinal del óvulo de *Dioon edule* mostrando los tubos polínicos en la parte apical de la cámara arquegonial y la posición de los arquegonios en el gametofito femenino; F-H, se observa la ontogenia del arquegonio en *Dioon edule* (modificado de Gifford y Foster, 1988).

El proceso de fecundación en las cícadas y en general en las gimnospermas es tardado y desfasado en el tiempo, es decir, existe un periodo de tres a diez meses entre la polinización y la fecundación. Del mismo modo, una vez ocurrida la fecundación deben transcurrir de uno a ocho meses, para el desarrollo y maduración del embrión en el caso de *Dioon* y de uno a tres meses en *Zamia* y *Ceratozamia* (Mauseth, 2003).

2.2.3 Crecimiento y reproducción

Aunque las cícadas son plantas generalmente longevas y de lento crecimiento, hay al menos tres formas que difieren en longevidad y tasa de crecimiento: plantas con tallos subterráneos de pequeño a mediano tamaño, con tallos aéreos aislados y con tallos múltiples. Las especies con tendencia a desarrollar tallos múltiples, pueden tener ciclos de vida particularmente largos, en donde los renuevos sustituyen a los tallos viejos. Los estudios de campo indican que las especies con tallos pequeños e individuales, tienen ciclos de vida más cortos que las de tallos mayores o con tendencia a producir retoños. Al respecto, se ha determinado que algunas plantas en su hábitat natural pueden llegar a supervivir hasta casi 1 000 años (Whitelock, 2002), sin embargo, se tienen datos que establecen la longevidad de las cícadas en función del género y la especie, por ejemplo *Encephalartos villosus* que se desarrolla en sotobosques y presenta talla pequeña alcanza una edad máxima de 125 años, mientras que, especies de talla mayor como *Dioon edule* pueden alcanzar los 1 000 años de longevidad (Vovides, 1990; Donaldson, 1995). No siempre las plantas de talla mayor son necesariamente longevas, en particular, Vogel *et al.* (1995) estimaron que especímenes de 3 metros de *Encephalartos transvenosus* tenían sólo 150 años.

La edad hasta la primera reproducción varía considerablemente entre especies y también depende de las condiciones de crecimiento. En ambientes controlados, se ha observado que algunas especies de *Zamia* tardan sólo entre dos o tres años en alcanzar la edad reproductiva, en tanto que otras cícadas pueden tardar entre 12 y 15 años (Jones, 1993; Whitelock, 2002). El crecimiento es generalmente más lento en condiciones naturales. Por ejemplo, estudios realizados por Raimondo y Donaldson (2003) en *Encephalartos* indican que la edad a la que se desarrolla el primer cono puede variar de 15 a 40 años, según la especie.

La producción de semillas es esporádica en la mayoría de las poblaciones de cícadas. Algunas especies pasan largos períodos sin desarrollar semillas, seguidos de un episodio de gran producción de las mismas, ocasionado por factores extrínsecos como el fuego. Distintas plantas pueden producir estróbilos cada pocos años, pero Vovides (1990) calculó intervalos de hasta 52 años. Durante episodios de producción sincronizada de estróbilos, una población integrada por varios centenares de plantas puede producir decenas de miles de semillas. Normalmente sólo sobrevivirán unas cuantas de ellas, que fueron dispersadas a sitios adecuados, donde son protegidas de la desecación y la depredación por roedores (Vovides, 1990). Otras especies producen estróbilos femeninos en forma más errática sin relación aparente con sucesos ambientales, estas poblaciones producen relativamente pocas semillas durante cada fase de reproducción (Raimondo y Donaldson, 2003).

2.2.4 Dispersión

Las cícadas tienen semillas grandes, con una sarcotesta de colores variados. Animales como aves, roedores, marsupiales pequeños y murciélagos que comen frutos, son atraídos por la brillante y coloreada sarcotesta, consumen ésta y dispersan la semilla. Vovides (1990) señaló que las semillas de *Dioon edule* son dispersadas por *Peromyscus mexicanus*, roedor que consume una buena parte de las semillas producidas en una temporada, sin embargo, muchas de ellas son almacenadas en diversos sitios por el ratón y germinan en estos lugares protegidos. El radio de dispersión de las semillas depende de la distancia a la que los animales puedan llevárselas.

Un grupo de especies de cícadas pertenecientes a la subsección *Rumphiae* tienen semillas con una capa esponjosa y se dispersan al flotar en el agua. Las especies de este grupo están distribuidas ampliamente en las islas del océano Índico y del Pacífico occidental y en las costas de Asia sudoriental (Dehgan y Yuen, 1983).

2.2.5 Respuesta a la recolección

Se dispone relativamente de pocos datos sobre la respuesta de las cícadas a la recolección de individuos, conos y semillas. Cabe esperar que las especies con distintos ciclos biológicos tengan respuestas diferentes. Modelos de simulación, basados en diez años de datos obtenidos en el campo de dos especies con distintos ciclos biológicos, han mostrado que las poblaciones de cícadas son en general sumamente sensibles a la extracción de plantas adultas (Raimondo y Donaldson, 2003). Esto se debe a la lenta tasa de sustitución de las plantas en la población. Según este estudio, las especies con varios tallos y de lento crecimiento tardan mucho más en

recuperarse que las especies pequeñas o de más rápido crecimiento. En cuanto a las semillas, los modelos indican que las poblaciones de cícadas pueden tolerar elevados niveles de recolección, sobre todo en el caso de especies que producen conos anualmente y de forma sincronizada. Esto quiere decir que la recolección de plantas adultas sólo debe hacerse en las poblaciones grandes o en las que tienen una gran proporción de plantas jóvenes. En cambio, la recolección de semillas puede hacerse incluso en poblaciones relativamente pequeñas.

2.3 Diversidad de las Cycadophyta

La división Cycadophyta está considerada como un grupo primitivo de gimnospermas, que presenta distribución restringida en casi todos los continentes y que en la mayoría de los casos, sólo incluye pocos géneros y pocas especies. En el cuadro siguiente se presenta la diversidad reconocida (Stevenson, 1992).

FAMILIA	GÉNERO	Nº DE ESPECIES	DISTRIBUCIÓN
Cycadaceae	<i>Cycas</i>	20	Este de África, India, Japón y Australia.
Stangeriaceae	<i>Stangeria</i>	1	Sudáfrica.
Zamiaceae	<i>Zamia</i>	30-40	México, Florida.
	<i>Microcycas</i>	1	Cuba.
	<i>Ceratozamia</i>	6	México y Guatemala.
	<i>Dioon</i>	4	México y Honduras.
	<i>Encephalartos</i>	35	África y Australia
	<i>Macrozamia</i>	14	Australia y Bolivia
	<i>Lepidozamia</i>	2	Bolivia
Boweniaceae	<i>Chigua</i>	2	Colombia
	<i>Bowenia</i>	2	Australia

Cuadro 1. Diversidad y distribución de las familias, géneros y especies de la división Cycadophyta.

2.4 Descripción de *Dioon edule* Lindl.

Plantas arborescentes, en forma de palma, hasta de 5 m de altura, la mayoría 2-3 m; tronco erecto, raramente semipostrado, cilíndrico, robusto, hasta de 30 cm de diámetro en la base, algunas veces con vástagos originados en el tronco o con ramas aéreas; corteza grisácea a parduzca oscura, áspera, tapizada por las bases persistentes de los pecíolos. Hojas 8-50 o más, apicales en su corona, pinnadas, planas, de color verde claro, de 0.8-1.3 m de largo, 15-23 cm de ancho en la porción media, más o menos rígidas, las hojas jóvenes de color verde pálido a amarillento, pubescentes en el envés, el indumento persistente en el pecíolo y raquis; foliolos 75-110 pares, subopuestos, linear-lanceolados, de 6-10 cm de longitud, 5-9 cm de ancho, coriáceos a rígidos, los márgenes lisos o denticulados en las plantas jóvenes, inermes, el ápice pungente; nervios 9-12; pecíolo de 17-22 cm de largo, frecuentemente pubescente o lanoso en la base; catafilos de 7-12 cm de largo, 3.0-3.5 cm de ancho en la base, lanosos en la cara exterior. Microstrobilos parecidos a una mazorca de maíz, cónicos a casi cilíndricos, erectos, de color verdoso a cremoso, o moreno claro cuando maduros, alargados, de 20-35 cm de largo, 6.0-8.5 cm de diámetro; microsporófilos peltados, de 20-33 mm de largo, 1-1.3 cm de ancho; microsporangios numerosos; adheridos a la superficie interna, globosos, dehiscencia longitudinal; megastrobilos apicales, solitarios o dobles, ovoides, rodeados por un conjunto de catafilos lanosos, erectos cuando jóvenes hasta ligeramente inclinados o colgantes al madurar, de 25-30 cm de largo, 15 cm de diámetro; pedúnculo cilíndrico; de 8-12 cm de largo, 1.5-2.5 cm de diámetro, tomentoso, de color moreno claro; megasporófilos triangulares, de color grisáceo a moreno claro en la superficie externa, de 5-8.5 cm de largo, 3-4.5 cm de ancho en la base, escamosos,

lanosos. Semillas ovoides a casi esféricas, blanquecinas, resistentes, lisas, con caras poco aparentes, de 2.3-3.5 cm de largo, 2-2.5 cm de diámetro con el tegumento carnosos, amarillento y endurecido; número cromosómico $2n = 18$ (Marchant, 1968).

***Dioon edule* var. *angustifolium* (Miq.) Miq.**

Se distingue por sus foliolos delgados de (3.5) 4-6 mm de ancho por 6-11 (16) cm de largo, escasamente pubescentes; generalmente glaucos cuando jóvenes, insertados en un ángulo agudo sobre el raquis; raquis semiterete a subterete. Semillas 4-6 cm³ en volumen (De Luca *et al.* 1982).

2.5 Importancia biológica y económica de *Dioon edule* var. *angustifolium*

Este taxón se encuentra en bosques o matorrales de *Juniperus* y en bosques tropicales caducifolios, característicos de regiones con clima cálido y pronunciada temporada de sequía. Se distinguen por ser plantas en donde las hojas igualan o superan la altura del tronco. Se cultiva a veces como ornamental y la decocción de las semillas se emplea en medicina tradicional por los algunos grupos indígenas de Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí contra neuralgias, en la actualidad es uno de los contados representantes de un grupo de plantas que en épocas geológicas anteriores era muy diversificado y abundante.

Produce conos de agosto a octubre, aunque este proceso no se verifica año con año. Aunque la planta es venenosa para el ganado, las semillas cocidas se comen en épocas de escasez de otros alimentos.

El comercio internacional de ésta especie es considerable y genera varios millones de dólares anualmente; estas prácticas y la destrucción de su hábitat afectan severamente la regeneración natural de *Dioon edule*, por lo tanto, esta especie, según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL 2001, está considerada como amenazada de extinción y se encuentra en la lista del Convenio Internacional para el Comercio de Especies Amenazadas (Glafiro *et al.* 2004).

2.6 Semillas en Cycadophyta

La semilla se define desde el punto de vista botánico como un óvulo maduro, encerrado en un ovario o fruto en el caso de las angiospermas; en las gimnospermas no existe ovario y no se forma fruto, en su caso, el óvulo es desnudo y se encuentra en la base de una megasporófila que en conjunto constituyen al estróbilo o cono femenino. Tiene su origen después de la fertilización de la ovocélula por un núcleo espermático, debido a este proceso el ovulo comienza a mostrar los cambios que dan como resultado la formación de la semilla que está constituida por tres elementos, testa o cubiertas seminales, embrión y tejido nutricional, en el caso de las cycadophyta este último procede de las células del gametofito, también conocido como tejido nucelar, que se dividen para almacenar nutrientes. El embrión se forma a partir de la fertilización de la ovocélula por parte de una célula espermática. El proceso de la polinización y el

posterior desarrollo del tubo polínico, así como la fecundación, son procesos que se encuentran desfasados y que requieren de mucho tiempo, en algunos casos varios meses (Moreno, 1996). Por esta razón la fecundación es uno de los procesos más críticos durante el ciclo de vida de las cicadáceas y en general de las gimnospermas. Después de madurar tanto morfológicamente como fisiológicamente, la semilla puede tardar mucho tiempo para germinar, después de desprenderse (Keppel, 2001).

Las semillas de *Dioon edule* presentan dos tipos de cubiertas seminales, una conocida como sarcotesta que corresponde a un tejido carnososo que tiene la función de protección contra la desecación y que en algunos casos permite la dispersión de la semilla o promueve un estado de latencia exógeno de tipo químico al concentrar sustancias inhibitoras de la germinación. La segunda capa seminal corresponde a la esclerotesta, que es una barrera dura que protege al embrión y que además le puede conferir una latencia de tipo mecánica (Gifford y Foster, 1988).

2.7 Germinación en las gimnospermas

Las semillas de gimnospermas al igual que las angiospermas requieren de un sustrato húmedo, aeración y temperatura adecuada para su germinación. Por lo general presentan germinación epigea aunque en el caso de *Ginkgo biloba* es hipogea. Se considera que la germinación en este grupo de plantas es un proceso lento y depende en gran medida de los factores ambientales, tales como temperaturas extremosas, fuego e insolación. En el caso de Cicadaceae las semillas tardan en germinar hasta dos años, después de que se completa el desarrollo del embrión (Gifford y Foster, 1988).

2.8 Latencia en Cycadaceae

Una parte importante de las especies que se reproducen por semilla, poseen algún impedimento para su germinación, comúnmente conocido como quiescencia, latencia, letargo o dormancia (Patiño *et al.* 1983; Willan, 1991).

Para las semillas de Cycadaceae se han establecido tres tipos de letargo que están interrelacionados. El primero está en función de la sarcotesta que tiene un efecto inhibitorio en donde el ácido abscísico (ABA) o sustancias con propiedades similares son las responsables. El segundo depende de la dureza de la esclerotesta y el tercero debido al embrión inmaduro que presentan la mayoría de las cicadas. En varias especies, remover la sarcotesta es suficiente para permitir la germinación, como en *Dioon*, *Macrozamia*, *Lepidozamia*, *Zamia loddigesii* y *Z. fischeri* (Dehgan, 1983; Dehgan y Schutzman, 1989).

III HIPÓTESIS

La técnica de escarificación mecánica facilitará y aumentará el porcentaje de germinación de las semillas de *Dioon edule var. angustifolium*.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar el proceso germinativo de *Dioon edule var. angustifolium* en condiciones de invernadero.

4.2 Objetivos Particulares

- Describir el proceso germinativo de las semillas de *Dioon edule var. angustifolium*.
- Describir la morfología de las plántulas en sus diferentes estadios de desarrollo.

V MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Recolección de conos, semillas y caracterización ecológica del hábitat

Se recolectaron semillas y conos en dos localidades, una ubicada a 2 km del Mirador de los Altares rumbo a Linares Nuevo León, en un bosque de encino a 1 015 m de altitud y la otra en los límites de Nuevo León y Tamaulipas, entre Villa Mainero e Ibarrilla a 1 500 m de altitud, en un ecotono entre Bosque Tropical Caducifolio, Bosque de Encino y Bosque Espinoso.

La recolección se realizó de acuerdo con las indicaciones del manual de propagación y cultivo de cycadas (Pérez y Vovides, 1994). Se descartaron los conos pequeños y cerrados, ya que contienen semillas inmaduras. Únicamente se recolectó en una de las localidades, un cono grande con las escamas abiertas, que presentó cierto grado de abultamiento. Se registraron en la libreta de campo los datos de georreferencia (latitud y longitud), altitud, temperatura ambiental promedio y pendiente de ambos sitios, así como el tipo de vegetación y las especies de plantas asociadas. Con la finalidad de conformar una muestra compuesta se recogieron en campo directamente del suelo 122 semillas. También se recolectó suelo de las inmediaciones de los ejemplares seleccionados que sirvió como sustrato para sembrar las semillas.

5.2 Morfología de conos y semillas

Se examinó y describieron algunas de las características morfológicas del cono y las semillas con base en la terminología botánica especializada (Font Quer, 1979; Moreno,

1984). Para ello, se registró el largo y diámetro del cono, sus escamas fueron separadas y medidas, se consideró en forma particular, el largo y el ancho, la textura, color y forma. Para el caso de las semillas, estas fueron separadas y clasificadas según su posición dentro del cono en: basales, medias y apicales, de cada uno de estos grupos se tomó una muestra y fueron pesadas con la ayuda de una balanza analítica, modelo Ohaus pionner y posteriormente se midieron con un vernier. Los datos obtenidos fueron analizados y se calcularon los parámetros simples de tendencia central y así conocer los valores promedio de las semillas y escamas en función de su localización en el cono.

5.3 Determinación del grado de madurez de los embriones

Con la finalidad de corroborar que las semillas presentaran el embrión maduro, se eligieron tres de ellas, según su posición en el cono, es decir, de las partes basal, media y apical, de la misma manera se eligieron dos de las semillas recolectadas del suelo. La determinación del grado de madurez consistió en cortar las semillas longitudinalmente para verificar que el embrión tuviera una longitud de por lo menos tres cuartas partes del tamaño de la semilla. Este tamaño según Pérez y Vovides (1994) indica que el embrión está maduro. En el lote de 235 semillas obtenidas del cono que no alcanzaron esta longitud, tuvieron que ser sometidas a un proceso de maduración de embriones mediante estratificación en frío. En cambio las dos semillas provenientes de la muestra

recolectada en el suelo presentaron el embrión maduro por lo que las 120 semillas restantes fueron ocupadas para la prueba de viabilidad y el proceso de germinación.

5.4 Viabilidad

Para determinar la viabilidad de las semillas recolectadas en campo y fuera de los conos se realizó la prueba cualitativa de flotación en agua que según Pérez y Vovides (1994), resulta ser eficiente y no destructiva. En este caso las 120 semillas fueron colocadas dentro de una cubeta con agua y se consideraron como viables las semillas que se hundieron, en cambio se descartaron las que flotaron, pues en ellas no se desarrolló el embrión y en su lugar se forman bolsas de aire que provocaron que las semillas flotarán.

5.5 Tratamientos pregerminativos

Con las semillas del cono recolectadas se realizó un tratamiento de postmaduración de embriones en dos modalidades. En la primera, 120 semillas permanecieron en el cono por 30 días y se almacenaron dentro de una caja de cartón a temperatura ambiente, posteriormente se eliminó la sarcotesta y se sometieron a un proceso de estratificación en arena húmeda entre 10 y 15 °C según lo recomendado en el manual para el cultivo y propagación de cycadas (Pérez y Vovides, 1994). El segundo grupo de semillas (115) se sometió directamente (fuera de los conos) a la estratificación con arena húmeda en las mismas condiciones para la maduración total del embrión (Pérez y Vovides, 1994).

5.6 Escarificación, siembra y porcentaje de germinación

Las semillas, recolectadas directamente del suelo que mostraron ser viables según la prueba de flotación, fueron sometidas a escarificación mecánica, lijándolas levemente en la región del micrópilo. Posteriormente fueron sembradas en macetas con capacidad para un kilogramo y se colocaron 4 semillas por maceta en una posición horizontal y sobre el sustrato. Finalmente las macetas con las semillas fueron introducidas a un invernadero rustico (fig. 2).



Fig. 2. Posición horizontal de las semillas y condiciones del invernadero rustico para la siembra de *Dioon edule* var. *angustifolium*.

El sustrato empleado consistió en suelo de las localidades de recolecta mezclado con arena, grava, tierra negra y tierra de hoja en proporción 1:1:1:1:1. El porcentaje de germinación se calculó dividiendo la cantidad de semillas germinadas, entre las sembradas, multiplicado este cociente por 100. Además se evaluó la tasa de germinación, cada tercer día se registró el número de semillas germinadas, se consideró como semilla germinada, aquella donde la radícula emergió de la testa; con estos datos se construyó la gráfica de germinación acumulada.

5.7 Morfología de plántulas

Con la finalidad de describir la morfología de las plántulas en cada estadio de desarrollo, se hicieron observaciones cada semana durante aproximadamente un año, para verificar el grado de crecimiento y diferenciación de las plántulas; se midieron y registraron los cambios en tamaño, diámetro, color y textura del hipocótilo, radícula, pecíolo y lámina del nomófilo (fig. 3). Al mismo tiempo se tomaron fotografías de cada estadio de desarrollo.

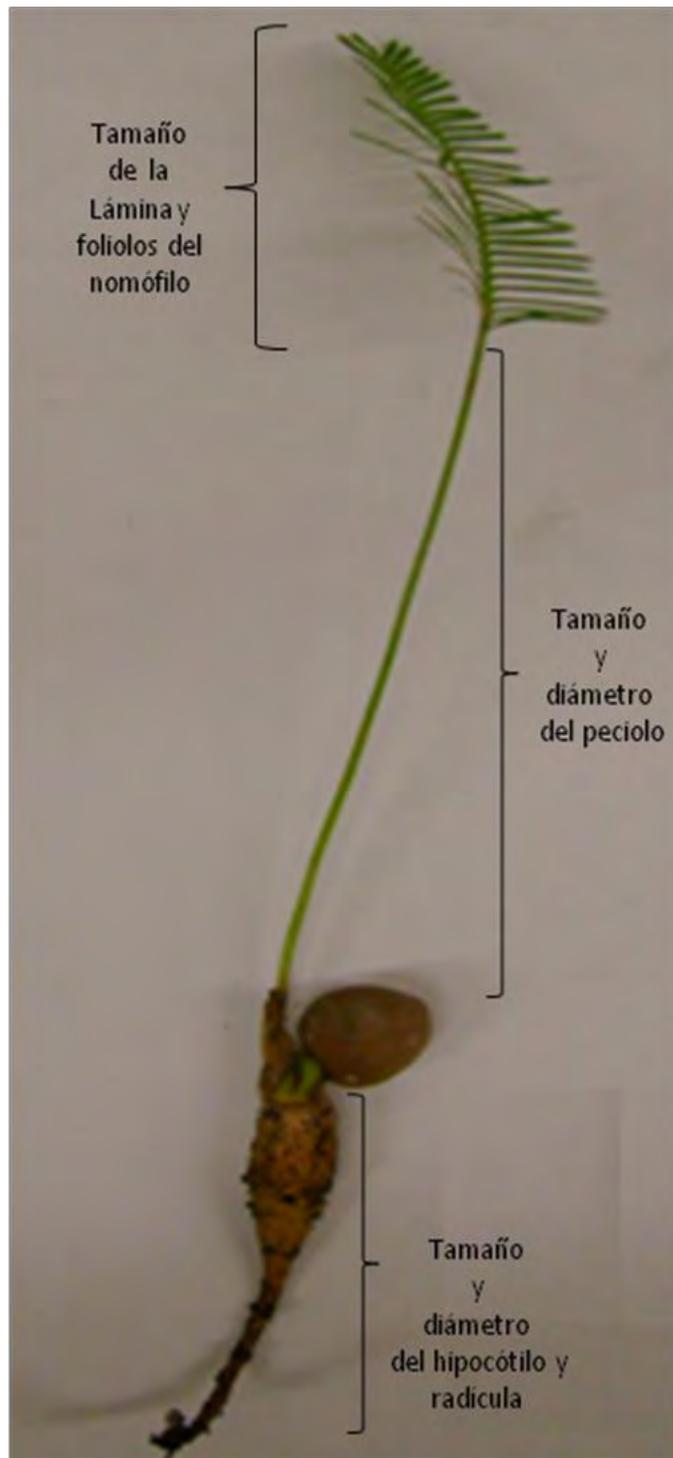


Fig. 3. Estructuras de la plántula de *Dioon edule* var. *angustifolium* que fueron medidas para determinar el grado de crecimiento y diferenciación.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Recolecta

En las localidades de recolecta, las poblaciones presentaron individuos de ambos sexos, principalmente ejemplares masculinos que en proporción correspondieron 7:1 con respecto a las plantas femeninas. En ambas localidades las poblaciones se encontraban en lugares con pendiente pronunciada, aproximadamente 60°, con suelo pedregoso originado de roca caliza (Redzinas) sobre sitios donde se acumulaba materia orgánica (fig. 4).



Fig. 4. Distribución agregada de *Dioon edule* var. *angustifolium* en pendientes pronunciadas en suelo pedregoso.

Se observó que las plantas masculinas se distribuían en la parte más baja de la pendiente y presentaron sus conos en un estado de degradación avanzado; mientras que, en la parte alta de la pendiente se encontraban pocas plantas femeninas con sus conos en estadio temprano de desarrollo, pero en general la población presentaba una distribución agregada. Esta distribución tan peculiar se puede explicar con base en las observaciones de Vovides (1990), autores que relacionaron la dispersión y distribución de *Dioon edule* con el comportamiento de *Peromyscus mexicanus* (fig. 5). Organismo que se alimenta de las semillas y que en algunos casos las puede almacenar enterrándolas en sitios seguros, por lo tanto, las que logran germinar y establecerse se distribuyen en forma agregada.

Por otro lado, es difícil que otros dispersores actúen sobre la población de *Dioon edule*, ya que las semillas presentan altos niveles de componentes tóxicos como son cicacinas, macrozaminas, neocacinas y el aminoácido neurotóxico β -N-metilamino-L-alanina (BMMA) (Schneider *et al.* 2002). Esta distribución agregada de la población se puede explicar en función de los factores topográficos como la pendiente pronunciada, esta provoca que en algunos sitios se acumule materia orgánica, en ellos se depositan las semillas que germinan y se establecen las plántulas tal y como lo documentaron Negrón-Ortiz y Breckon (1989); Negrón-Ortiz *et al.* (1996) y Pérez-Farrera *et al.* (2000), para varias especies de *Zamia*, *Zamia-Dioon* y *Ceratozamia* respectivamente. Otro factor que puede influir para esta distribución es el efecto de los incendios forestales, mecanismos que han sido registrados para *Zamia pumila* (Negrón-Ortiz y Gorchoy, 2000).

Se observaron semillas germinadas y plántulas en diversas etapas de desarrollo, siempre en lugares protegidos. En los sitios abiertos se pudieron reconocer una gran cantidad de semillas dañadas por la acción de hongos y algunos depredadores, a este respecto Dehgan (1983), estableció que las semillas tienen una corteza primaria medulosa y rica en fécula, que las hace vulnerables al moho. Por lo que se refiere a la mortalidad de las plántulas, ésta se relaciona con la depredación por roedores y la herbivoría foliar por la larva de la mariposa *Eumaeus debora*. Entre los factores abióticos, la deshidratación durante el periodo de sequia juega un papel importante y es muy probable que sea la principal causa de mortalidad de plántulas (Vovides, 1990).

Durante la recolecta de semillas y conos, fue importante considerar algunos aspectos sobre la producción y maduración de las semillas de cicadas, recomendadas por expertos.

Pérez y Vovides (1994), documentaron que el periodo de maduración de los conos femeninos varía según la especie. En el caso de *Zamia* y *Ceratozamia* la duración es aproximadamente de un año, pero en algunas especies de *Dioon* puede durar hasta dos años o más. De este modo, la recolecta se efectuó considerando sólo conos que presentaban las escamas abiertas y se descartaron aquellos de tamaño pequeño, que por lo general están inmaduros. En este mismo orden de ideas, Vovides (1990) indicó que una señal de maduración de conos y semillas, se relaciona con la presencia de escamas abiertas que a la vez indican que la sarcotesta se ha desarrollado completamente, presentando un color rojo característico de algunas especies de *Zamia*, blanco amarillento en *Ceratozamia* o amarillo en *Dioon* (Pérez y Vovides, 1994).

Con base en lo anterior, y al observar en campo los conos con escamas cerradas, se infirió que los embriones estaban inmaduros y las semillas en un estadio de desarrollo intermedio, ante esta situación Pérez y Vovides, (1994) propusieron los conos y las semillas deben someterse a un proceso de maduración que consiste en la estratificación en frío, ya que se tienen evidencias de que un almacenamiento en ambientes cálidos, puede ocasionar un desarrollo más rápido del embrión, pero la viabilidad disminuye considerablemente. En contraste, un almacenamiento en frío como el realizado en este trabajo, provoca que el embrión se desarrolle lentamente, con menor pérdida de viabilidad.

Por otro lado, la sarcotesta fue desprendida con el objeto de eliminar sustancias inhibitoras de la germinación, entre ellas, el ácido abscisico (ABA) u otras sustancias con propiedades similares responsables de este letargo químico. Estas sustancias químicas se originan a partir de los carotenoides, violaxantina por vía de producción de xantoxina en varias partes de las semillas maduras (Pérez y Vovides, 1994). Los carotenoides son del tipo α -caroteno y se almacenan conjuntamente con la cryptoxantina y la zeaxantina en los cromoplastos y son los responsable en *Cycas resoluta* del color anaranjado de sus semillas (Dehgan y Schutzman, 1989). Las semillas germinan sólo cuando la sarcotesta es removida o naturalmente eliminada. Además, la sarcotesta presenta una serie de sustancias tóxicas, entre ellas, varios glicósidos comúnmente referidos como cicasinas, neocasinas y macrozaminas (Whiting, 1963), estas no tienen efecto alguno sobre la germinación, pero si en su dispersión. A este respecto, González (1990) y Vovides (1990) señalaron que el único dispersor es *Peromyscus mexicanus*, el cual ha desarrollado la habilidad para consumir la semilla

mediante un mecanismo de detoxificación que implica el consumo simultáneo de otro tipo de semillas.



Fig. 5. *Peromyscus mexicanus* roedor que se alimenta y dispersa las semillas de *Dioon edule* var. *angustifolium*.

6.2 Morfología de conos y semillas.

El cono masculino o microestróbilo tiene forma cónica a casi cilíndrica, de 20 a 35 cm de largo y 6.0 a 8.5 cm de diámetro, presenta un color verde-pálido a crema o pardo claro al madurar, sus microesporófilas son cuneiformes de 2.0 a 3.3 cm de largo y de 1.0 a 1.3 cm de ancho, ápice triangular ascendente; lo cual concuerda con lo indicado en descripción de la especie (fig. 6).

La mayoría de los conos masculinos que se encontraron en el campo presentaban una fase muy avanzada de descomposición, donde las escamas se han abierto y caído por lo que han liberado el polen varios meses atrás.



Fig. 6. Corte transversal del microestróbilo o cono masculino de *Dioon edule* var. *angustifolium*.

El megaestróbilo tiene forma ovoide con 25 a 30 cm de largo y 15 a 20 cm de diámetro, los juveniles son erectos y se inclinan ligeramente al madurar, pedúnculo cilíndrico, de 8 a 12 cm de largo, 1.5 a 2.5 cm de ancho, ápice ascendente. Se registraron 160 escamas, lanosas, peltadas, triangulares de 5.0 a 8.5 cm de largo y de 3.0 a 4.5 cm de ancho con ápice ascendente. En su parte interna llevan dos semillas, excepto las basales, sujetas mediante un funículo largo de cerca de 3 cm (fig. 7).

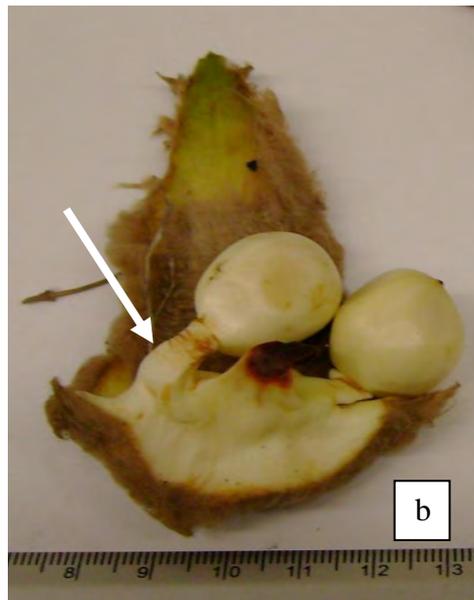


Fig. 7. Cono femenino de *Dioon edule* var. *angustifolium*. a) Megaestróbilo; b) megasporofila (escama) con semillas, la flecha señala al funículo.

Según Vovides (1990), las escamas del cono desarrollan dos semillas ovoides a casi esféricas. En el cono examinado en este trabajo, las semillas están dispuestas en función de su forma y tamaño, las ovoides, de tamaño mayor se encuentran en la porción basal a media del cono, mientras que, las esféricas y pequeñas se disponen hacia la parte apical (cuadro 2).

	Semillas esféricas	Semillas ovoides		Total
	Ápice	Parte media	Base	
Número de Semillas	60	84	96	240

Cuadro 2. Número de semillas de *Dioon edule* var. *angustifolium* en función de su forma y ubicación dentro del cono.

Las semillas miden de 2.0 a 2.5 cm de largo y 1.7 a 1.9 cm de diámetro, su peso promedio es de 3.026 g sin sarcotesta (fig. 8). La sarcotesta es una capa carnosa de color blanco amarillento con un espesor de 2-3 mm que se origina de la epidermis externa del tegumento del óvulo. Además presentan una capa interna lignificada, lisa de color crema-biege llamada esclerotesta, misma que se origina de la parte intermedia del tegumento del ovulo cuyas células se lignifican. Esta cubierta seminal es muy dura, impermeable y resistente, por lo cual actúa como una barrera física que impide la germinación, es por ello que se debe producir un adelgazamiento o daño mecánico para que el agua pueda penetrar y promover la germinación de la semilla. Por esta razón, una de las recomendaciones para la propagación de la especie, es escarificarlas antes de su siembra (Pérez y Vovides 1994).



Fig. 8. Secuencia de maduración de las semillas de *Dioon edule* var. *angustifolium*. En el extremo izquierdo se aprecia la semilla con sarcotesta, el embrión maduro se muestra con una flecha en el extremo derecho.

6.3 Obtención de las semillas y maduración de embriones

Del cono recolectado en campo se obtuvieron 240 semillas y del suelo del área de estudio se recogieron otras 122. Para obtener las semillas del cono se separaron las escamas y se verificó en campo el grado de madurez de los embriones, para esto, dos de ellas provenientes de las escamas de la parte media, se cortaron longitudinalmente y se observó el embrión el cual no se encontraba completamente desarrollado, posteriormente se analizaron otras tres semillas una de la parte apical, una de la parte media y otra de la parte basal del cono y al encontrar el embrión inmaduro se aplicó el procedimiento de maduración propuesto por Pérez y Vovides (1994). La estratificación duró tres meses, y al final de este periodo se analizaron las semillas y se observó que el embrión creció, pero a $\frac{1}{4}$ de largo del gametófito, es decir, no maduraron completamente. Por estas razones, las pruebas de viabilidad y germinación se realizaron con las semillas recolectadas en campo, las cuales al analizarlas

presentaron el embrión con un tamaño de $\frac{3}{4}$ de largo del gametofito, es decir, estaban maduras.

6.4 Pruebas de viabilidad

Para esta prueba se utilizó el método de flotación en agua que no es destructivo en comparación con la prueba del cloruro de tetrazolio debido a que el número de semillas disponibles para estimar la viabilidad fue bajo. El porcentaje obtenido fue de 90% calculado a partir de 120 semillas analizadas, de las cuales flotaron 12.

El fundamento de la prueba de flotación consistió en que las semillas con embriones inmaduros flotaron en el agua, lo mismo que aquellas cuyos gametofitos se ha deshidratado puesto que en este caso se separa de la esclerotesta y forma una bolsa de aire. Broome (1988) consideró que la prueba de flotación es efectiva, pero en muchas ocasiones las semillas descartadas todavía pueden germinar, pues en ciertos casos sólo flotan debido a una ligera deshidratación y con el simple hecho de remojarlas durante uno a dos días, se puede restablecer el agua perdida y entonces estas semillas germinarán.

Otra evidencia que puede indicar la inviabilidad de las semillas es el “cascabeleo”, efecto propiciado por el desecamiento del interior de la semilla que provoca disminución de su volumen, se forman bolsas de aire y las semillas suenan cuando se agitan, este es otro método no destructivo que puede ser empleado en campo para determinar si las semillas son viables o no.

6.5 Germinación

Se ha documentado por Dehgan (1983), que las semillas maduras de *Dioon edule*, germinan de 3 a 4 semanas después de haberse sembrado; en este trabajo se obtuvo una germinación a los nueve días de siembra.

En la figura 9 se muestra el tiempo en días que tardaron las semillas en germinar. De acuerdo con la gráfica, las semillas de *Dioon edule* var. *angustifolium* presentaron un porcentaje de germinación del 84% es decir, germinaron 91 de 108 semillas sembradas. Este dato al compararse con los citados en la literatura, se puede considerar alto, por ejemplo, Iglesias y Alba (2004), obtuvieron un porcentaje de 75%; por otra parte, Pavón (1999), registró un 76% y Vovides (1990) mediante métodos pregerminativos tales como la escarificación con ácido sulfúrico y la aplicación de ácido giberélico logró un porcentaje del 98%. La germinación inició al noveno día después de la siembra y alcanzó su máximo después de 36 días, este porcentaje es alto, pues Dehgan (1983), Pavón (1999), Sánchez (2003) e Iglesias y Alba (2004), mencionaron que la germinación de las semillas es difícil; en algunos de estos trabajos se indica que las semillas tardan hasta un año en germinar.

Por otro lado, López y Treviño (2008) obtuvieron para *Dioon edule* var. *angustifolium* un porcentaje de germinación del 90 % después de 76 días de la siembra bajo condiciones controladas de luz, sustrato, humedad y posición de la semilla, estos resultados al compararse con los obtenidos en esta investigación indican que la

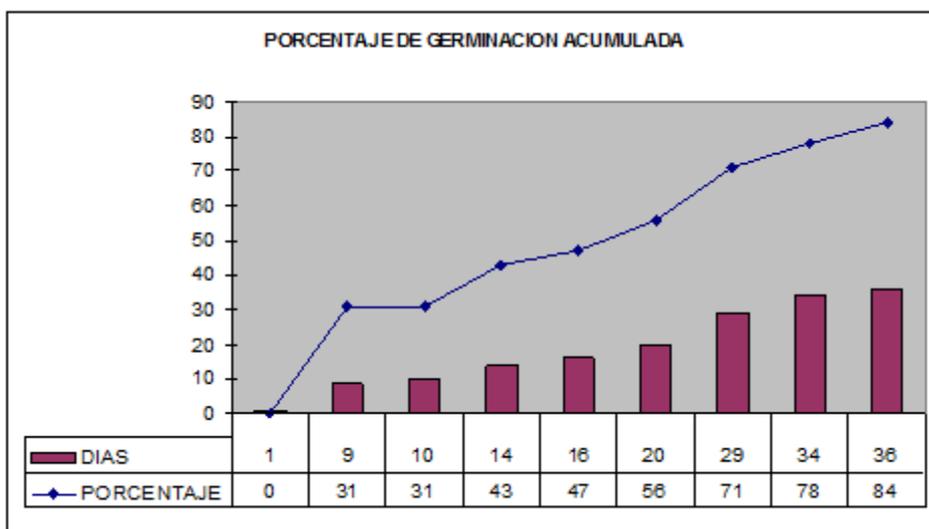


Fig. 9. Grafica de germinación acumulada de *Dioon edule* var. *angustifolium*.

escarificación efectuada permitió aumentar el porcentaje de germinación y acelerar el proceso en comparación con otros trabajos realizados con la misma especie (Pavón, 1999; Iglesias y Alba, 2004; López y Treviño, 2008). Al respecto, Broome (1988), sugirió que las semillas no requieren escarificación debido a que son capaces de absorber humedad por sí mismas y cuando tienen el embrión con un tamaño de $\frac{3}{4}$ del total de la semilla realmente germinarán una vez que haya la suficiente humedad y la temperatura en el área de crecimiento sea lo suficientemente alta. Sin embargo, en este trabajo se consideró adecuado aplicar una escarificación leve a las semillas para acelerar la germinación, tal y como lo aconsejan Smith (1978); Dehgan y Johnson (1983); Dehgan y Schutzman (1989); Dehgan y Almira (1993).

La germinación de las semillas estudiadas, ocurrió como en la mayoría de las especies de cicadas, es decir, únicamente germinaron aquellas que presentan el embrión completamente desarrollado, proceso que ocurre por lo común 12 meses después de la fecundación y depende de la especie. En este contexto, Broome (1988) señaló que la germinación exitosa de cicadas requiere del conocimiento de cuánto

tiempo de maduración necesita o ha tenido una semilla antes de sembrarse, debido a que hay algunas especies que tienen un desarrollo del embrión muy errático, por ejemplo, se ha encontrado que ciertas especies de *Encephalartos* y *Cycas* empiezan a germinar después de un tiempo corto a partir de su liberación del cono y otras semillas del mismo lote germinarán después de un año o algunas veces requieren hasta dos años.

Otro aspecto que es importante comentar, implica que si una semilla es sembrada antes de que el embrión madure, ésta puede absorber mucha agua, expandirse y crecer como si fuera a germinar; sin embargo muere, debido a que el embrión inmaduro es susceptible al ataque por hongos (Broome ,1988).

6.6 Morfología de la plántula y desarrollo postemergente

6.6.1 Emergencia de la radícula y elongación de la coleorriza.

La emergencia de la radícula y la elongación de la coleorriza fueron procesos importantes que se definieron con base en la ruptura de la esclerotesta y la aparición de estas estructuras embrionarias, las cuales se manifestaron a los nueve días posteriores a la siembra (fig.10). La aparición de la radícula a través de la esclerotesta ocurrió en la porción micropilar de la semilla. Para el caso de *Dioon merolae*, este proceso tarda 24 días y para *Ceratozamia norstogii* se necesitan 30 días (Pérez y Vovides 1994). Lo anterior refuerza la idea de que una escarificación puede acelerar la germinación en contraposición a lo recomendado por Broome (1988).



Fig. 10. Semilla germinada de *Dioon edule* var. *angustifolium*, nueve días después de la siembra. Se observa la emergencia de la radícula en la región micropilar.

La elongación del hipocótilo se muestra en la figura 11. Es importante señalar que el hipocótilo es de color verde y puede cumplir funciones fotosintéticas (Gifford y Foster, 1988). Durante esta fase y aproximadamente 42 días después de la siembra se forma en el ápice de la radícula, una capa mucilaginosa que contiene una gran cantidad de cianobacterias misma que se manifiesta con una coloración marrón.



Fig. 11. Semilla de *Dioon edule* var. *angustifolium* que muestra el hipocótilo elongado con una capa mucilaginosa marron.

Esta es una de las características distintivas de las raíces en las cicadáceas, mismas que en su córtex presentan una zona cilíndrica bien definida habitada por *Anabaena cycadeae*. La entrada de estas cianobacterias es a través de una fisura en la epidermis de la raíz y como respuesta, las células corticales secretan una gran cantidad de moco que aparentemente atrapa a las cianobacterias que se establecen en los espacios intercelulares del córtex. Esta asociación es muy importante para la plántula, debido a que *Anabaena* fija nitrógeno atmosférico para la síntesis de compuestos nitrogenados (Nathanielsz y Staff, 1975).

Storey (1968) encontró que en las células de la raíz, particularmente en la zona de las cianobacterias ocurre la reducción somática de los cromosomas, esto trae como

consecuencia la formación de una capa de células pequeñas y haploides en medio de células diploides grandes. Las células haploides forman una capa delgada que aparentemente proporcionan la vía óptima para el establecimiento de cianobacterias.

6.6.2 Crecimiento de la raíz

Aproximadamente a los 84 días después de la germinación se desarrolla una raíz napiforme (fig.12), misma que presenta un color blanco-amarillento con una gran



Fig. 12. Semillas de *Dioon edule* var. *angustifolium* con raíces primarias a los 84 días de la siembra.

cantidad de estrías y carencia de pelos radicales, las funciones de éstos son llevados a cabo por los filamentos de las cianobacterias (Gifford y Foster, 1988). La longitud de

esta raíz varía de plántula a plántula y puede ser de entre 1 a 2.4 cm (fig. 13). Para el caso de *Dioon merolae*, el desarrollo hasta esta etapa sólo requiere 40 días después



Fig. 13. Semillas de *Dioon edule* var. *angustifolium* con raíz napiforme y estrías.

de la siembra y presenta los mismos cambios morfológicos que incluyen la elongación de la radícula y el engrosamiento del hipocótilo. Esto hace pensar que el desarrollo de la raíz varía en función de la especie y puede deberse a las diferentes condiciones ambientales bajo las cuales crecen las mismas. En forma particular, *D. merolae* habita bosques tropicales subcaducifolios a una altitud de 900 a 1 100 m en climas cálido secos (De Luca *et al.* 1981). En el caso de *Dioon edule* var. *angustifolium* sus poblaciones se encuentran en bosques de encino y ecotonos de bosque tropical

caducifolio, bosque de encino y bosque espinoso a una altitud de 1 015 a 1 500 m en lugares con pendiente pronunciada, suelo pedregoso, sobre sitios donde se acumula la materia orgánica.

6.6.3 Desarrollo de raíces secundarias y evidencia de la emergencia de la plúmula.

A los 124 días después de la siembra, surgen las raíces secundarias, su desarrollo se origina en la región próxima a la capa de mucilago, precisamente en la porción de engrosamiento de la raíz napiforme, que presenta en esta etapa un diámetro de 7 mm. El número de raíces secundarias varía de 4 a 6 y en este momento la raíz principal presenta una longitud de 5.6 cm en promedio (fig. 14). Al mismo tiempo se empieza a



Fig. 14. Semilla *Dioon edule* var. *angustifolium* de 124 días que muestra el inicio del crecimiento de raíces secundarias.

manifestar la fisura de la coleorriza que representa el lugar por donde emergerá la plúmula y se desarrollará la primera hoja funcional (profilo), esta fisura o grieta, debe estar orientada hacia la superficie adaxial de la coleorriza para que el primordio de la hoja emerja sin problemas (fig. 15a). Cabe señalar que en algunas plántulas observadas, la fisura se desarrolló en la superficie abaxial y la plúmula no emergió sino hasta que la fisura se reorientó a su posición normal (fig. 15b). En el caso de *D. merolae*, después de cuatro meses de siembra, el hipocótilo se engrosa y la raíz se alarga hasta alcanzar una longitud de 25 cm y se inicia la formación de raíces laterales (Pérez y Vovides 1994). En este sentido, esta fase coincide para *Dioon edule* y *D. merolae*, sin embargo la longitud de la raíz en esta última es mayor.



Fig. 15. Radícula de *Dioon edule* var. *angustifolium* con fisura y yema pilosa. a) Se observa la fisura por donde emergerá la yema pilosa que dará origen a la hoja primaria, b) Reorientación de la fisura hacia la región abaxial.

A los 180 días después de la siembra se ha desarrollado la plúmula que en su fase temprana manifiesta todas sus partes estrechamente enrolladas en forma muy parecida a la de un resorte. En esta fase la hoja joven presenta una vernación circinada similar a la hoja de los helechos (fig. 16). Esta misma fase en el caso de *D. merolae* ocurre a los 150 días y a partir de este momento el tiempo de desarrollo entre ambas especies se vuelve muy diferente.



Fig. 16. Hoja de *Dioon edule* var. *angustifolium* con vernación circinada, en etapa de desarrollo temprano.

6.6.4 Elongación del peciolo y desarrollo de la lámina

A los 210 días posteriores a la siembra, la hoja todavía está enrollada y el peciolo se ha alargado y alcanza una longitud de 4 a 7 cm. En esta etapa se observa pubescencia de pelos largos y delicados que pueden condensar el vapor de agua y hacerla disponible

para la plántula. Posteriormente a los 252 días, la lámina se desenrolla y comienza su crecimiento, el cual puede considerarse que termina a los 259 días, ya que en este momento su textura cambia de papirácea a coriácea (fig. 17). *Dioon merolae* cumple esta fase a los 180 días posteriores a la siembra y se considera que la hoja ha alcanzado su desarrollo normal, que se manifiesta al cambiar la lámina de pubescente y flexible a glabra y coriácea. De la misma manera, en *Ceratozamia norstogii*, emerge la primera hoja con cuatro o seis folíolos a los tres meses después de de siembra (Pérez-Farrera, 1996). Después de 365 días de siembra, el peciolo mostró un tamaño de 10.5 cm de largo y 0.1 cm de ancho. El largo del raquis fue de 5.8 cm. Los folíolos fueron 34 en promedio con un tamaño que varía de (0.8)1.5 a 3.1 cm.

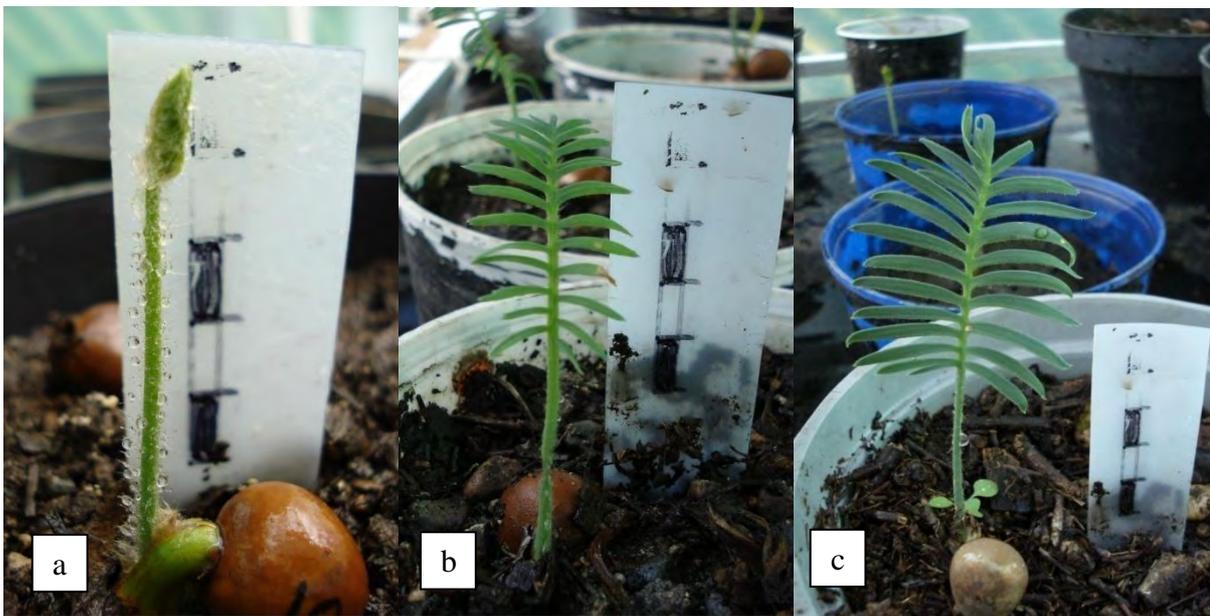


Fig. 17. Secuencia del desarrollo de la hoja de *Dioon edule* var. *angustifolium*. a) Muestra la elongación del peciolo y la vernación circinada; b) Los folíolos se desarrollan y la lámina se extiende, presentando textura suave y flexible; c) Los folíolos se endurecen y la lámina alcanza su madurez.

VII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La escarificación mecánica en la región micropilar es un proceso que acelera la germinación de las semillas de *Dioon edule* var. *angustifolium*. La estratificación como procedimiento para madurar embriones no fue efectivo en el caso de la especie estudiada, muy probablemente por la alta inmadurez de los embriones.

Durante el desarrollo del hipocótilo y la radícula se forma una capa de mucilago que permite a las semillas mantenerse en estado semilátente, esto posibilita a las semillas para resistir periodos de sequía y dispersarse a mayor distancia de la planta progenitora.

Bajo las condiciones de cultivo, el desarrollo postemergente de las plántulas de la especie estudiada puede considerarse lento. Por otro lado, Las temperaturas altas, superiores a 35 °C limitan el desarrollo de la misma forma que el exceso de luz. La emergencia de la plúmula depende de la orientación de la fisura en la coleoriza.

Es conveniente en la recolecta de conos y semillas, considerar la madurez de los embriones, en este caso, si el tamaño del embrión no alcanza los $\frac{3}{4}$ partes de la longitud de la semilla muy difícilmente podrán madurar mediante una estratificación.

Se recomienda no desprender los conos cuando los embriones no están maduros, es preferible recolectar semillas fuera de los conos que garantizan un alto porcentaje viabilidad.

La germinación no garantiza que todas las plántulas supervivan, pues durante su lento desarrollo algunas morirán. Es importante mantener la humedad y temperatura adecuada para un buen desarrollo de las plántulas, en este caso se recomiendan temperaturas no mayores de 35 °C, colocar las plantas en lugares sombreados y en

macetas grandes con capacidad de más de un kilogramo, para que se facilite el desarrollo de las raíces y por lo tanto el buen crecimiento de las hojas.

VIII LITERATURA CITADA

Broome, T. 1988. How to optimize cycad seed germination. *The cycad newsletter* **2**:10-13.

Cronquist, A. 1977. Introducción a la botánica, 2a. ed., Ed. CECSA, México, D.F.

Dehgan, B. 1983. Propagation and growth of cycads. A conservation strategy. *Proceedings of Florida State Horticultural Society* **96**: 137- 139.

Dehgan, B. y C. R. Johnson. 1983. Improved seed germination of *Zamia floridana* (*sensu lato*) with H₂SO₄ and GA₃. *Scientia Horticultural* **19**: 357-361.

Dehgan, B. y B. Schutzman. 1989. Embryo development and germination of cycas seeds. *Japan American Society Horticultural Scientia* **114**: 125-129.

Dehgan, B. y C. K. K .H. Yuen. 1983. Seed morphology in relation to dispersal, evolution and propagation of cycas. *London Botanical Gazette* **144**: 412-418.

Dehgan, B. y F. Almira. 1993. Horticultural practices and conservation of cycads in Stevenson D.W. and K. Norstog (eds.) Proceedings of Cycad'90. Second International Conference on Cycad Biology, Milton, Queensland.

- De Luca, P., S. Sabato y M. Vázquez-Torres. 1981. *Dioon merolae* (Zamiaceae), a New Species from Mexico. *Brittonia* **33**: 179-185.
- De Luca, P., S. Sabato y M. Vázquez-Torres. 1982. Distribution and variation of *Dioon edule*. (Zamiaceae). *Brittonia* **34**: 355-362.
- Donaldson, J. S. 1995. Understanding cycad life histories, an essential basis for successful conservation. In *Cycad conservation in South Africa: issues, priorities and actions*, ed. J. Donaldson. The Cycad Society of South Africa. Matieland.
- Donaldson, J. S. 2003. Cycads. Status survey and conservation Action Plan. IUCN/SSC. Cycad specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, U.K. IUCN. pp. 86.
- Font Quer, P. 1979. Diccionario de Botánica. Ed. Labor. Barcelona.
- Gifford, E. M. y A. S. Foster. 1988. Morphology and evolution of vascular plants. 3a. ed. W.H. Freeman and company. New York.
- Glaforo, J., C. G. Velazco., R. P. Foroughbakhch., V. Valdez y M. A. Alvarado. 2004. Diversidad Florística de Nuevo León: Especies en Categoría de riesgo. *Ciencia UANL* **7**: 209-218.

- González, A. C. 1990. Algunas interacciones entre *Dioon edule* (Zamiaceae) y *Peromyscus mexicanus* (Rodentia: Cricetidae). *La Ciencia y el Hombre* **5**: 78-92.
- Greulach, A. V. y J. E. Adams. 1976. Las plantas. Introducción a la Botánica Moderna. Ed. Limusa Interamericana, México, D.F.
- Iglesias, D. y J. Alba. 2004. Variación de semillas de *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae); en el Rancho el Niño, Veracruz, México. *Floresta Veracruzana* **6**:15-20
- Jones, D. L. 1993. Cycads of the world. Acent Plant in Today's Land scape. Smithsonian Institut Press. Washington, D.C. U.S.A.
- Judd, W., C. Campbell, E. Kellog y P. Stevens. 2008. Plant Systematics. Ed. Sinaver. Massachusetts.
- Keppel, G. 2001. Notes on the Natural History of *Cycas seemannii* (Cycadaceae). *South Pacific, Japan Natural Scientia*. **19**: 34-41
- López, D. A. y G. E. J. Treviño. 2008. Reproducción por semilla del Chamal (*Dioon edule* Lindley). *Raximhai* **4**: 45-55.
- Marchant, C. J. 1968. Chromosome patterns and nuclear phenomena in the cycad families Stangeriaceae and Zamiaceae. *Chromosoma* **24**: 100-134.

- Mauseth, J. D. 2003. Botany and introduction to plant biology. Jones and Bartlett publishers, Inc. Boston.
- Moore, R. 1998. Botany. 2^a. ed. Ed. Mc Graw Hill, México, D.F.
- Moreno, N. P. 1984. Glosario Botánico Ilustrado. Ed. CECOSA e INIREB., México. D.F.
- Nathanielsz, P. Ch. y Staff A. I. 1975. A mode of entry of blue-green algae into the apogeotropic roots of *Macrozamia communis*. *American Journal of Botany* **62**: 232-235.
- Negrón-Ortiz, V. D. y G. J. Breckon. 1989. Population Structure in *Zamia debilis* (Zamiaceae) 1: size clases, leaf phenology and leaf turnover. *American Journal of Botany* **76**: 891-900.
- Negrón-Ortiz, V. D., L. Gorchoy y G. J. Breckon. 1996. Population in *Zamia* (Zamiaceae) in northem Puerto Rico. II. Seed germination and stage-strutered population projection. *Journal of plant Science* **157**: 605-614.
- Negrón-Ortiz, V. D. y L. Gorchoy. 2000. Effects of fire and postfire herbivory on the cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae) in splash pine savanna, Everglades National Park, Florida. *International Journal of Plant Sciences* **161**: 659-669.

Newell, S. J. 1983. Reproduction in a natural population of cycads (*Zamia pumila* L.) in Puerto Rico. *Bolletín of the Torrey Botanical Club* **110**: 464-473.

Patiño, F. P., Y. De la Garza, Villagómez, I. Talavera y M. F. Camacho. 1983. Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales. México, D.F. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. *Subsecretaria Forestal. Boletín Divulgativo* N° 63.

Pavón, S. M. 1999. Germinación y Sobrevivencia de plántulas de *Dioon edule* Lindley (Zamiaceae) en su hábitat natural, Cerro del papayal- Alchichuca, municipio de Coatepec. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana. Xalapa.

Pérez, F. M. A. y P. A. Vovides. 1994. Manual para el cultivo y propagación de Cycadas. CONABIO, Instituto de Ecología A.C., Instituto De Historia Natural. México, D.F.

Pérez-Farrera, M. A. 1996. Informe final* del Proyecto C120. Proyecto piloto para el establecimiento de viveros in-situ para la propagación, conservación y comercialización de las cycadas *Dioon merolae* y *Ceratozamia norstogii* en la Reserva de la Biósfera La Sepultura, Chiapas. (Consultado 26 de noviembre de 2008). <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfC120.pdf>.

Pérez-Farrera, M. A., P. F. Quintana-Ascencio, B. Salvatierra-Izaba y A. P. Vovides. 2000. Population dynamics of *Ceratozamia matudai* Lyndl. (Zamiaceae) in El

- Triunfo Biosphere Reserve, Chiapas, Mexico. *Journal of the Torrey Botanical Club* **127**: 291-299.
- Raimondo, D. C. y J. S. Donaldson. 2003. Responses of cycas with different life histories to the impact of plant collecting: simulation models to determine important life history stages and population recovery times. *Biological conservation* **111**: 345-358.
- Raven, H. P., R. F. Evert y S. E. Eichhorn. 1999. Biology of plants. Ed. W. H. Freeman and Co. New York.
- Rost, T. L., M. G. Barbour., R. M. Thorton., T. E. Weier y C. R. Stocking. 1988. Botánica. Introducción a la biología vegetal. Limusa. México D.F.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa, México, D.F.
- Sánchez, J. L. M. 2003. Las Cycadas Fósiles del Pasado. [http:// www. Árboles ornamentales.com/_Las Cycadas Fósiles Del Pasado](http://www.Árboles ornamentales.com/_Las Cycadas Fósiles Del Pasado). Consultado 19-02-07.
- Sánchez, O., R. Medellín, A. Aldama, B. Goettsch, J. Soberón y M. Tambutti. 2007. Método de evaluación del riesgo de Extinción de especies silvestres en México (MER). Secretaria del medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México. CONABIO. México D.F.

- Santamarina, S. 1980. Biología y Botánica. Tomo II. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Scagel, F. 1983. El reino vegetal, los grupos de plantas y sus relaciones evolutivas. Omega, Barcelona.
- Schneider, D., M. Wink, F. Sporer y P. Lounibos. 2002. Cicads: their evolution, toxins, herbivores and insect pollinator. *Naturwissenschaften* **89**: 281-294.
- Smith, S. 1978. Seed scarification to speed germination of ornamental cycads (*Zamia* spp.) *Horticultural Science* **13**: 436-438.
- Stevenson, D. W. 1992. A formal classification of the extant cycads. *Brittonia* **44**: 220-223.
- Storey, W. B. 1968. Somatic reduction in Cicads. *Science* **159**: 648-650,
- Vazquez-Torres, M., L. Torres-Hernández y L. H. Bojórquez-Galván. 1999. Aprovechamiento sustentable y conservación de palma bola (*Zamia furfuracea*), especie endémica protegida, en la zona de los Tuxtlas, Veracruz. Informe de proyecto CONABIO: Q039. (consultada el 28 de noviembre de 2008)
- <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfQ039.pdf>.

- Vidakovic, M. 1991. Conifers Morphology and variation. Graficki Zavod Hrvatske. Zagreb.
- Vogel, J. C., H. Van der Merwe y N. Grobbelaar. 1995. The use of radiocarbon for determining the growth rate of arborescent cycads. In: Vorster, P. (ed.). Proceedings of the third international conference on cycad biology. *Cycad Society of South Africa, Stellenbosch, South Africa*. 115-119.
- Vovides, A. P. 1990. Spatial distribution, survival, and fecundity of *Dioon edule* (Zamiaceae) in a tropical deciduous forest in Veracruz, México, with notes on its habitat. *American Journal of Botany* **77**: 1532-1543.
- Vovides, A. P. y C. Peters 1987. *Dioon edule*: La planta más antigua de México. *Ciencia y Desarrollo*. **13**: 19-24.
- Whitelock, L. 2002. The Cycads. Timber Press, Portland. Oregon.
- Whitelock, L. M. 2004. Variation in the Mexican Cycad. *Dioon edule* (Zamiaceae). *The Botanical Review*. **70**: 240-249.
- Whiting, M. G. 1963. Toxicity of cycads. *Economic Botany* **17**: 271-302.
- Willan, R. L. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales, estudio con especial referencia a los tropicos. *FAO. Montes* **20**: 2-12.