

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

**ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES *in vitro* PARA LA
INDUCCIÓN DE MORFÓGENESIS EN *Dioon merolae* DE
LUCA SABATO Y VÁZQUEZ TORRES (ZAMIACEAE)
ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A
SANDRA LUZ CABRERA HILERIO

Director de Tesis Interno: Dr. Francisco Cruz Sosa

Director de Tesis Externo: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

México, D.F.

Marzo de 2009

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio 471-01 Doctorado en Biotecnología”

La alumna de doctorado Sandra Luz Cabrera Hilerio recibió el apoyo económico del CONACYT con el registro de becario No. 152390

Iztapalapa, D.F. a Marzo de 2009

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis

**Establecimiento de Condiciones *in vitro* para la inducción de Morfogénesis en *Dioon
merolae* De Luca, Sabato y Vázquez Torres (Zamiaceae) Especie en Peligro de
Extinción**

Que presentó

SANDRA LUZ CABRERA HILERIO

Comité Tutorial

Co-Director: Dr. Francisco Cruz Sosa
Universidad Autónoma Metropolitana

Co-Director: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor: Dra. Judith Márquez Guzmán
Universidad Nacional Autónoma de México

Comité de Evaluación

Presidente: Dra. Elsa Bosques Molina
Universidad Autónoma Metropolitana

Secretario: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila
Universidad Nacional Autónoma de México

Vocal: Dra. Judith Márquez Guzmán
Universidad Nacional Autónoma de México

Vocal: Dra. Leticia Buendía González
Universidad Nacional Autónoma del Estado de México

PRÓLOGO

Cuando me fui de casa en busca de mis sueños, fueron muchas las palabras de aliento pero otras más de desánimo. Me he dado cuenta que a lo largo de los años, vamos caminando hacia nuestros sueños, sueños en que buscamos encontrar nuestra misión en la Tierra. Que al final es buscar y descubrir nuestro propio camino. En esta búsqueda encontré que en el amar existe la verdadera fuerza para luchar por las cosas que se desean, que nada puede impedir lograrlos si confías en tu constancia, perseverancia y Fe.

Muchos fueron los conocimientos adquiridos dentro de un salón de clases, pero los mejores fueron las de mis profesores, compañeros y amigos que me dieron enseñanzas no plasmadas en papel y son sabidurías hechas experiencias las cuales deseo destacarlas, ya que en ellas adquirí el conocimiento de que nadie puede ocupar nuestro lugar, ni hacer las cosas que nos corresponde hacer... entendí que esforzarse por hacer cada día mejor lo que hacemos, en aquello que sabes y que puedes hacer con paz, serenidad, belleza y alegría nos lleva a un quehacer científico más allá de lo que uno mismo se imagina.

Esta tesis esta dedicada a todos aquellos que tienen la capacidad de realizar maravillas y poseen esa pasión por la naturaleza y se preocupan por hacer acciones en el cuidado de nuestro planeta, usando su propia voluntad; y a todos aquellos que quieren crecer por sí mismos y ayudar al crecimiento de los demás.

He pues aquí, que les dedico esta tesis que plasma partes de un gran sueño que me imagine hace algunos años cuando emigre de mi Chiapas querido.... fueron muchas las dificultades, nada fue fácil pero la enorme satisfacción del sueño alcanzado, me da confianza para luchar por los nuevos sueños y ser cada día un mejor ser humano.

Con todo mi amor y especialmente para todos ustedes.

Sandra Luz

DEDICATORIA

Para un ángel, † Gabriel,

Hoy quiero dedicarte mi sueño más anhelado, el testimonio de todo lo que hiciste por mí plasmada en esta tesis, para que desde el cielo te sientas orgulloso y le digas sonriendo a mi Amigazo Dios: “Esa es mi hermana Sandra...”...

Seguiré luchando como tú me enseñaste, teniendo siempre presente, que todo lo que sueño, podré lograrlo; si confío plenamente en mí misma y en Dios....desde donde te encuentres hermano, ten presente que en cada día estás en mi corazón.

Siempre Amigos, siempre hermanos

A Dios, Porque la fuerza del Espíritu, siga transformándome para que sepa amar la vida, como el primero de los valores, sin que las limitaciones, angustias, odios o ambiciones lleguen a socavarla. Gracias Dios, por enseñarme que hay que amar la vida sea cual sea nuestra condición, y hacer una filosofía de ésta, basada en una ética moral y valores. Gracias por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de tu infinita bondad y amor.

A mis padres, reciban esta modesta dedicatoria, por ser siempre personas admirables para mí, que con su entrega, comprensión, amor y sus sabios consejos han orientado mis pasos por el camino recto de la vida.

Hago votos para que mis logros les colmen hoy y mañana les llenen de orgullo, recuerden siempre que la gloria más grande que tengo es ser hija suya les amo inmensamente.

A Darinel y Antonio, les agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia, porque siempre he contado con ellos para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por el apoyo y amistad... gracias!

A Roberto, Mi gran AMOR, eres la persona que me llena de motivación, orgullo para seguir siendo quien soy, tú hiciste realidad miles de sueños, porque me has enseñado a luchar por hacerlos realidad, y ayudarme a ver posible, aquello que parecía imposible... (como tu amor!!)... por ser mi apoyo incondicional, eres lo más bello del amor y te amo con todo mi ser y Gracias por hacerme sentir una mujer plenamente amada!

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Cruz Sosa, por sus sabios consejos y aportaciones, por su infinita paciencia, tiempo y conocimiento en este proyecto, y darme la oportunidad de ser una mejor profesionista, mil gracias!

Al Dr. Víctor M. Chávez A., por sus conocimientos, experiencias y compartir este amor por la naturaleza en especial por la cicadas; por encontrar siempre en él un apoyo incondicional en mi formación profesional y brindarme su amistad, mil gracias!

A Estela, por tu infinita paciencia ayuda en este trabajo, por sus consejos pero por sobre todo por tu amistad.

A Dra. Judith Márquez, por su gran apoyo, motivación y revisión en la culminación de esta tesis

A Pilar y Mariana, por ser parte de mis sueños y compartir hermosas experiencias de la vida, y ayudarme en todo momento.

A Bárbara, parte crucial de poder realizar este trabajo y hacerme las cosas más amigables en el laboratorio y por tu tiempo y amistad compartida.

A Samanta y Diana, por los ejemplos de perseverancia y entusiasmo que las caracterizan y compartir los mejores momentos de mi vida, por el valor mostrado para salir adelante y por su amistad. Miles de Gracias amis!

A Fabiolita, Mechita, Iris y Anita: Que de alguna manera contribuyeron a este proyecto; por ser parte importante en mi vida, por sus oraciones amistad y buenos deseos que siempre me alentaron, muchas gracias.

A mis amigos Mabel, Mayra, Judith, Dalia, Juan Carlos, Arturo, Rosita, Paulina: que juntos hemos recorrido este camino, aprendiendo y dando cada uno algo de si mismos para lograr este objetivo, acompañarme y dándome su comprensión y amistad.

A todos los compañeros del Laboratorio de CTV del Jardín Botánico expreso mi gratitud a todos y cada uno por compartir conmigo todas sus experiencias y anécdotas en el Laboratorio, logrando así un encuentro de fraternidad y superación en un espacio de armonía.

*A la **Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I)** y a la **Universidad Nacional Autónoma de México** por permitirme ser parte de una generación de triunfadores y gente productiva para nuestro país.*

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| Índice de Tablas. | I |
| Índice de Figuras. | II |
| Abreviaturas. | III |
| Resumen | 1 |
| Abstract | 2 |
| 1. Introducción | 4 |
| 2. Antecedentes | 7 |
| 2.1 Cícadras | 9 |
| 2.1.1 Biología y estado de conservación de las cícadras | 13 |
| 2.1.2 Ciclo biológico y ecología | 16 |
| 2.1.3 Crecimiento y reproducción | 17 |
| 2.1.4 Germinación en cícadras | 20 |
| 2.1.5 Etnobotánica | 21 |
| 2.1.6 Protección de las cícadras | 21 |
| 2.1.7 Interacciones ecológicas | 23 |
| 2.2 <i>Dioon merolae</i> | 24 |
| 2.2.1 Clasificación de la especie | 24 |
| 2.2.2 Descripción de la familia Zamiaceae | 25 |
| 2.2.3 Descripción y estatus del género <i>Dioon</i> | 25 |
| 2.2.4 Usos e importancia de <i>Dioon merolae</i> | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3 Biotecnología | 29 |
| 2.3.1 Biotecnología vegetal | 33 |
| 2.3.2 Aplicaciones de la biotecnología vegetal | 34 |
| 2.4 Cultivo de tejidos vegetales (CTV) | 35 |
| 2.4.1 Organogénesis | 39 |
| 2.4.2 Embriogénesis somática | 40 |
| 2.5 Morfogénesis en cicadas | 41 |
| 3. Justificación | 47 |
| 4. Objetivos | 48 |
| 4.1 Objetivo general | 48 |
| 4.2 Objetivos particulares | 48 |
| 5. Materiales y Métodos | 49 |
| 5.1 Obtención del material biológico | 49 |
| 5.2 Desinfección de los explantes | 50 |
| 5.3 Preparación y esterilización del medio de cultivo | 50 |
| 5.4 Análisis histológico | 51 |
| 6. Resultados y Discusión | 55 |
| 6.1 Obtención del material biológico | 55 |
| 6.2 Germinación | 56 |

| | |
|---|-----------|
| 6.3 Cultivo de megagametofitos | 57 |
| 6.4 Raíces Coraloides | 60 |
| 6.5 Cultivo de embriones cigóticos | 61 |
| 6.6 Cultivo de folíolos | 63 |
| 6.7 Organogénesis | 64 |
| 6.8 Embriogénesis somática | 67 |
| 6.9 Análisis histológico | 70 |
| 7. Conclusiones | 77 |
| 8. Literatura citada | 79 |
| 9. Apéndices | 95 |
| I. Composición del medio Murashige y Skoog (1962). | 95 |
| II. Preparación de fijador Navashin (Sandoval, 2005). | 96 |
| III. Preparación de soluciones de alcohol terbutílico (TBA) (Sandoval, 2005). | 96 |
| IV. Preparación de colorante Safranina “O” (IC 50240) (Sandoval, 2005). | 97 |
| V. Preparación de colorante Verde rápido FCF (grado reactivo, IC 42053) (Sandoval, 2005). | 97 |
| VI. Hormonas vegetales y sus efectos en el CTV | 98 |
| VII. Artículo: Interciencia | 110 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabla 1. | Clasificación del orden Cycadales (Stevenson, 1992). | 10 |
| Tabla 2. | Diversidad de Zamáceas de México y su distribución actual (INE-SEMARNAT, 2002). | 11 |
| Tabla 3. | Tipos de endemismos y estatus para el género <i>Dioon</i> dentro de la República Mexicana (INE, 2000). | 28 |
| Tabla 4. | Embriogénesis somática en Gimnospermas | 42 |
| Tabla 5. | Respuestas morfogénicas <i>in vitro</i> en cícadas | 43 |
| Tabla 6. | Embriogénesis somática en cícadas | 44 |
| Tabla 7. | Orígenes y características de las poliembrionías cigótica y somática. | 44 |
| Tabla 8. | Medios de cultivo utilizados para la inducción de embriones somáticos en cícadas y coníferas | 45 |
| Tabla 9. | Cultivos <i>in vitro</i> de <i>Dioon</i> | 46 |
| Tabla 10. | Morfogénesis <i>in vitro</i> a partir de megagametofitos de <i>Dioon merolae</i> a 45 días de cultivo | 66 |
| Tabla 11. | Morfogénesis <i>in vitro</i> a partir de embriones de <i>Dioon merolae</i> a 45 días de cultivo | 66 |

 ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1. | Géneros del Orden Cycadales según Walters y col. 2004. A) <i>Bowenia</i> ; B) <i>Lepidozamia</i> ; C) <i>Stangeria</i> ; D) <i>Microcycas</i> ; E) <i>Encephalartos</i> ; F) <i>Cycas</i> ; G) <i>Ceratozamia</i> ; H) <i>Dioon</i> ; I) <i>Zamia</i> ; J) <i>Macrozamia</i> ; K) <i>Chigua</i> . | 12 |
| Figura 2. | Distribución mundial - Estados del área de distribución de la especie de los 11 géneros y tres familias de Cycadales (Donaldson, 2003). | 14 |
| Figura 3. | Importación mundial de semillas de cícadas (Donaldson <i>et al.</i> , 2003). | 15 |
| Figura 4. | Morfología general de las cícadas (Tomada de Giddy, 1974) | 18 |
| Figura 5. | Mapa de distribución del género <i>Dioon</i> en la República Mexicana (Jones, 1993). | 27 |
| Figura 6 | Ejemplares de <i>Dioon merolae</i> , endémica de Chiapas y Oaxaca, México (A-F). A) Cono femenino, Jiquipilas, Chiapas; B) Planta en un jardín; C y D) Población silvestres de <i>D. merolae</i> (Fotografías, Sandra Cabrera); E y F) Cientos de hojas de <i>D. merolae</i> , cortadas y utilizadas como adorno en las festividades de la Sta. Cruz (Fotografías, Miguel A. Pérez Farrera). | 30 |
| Figura 7. | Disciplinas que sustentan a la Biotecnología (Bolívar, 2003) | 32 |
| Figura 8. | Vías morfogenéticas en el cultivo de tejidos vegetales (George y Sherrington, 1984; modificado por Cabrera). | 41 |
| Figura 9. | Semillas de <i>Dioon merolae</i> colectadas en Jiquipilas, Chiapas | 49 |
| Figura 10. | Disección del megagametofito para la obtención de los explantes | 49 |
| Figura 11. | Hojas jóvenes de <i>Dioon merolae</i> | 55 |
| Figura 12. | Semilla con esclerotesta (A) y cono de semillas de color amarillo (con la sarcotesta) (B). | 55 |
| Figura 13. | Germinación en medio Litz modificado con diferentes concentraciones de auxinas y citocininas. A, B y C. Proceso de germinación de <i>Dioon merolae</i> a los 15 días de siembra <i>in vitro</i> . A) Elongación e hidratación del embrión cigótico con el crecimiento de callo (4.52 μM 2,4-D); B) Se observa la formación de callo en medio Litz con 4.52/4.60 μM 2,4-D/K; C) Formación de callo de forma compacta de color blanco-amarillento en medio Litz con 0.45/9.30 μM 2,4-D/K. | 58 |
| Figura 14. | Formación de callo a partir de megagametofitos en medio Litz. A) Callo friable poco oxidado (2.26/2.32 μM 2,4-D/K); B) megagametofito con cúmulos de masa callogénica (4.52/9.3 μM 2,4-D/K); y C) callo hialino poco friable (9.30 μM K). | 58 |
| Figura 15. | Raíces coraloides formadas <i>in vitro</i> y las obtenidas <i>in situ</i> . I) Raíces obtenidas <i>in vitro</i> en el área cercana a los arquegonios, a partir de megagametofitos de <i>Dioon merolae</i> en medio de inducción con 4.52 μM | 62 |

- 2,4-D y 13.9 μ M K), J) Raíces coraloides de *Macrozamia douglasii* obtenidas *in situ* (Jones, 1993).
- Figura 16.** Respuestas morfogénicas de embriones cigóticos de *Dioon merolae* en medio Litz modificado con 9.05 μ M 2,4-D y 13.9 μ M de K. A) Embrión a partir de callo; B) Formación de un brote a partir de callo; C) Callo opaco, compacto a los 7 días de siembra; D) Desarrollo y emergencia de la radícula a los 15 días de siembra; E) Formación de los primeros folíolos en la parte superior 62
- Figura 17.** Cultivo de folíolos jóvenes de *D. merolae*, en medio de inducción. A) Folíolo oxidado a los 8 días de cultivo; B) Tejido muerto a los 30 días de cultivo; C y D) Folíolos oxidados en el tratamiento control. 65
- Figura 18.** Secciones de callo obtenidas a partir de cultivos *in vitro* de megagametofitos a los 50 días de cultivo en medio Litz, en diferentes etapas de desarrollo. A. Sección transversal de callo (15 días de cultivo), células parenquimáticas con distribución aleatoria X100 B. Sección transversal de callo con algunas regiones en diferenciación, se observa tejido parenquimático X100. C. Centro de diferenciación X20 c.c., iniciando el proceso de desarrollo de haces vasculares D. Centro de diferenciación X20 c.c., iniciando el proceso de desarrollo de haces vasculares etapa más avanzada. E y F. Centro de diferenciación, muestra los haces vasculares en desarrollo dispuestos en una forma helicoidal y con elementos traqueales con poca refringencia a lignina X20 c.c. (E) y c.f. (F). 71
- Figura 19.** Secciones morfogénicas de cultivo a los 50 días de cultivo. A. Primordios foliares asincrónicos (pf) formado de callo de embrión (7 meses a partir de la siembra, bar = 100 μ m). B. Meristemo apical de brote (ma) (bar = 50 μ m) C. Callo de megagametofitos con taninos de color café 40x c.c.; D. Haces vasculares con taninos 40x c.f. E. Sección transversal raíz coraloides tejido parenquimático y componentes celulares X100. F. Sección longitudinal de un suspensor obtenido de embrión cigótico con el meristemo radicular y la formación de la cofia (c) (bar = 100 μ m). G y H. Elementos traqueales (e.t.) con engrosamientos helicoidales en el meristemo apical de raíz 20x (G) y 40x en c.f. (H). 74
- Figura 20.** Secciones de diferentes tejidos de megagametofitos con algunos contenidos celulares. a) Sección de tejido de embrión cigótico del meristemo apical con núcleos (N) evidentes 100x c.c.; b) Células de conducto con engrosamiento de la pared celular (epc) y contenidos celulares 100x c.c.; c y d) Observaciones de amiloplastos con la evidente formación de las cruces de malta (Xm) que resaltan por la polarización 100x (c-c.c. y d-pol); e) Taninos observables en la pared celular 40x c.c.; f) Células madre del estoma (cme) 100x c.c. 76

Abreviaturas

| | |
|---------|---|
| 2,4-D | Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético |
| AIA | Ácido Indol-3-acético |
| ANA | Ácido naftalenacético |
| B5 | Medio de Cultivo Gamborg, Miller y Ojima (1968) |
| BAP | 6-Bencilaminopurina |
| c.c. | Campo claro |
| c.f | Contraste de fase |
| CITES | Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora |
| CTV | Cultivo de Tejidos Vegetales |
| IUCN | International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources |
| K | Cinetina (6-Furfurilaminopurina) |
| MS | Medio de Cultivo Murashige y Skoog (1962) |
| Pol | Polarizado |
| TBA | Alcohol terbutílico |
| Unpubl. | En proceso de publicación |
| W | Medio de Cultivo White |

RESUMEN

A partir de explantes de embriones cigóticos y megagametofitos fueron inducidos cultivos organogénicos de *Dioon merolae* De Luca Sabato & Vázquez Torres, del estado de Chiapas (México) cicada en peligro de extinción. El medio de inducción Litz consistió en los macronutrientes del medio B5, los micronutrientes del medio MS (1962) y los compuestos orgánicos glutamina 400 mg/L, arginina 100 mg/L, asparagina 100 mg/L, sacarosa 60 g/L, gellan-gum 4 g, y suplementado con ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (0, 0.45, 2.26, 4.52 y 9.05 μM) y kinetina (0, 2.32, 4.60, 9.30 y 13.90 μM) con un arreglo de 5 x 5 con un diseño bloque seleccionado al azar.

Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad en 25°C, y el callo fue subcultivado en medio fresco cada cuatro semanas. La iniciación del callo ocurrió en un amplio rango de combinaciones de reguladores de crecimiento en explantes de megagametofito. El callo en explantes de embriones cigóticos se formó en pocas combinaciones. La formación de brotes adventicios ocurrió solo en callos que provenían de combinaciones con 4.60, 9.30, 13.90 μM 2,4-D y con 9.05 μM K. A través del análisis histológico de secciones longitudinales de embriones cigóticos se detectaron células meristemáticas apicales de brote y raíz, y en megagametofitos la formación de elementos de conducción similares a traqueidas y raíces coraloides. Esta técnica tiene un gran potencial para la preservación de especies de cicadas en peligro de extinción

Palabras clave: Organogénesis/ Cicadas/ *Dioon merolae*/ Especies en extinción/ Histología/

ABSTRACT

Organogenic cultures were induced from zygotic embryo and megagametophyte explants of the Chiapas State (México) endangered cycad species, *Dioon merolae* De Luca Sabato & Vazquez Torres. The induction medium consisted of B5 major salts, Murashige and Skoog (1962) minor salts and organics, 400 mg/L glutamine, 100 mg/L arginine, 100 mg/L asparagine, 60 g/L, sucrose, 4 g gellan gum, and supplemented with 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (0, 0.45, 2.26, 4.52, 9.05 μM) and kinetin (0, 2.32, 4.60, 9.30, 13.90 μM) arranged as a 5 x 5 factorial in a randomized block design.

Cultures were maintained in darkness at 25°C, and callus was subcultured onto fresh medium at 4 week intervals. Callus initiation occurred on a wide range of plant growth regulators (PGR) combinations from megagametophyte explants. In comparison, callus initiation from explanted zygotic embryos occurred on few PGR combinations. Adventitious shoot induction occurred from callus on formulations with 4.60, 9.30, 13.90 μM 2,4-D y con 9.05 μM K. Through the histological analysis of longitudinal sections of zygotic embryos were detected apical meristematic cells of the shoot and root and in megagametophytes the formation of elements similar to tracheids and coralloid roots. This technique has a great potential for preservation of the highly endangered cycads.

Key words: Organogenesis/ Cycads/ *Dioon merolae*/ Danger Species / Histology/

1. Introducción.

Las cícadas son las plantas más primitivas que forman semillas, que persisten en la actualidad, con al menos 160 millones de años de haber aparecido en el planeta, por lo que son consideradas verdaderos fósiles vivientes (Osborne, 1995). A nivel mundial están representadas por tres familias (Zamiaceae, Stangeriaceae, y Cycadaceae), 11 géneros y 185 especies (Stevenson *et al.*, 1995; Jones, 1993; Walter *et al.*, 2004).

Dioon merolae al igual que la mayoría de las cícadas a nivel mundial, habitan en zonas tropicales y se encuentran en peligro de extinción debido a la destrucción de su hábitat y a la colecta ilegal (Vovides y Peters, 1987; Pérez *et al.*, 1999); situación que se agudiza por su lento crecimiento y limitada propagación natural (Chávez y Vovides, 1993; Chávez, 1993; Pérez y Vovides, 1997). Aunado a la escasa disponibilidad de semillas, dado que las cícadas son díocas y el desarrollo de los estróbilos masculinos y femeninos, puede ser asincrónico perdiéndose la posibilidad de polinización y la formación de semillas, además, el periodo de maduración de éstas tarda más de un año después de la fertilización (Pérez y Vovides, 1997), sin considerar que las semillas presentan letargo mecánico, lo cual hace que también su germinación sea muy lenta (Pérez *et al.*, 1999).

En México se han reportado cerca de 35 especies, de las cuales el 80% son endémicas, todas pertenecientes a la familia Zamiaceae (Vovides e Iglesias, 1994a). No obstante el valor ecológico, biológico, cultural y económico que representan varias cícadas reportadas para México, están consideradas en peligro de extinción por la NOM-059-ECOL-2001 (Diario oficial, 2002) y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Walter y Gillet, 1997); entre ellas destaca *Dioon merolae*, especie endémica de Chiapas y Oaxaca (Pérez *et al.*, 1999).

En el estado de Chiapas, *D. merolae* tiene un alto valor cultural, ya que sus hojas son utilizadas durante las festividades de la Santa Cruz en Suchiapa; además, desde hace tiempo ha tenido un papel fundamental dentro de la economía rural local por su alto valor comercial dentro del mercado nacional e internacional como planta de ornato y por su follaje

(Becerra, 1985; Manguen y Montesinos, 1991; Pérez y Rodríguez, 1992; Pérez y Vovides, 1997).

En el estado de Oaxaca, se utiliza como adorno navideño y en bodas; la esclerotesta es usada en juegos de niños, y en la elaboración de brazaletes y collares, y la sarcotesta es utilizada como fuente de alimento, incluso en algunos casos se habla de la sustitución del maíz por la harina obtenida de estas semillas para preparar diversos platillos tradicionales (Chemnick *et al.*, 1997).

A pesar de que las cícadas son pobremente reconocidas en la horticultura en nuestro país (Pérez y Vovides, 1997), son vendidas en el mercado negro internacional como plantas ornamentales, alcanzando precios elevados (Vovides e Iglesias, 1994a; Osborne, 1995); lo que hace su comercialización nacional e internacional una actividad ilegal rentable. Sin embargo, se puede hacer lícitamente bajo los acuerdos de la CITES; fomentando así, la propagación, la protección y conservación de las mismas.

Para ello, es necesario contar con un método de propagación rápido y masivo, sin embargo, no existe por las vías convencionales (semillas, esquejes) y este reto se podrá conseguir con la ayuda de la biotecnología, principalmente por cultivo de tejidos vegetales, enfocados a la micropropagación, que permite regenerar plantas completas a partir de pequeñas secciones de tejidos (Dodds y Roberts, 1982).

Los estudios de morfogénesis *in vitro* de cícadas iniciaron hace 60 años con LaRue (1948) y continuaron con Norstog y Rhamstine (1967) y Webb *et al.* (1983) quienes utilizaron megagametofitos y embriones cigóticos de *Zamia floridana* (= *pumila*) como explantes. Más tarde se logró la inducción de cultivos embriogénicos, su germinación y el desarrollo *in vitro* de plántulas completas a partir de explantes de megagametofitos y embriones cigóticos de cuatro especies mexicanas: *Ceratozamia hildae* Landry & Wilson y *C. mexicana* var. *robusta*; *Zamia fischeri* y *Zamia furfuracea* (Tabla 5) (Chávez *et al.*, 1992a,b).

La inducción de embriogénesis a partir de estructuras somáticas (foliolos) de individuos adultos se reportó para tres especies mexicanas, habiéndose logrado el desarrollo de plántulas completas *in vitro*: *C. mexicana* (Chávez *et al.*, 1992a), *C. hildae* (Litz *et al.*, 1995), y

C. euryphyllidia (Chávez *et al.*, 1998). Dentro del género *Dioon*, se logró la regeneración de brotes y raíces a partir de megagametofitos y de embriones cigóticos (Chávez y Litz, 1999).

Para *D. merolae*, no existen reportes sobre cultivos *in vitro* y a la fecha únicamente se tienen registros de un estudio sobre la germinación de semillas para acelerar dicho proceso (Pérez *et al.*, 1999) y un estudio sobre la dinámica poblacional en dos sitios de la Depresión Central de Chiapas (Lázaro, 2002).

En el presente estudio se muestra el potencial que tiene dentro de la biotecnología el uso del cultivo de tejidos utilizando diferentes explantes como megagametofitos y embriones cigóticos, como una alternativa de conservación y propagación para la cícada *Dioon merolae*, especie que se encuentra en crítica situación de sobrevivencia.

2. Antecedentes.

En la actualidad se ha catalogado a cerca de 1.6 a 2 millones de especies de organismos de una cantidad usualmente estimada en 4-30 millones de distintas formas de vida con las que compartimos el planeta (Wilson, 1989).

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

México cuenta con una riqueza de especies vegetales extraordinaria, y aunque el conocimiento de la misma es incompleto, es probable que ocupe el cuarto lugar a nivel mundial con al menos 21 600 especies conocidas, con un total estimado entre 29 000 y 34 000 especies (Challenger, 1998). Además del gran número de especies reportadas, el alto porcentaje de endemismos, resultado de eventos geológicos y evolutivos, junto con su característica ubicación geográfica, hacen que México sea considerado como uno de los centros de origen y diversificación de la flora más importantes del mundo, especialmente en las zonas áridas y templadas (González, 1998).

El Estado de Chiapas, México, alberga un gran número de especies vegetales que se estima alrededor de 10 000 (Pérez Farrera, com. pers., 2000) dentro de los 19 tipos de vegetación que cubren el estado (Breedlove, 1981). Como resultado de esta diversidad vegetal y asociado a la heterogeneidad topográfica, es el segundo lugar en México en cuanto a diversidad de plantas y el octavo en número de plantas endémicas (Hernández, 1996).

Debido a que la Depresión Central es una de las zonas fisiográficas del estado de Chiapas más afectada por las actividades humanas, principalmente agricultura y ganadería, su vegetación está siendo perturbada constantemente (Breedlove, 1981). Esta alteración es mayor si se considera el daño que provocan los incendios intencionales o accidentales y las talas inmoderadas, principalmente en la Sierra Madre, dando como único resultado el fraccionamiento de los hábitats que albergan especies de distribución restringida que, como

resultado de esta distribución y de sus poblaciones pequeñas, han sido poco estudiadas y corren el riesgo de desaparecer antes de tener más conocimientos sobre ellas y de los beneficios y soluciones que pudieran brindar a las generaciones presentes y futuras.

El ecosistema del estado de Chiapas es uno de los más ricos en diversidad biológica, de los más complejos pero también de los más frágiles en cuanto al mantenimiento de su equilibrio entre poblaciones y comunidades que lo integran. No obstante que nuestro país posee un enorme potencial en su biodiversidad también lo distinguen el volumen y el ritmo de destrucción del mismo. Y al igual que la mayoría de los países aún cuando hay un interés por preservar la diversidad biológica, en el proceso de aprovecharla la estamos destruyendo (Aguilar *et al.*, 2000).

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

Entre las actividades las más directas y dañinas están:

- Deforestación debido a la tala y quema desmedida de bosques y selvas para ampliar las áreas agrícolas, ganaderas y urbanas.
- Contaminación de suelos, cuerpos de agua y atmósfera por desechos industriales y la quema de combustibles fósiles.
- Incremento poblacional.
- Aprovechamiento de un número muy limitado de cultivos de uso alimenticio, medicinal y en otras industrias.
- Desconocimiento de las propiedades y beneficios que podrían obtenerse de las plantas hasta ahora consideradas solo malezas y parte del paisaje.
- Saqueo y tráfico ilegal de plantas y animales colectados de poblaciones silvestres.

Es por ello que la conservación de la biodiversidad es una meta urgente de alcanzar para frenar la pérdida que está ocurriendo de miles de especies silvestres antes de que a consecuencia de esta situación el hombre mismo se convierta también en especie en peligro de extinción.

Raven a nombre del UICN/WWF Plant Advisory Group, dio a conocer que más de 60,000 especies vegetales de trópicos y subtrópicos (1 de cada 4 ó 1 de cada 5), que representan más de la cuarta parte de la diversidad total en el mundo están en riesgo de extinción y posiblemente se habrán extinguido al llegar el año 2050 si las tendencias actuales no cambian (Raven, 1996). Señaló también que durante las próximas 3 décadas el hombre llevará a la extinción un promedio de 100 especies cada día lo cual representa una tasa de extinción actual 1000 veces mayor a la de la prehistoria. Entre las especies a desaparecer en poco tiempo de sus hábitats, debido a la destrucción de éstos y a la sobrecolecta se encuentran las cícadas las cuales son las espermatofitas más primitivas que han llegado hasta nuestros días.

2.1 Cícadas.

Las cícadas constituyen el grupo de plantas seminíferas vivientes más primitivas, procedentes de finales de la Era Paleozoica (Carbonífero-Pérmico), hace alrededor de unos 200 millones de años (Vovides y Peters, 1987). En el presente son presumiblemente el grupo más antiguo entre las Gimnospermas (Chamberlain, 1957; Eckenwalder, 1980a). Es así que han sido consideradas por algunos naturalistas como verdaderos relictos, o lo que se ha dado en llamar “fósiles vivientes” (Norstog, 1965).

Las cícadas se encuentran en 58 países en partes tropicales y subtropicales de América de Norte, América del Sur, América Central y el Caribe, Asia y Oceanía. Un gran número de especies (52%) están amenazadas o en extinción en la naturaleza, las dos principales amenazas son la destrucción de su hábitat y el comercio de plantas recolectadas en el medio silvestre (CITES, 2003).

Las cícadas se definen por la presencia de varios caracteres, en particular la cicasina (compuesto químico que comprende metilazoximetanol y glucosa), las trazas foliares en las

hojas, megasporófilos simples. Stevenson (1992) clasificó las cícadas según su relación evolutiva, dividiendo las cícadas vivientes en tres familias (Cycadaceae, Stangeriaceae y Zamiaceae) y 11 géneros (Figura 1) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación del orden Cycadales (Stevenson, 1992).

| Orden | Familia | Subfamilia | Género | No. de especies |
|-----------|---------------|--------------------|----------------------|-----------------|
| Cycadales | Cycadaceae | | <i>Cycas</i> | 98 |
| | Stangeriaceae | Bowenioideae | <i>Bowenia</i> | 3 |
| | | Stangerioideae | <i>Stangeria</i> | 1 |
| | Zamiaceae | Zamioideae | <i>Ceratozamia</i> | 18 |
| | | | <i>Microcycas</i> | 1 |
| | | | <i>Zamia</i> | 57 |
| | | | <i>Chigua</i> | 2 |
| | | Encephalartoideae | <i>Dioon</i> | 11 |
| | | | <i>Macrozamia</i> | 68 |
| | | | <i>Encephalartos</i> | 2 |
| | | <i>Lepidozamia</i> | 37 | |

Es el Orden Cycadales, al que pertenecen las familias en las que generalmente se acepta la clasificación de las especies vivientes de cícadas. Está compuesto por las familias Cycadaceae, Stangeriaceae y Zamiaceae (Crane, 1988). La familia Zamiaceae es la más numerosa (contiene más del 50% spp de Cycadales del planeta), incluye a los géneros *Ceratozamia*, *Chigua*, *Dioon*, *Encephalartos*, *Lepidozamia*, *Macrozamia*, *Microcycas* y *Zamia*. Estos géneros se distribuyen unitariamente en distintos países de la franja intertropical de la Tierra. En América se encuentran los géneros *Ceratozamia*, *Chigua*, *Dioon*, *Microcycas* y *Zamia*. Este último es el más diversificado, con cerca de 50 especies continentales e insulares, y junto con *Ceratozamia*, es el más ricamente representado en México.

En nuestro país se encuentra una de las mayores concentraciones de Cycadales del mundo, con tres géneros y alrededor de 45 especies (Tabla 2). Esto significa que, en el

contexto de la ya bien reconocida megadiversidad vegetal de México, hay que agregar la familia *Zamiaceae* al conjunto de las *Agavaceae*, *Cactaceae*, *Fagaceae* y *Pinaceae* como representantes taxonómicos de altísimos porcentajes de endemismos (Stevenson *et al.*, 1993). Actualmente las cícadas están representadas por alrededor de 200 especies (Stevenson *et al.*, 1993), que se distribuyen en zonas estrechamente restringidas geográficamente (Figura 2) (Chamberlain, 1957; Jones, 1993; Norstog and Nicholls, 1997).

Tabla 2. Diversidad de Zamáceas de México y su distribución actual (INE-SEMARNAT, 2002).

| Especie | Entidades | Endemismos | Estatus |
|--------------------------------|--|------------|---------|
| <i>Ceratozamia brongiart</i> | Veracruz | Local | |
| <i>C. euryphyllidia</i> | Oax. y Ver. | Regional | P |
| <i>C. hildae</i> | Qro., S.L.P. | Regional | A |
| <i>C. kuesteriana</i> | Tamps. | Local | R |
| <i>C. matudae</i> | Chiapas | Local | A |
| <i>C. mexicana</i> | Veracruz | Local | A |
| <i>C. mexicana latifolia</i> | Veracruz | Local | R |
| <i>C. mexicana robusta</i> | Tamps., Chiapas, Oax., Puebla, Ver., Hidalgo | Regional | A |
| <i>C. microstrobila</i> | San Luis Potosí | Local | A |
| <i>C. miqueliana</i> | Tabasco, Ver. | Regional | P |
| <i>C. morettii</i> | Veracruz | Local | P |
| <i>C. norstogii</i> | Chiapas | Local | P |
| <i>C. sabatoi</i> | Qro., Hidalgo | Local | A |
| <i>C. whitelockiana</i> | Oaxaca | Local | R |
| <i>C. zaragozae</i> | San Luis Potosí | Puntual | P |
| <i>C. sp. 1</i> | Oaxaca | Puntual | R |
| <i>C. sp. 2</i> | Chiapas | Puntual | P |
| <i>Dioon lindley</i> | Sureste de México | Puntual | |
| <i>Dioon califanoi</i> | Puebla, Oaxaca | Local | P |
| <i>D. caputoi</i> | Puebla | Puntual | P |
| <i>D. edule angustifolium</i> | Tamaulipas | Local | A |
| <i>D. edule</i> | Ver., Puebla, SLP, Tamp., Gto., Nvo. León | Regional | A |
| <i>D. holmgrenii</i> | Oaxaca | Local | A |
| <i>D. merolae</i> | Chiapas | Regional | A |
| <i>D. purpusii</i> | Oaxaca | Puntual | P |
| <i>D. rzedowskii</i> | Oaxaca | Puntual | A |
| <i>D. spinulosum</i> | Oax., Veracruz | Local | P |
| <i>D. tomaselli sonorensis</i> | Sonora, Sinaloa | Regional | P |
| <i>D. tomaselli tomasellii</i> | Guerrero, Michoacán, Col., Jalisco, Nayarit. | Regional | A |
| <i>Z. cremnophila</i> | Tabasco | Local | P |
| <i>Z. inemis</i> | Veracruz | Puntual | P |
| <i>Z. fischeri</i> | Veracruz, SLP | Local | A |
| <i>Z. furfuracea</i> | Veracruz | Local | A |
| <i>Z. herrerae</i> | Chiapas | Local | A |
| <i>Z. loddigesii</i> | Ver., SLP, Tamp., Hidalgo, Oax., Puebla | Regional | A |
| <i>Z. paucijuga</i> | Chiapas, Oax., Guerrero, Jalisco, Colima | Regional | R |
| <i>Z. picta</i> | Chiapas | Puntual | P |
| <i>Z. polymorpha</i> | Campeche, Yucatán, Quintana Roo | Regional | A |
| <i>Z. purpurea</i> | Oax., Veracruz | Regional | P |
| <i>Z. sylvatica</i> | Oaxaca | Puntual | P |
| <i>Z. spartea</i> | Oaxaca | Puntual | R |
| <i>Z. soconuscensis</i> | Chiapas | Puntual | P |
| <i>Z. splendens</i> | Chiapas | Puntual | P |
| <i>Z. vazquezii</i> | Veracruz | Puntual | P |

P: Peligro de Extinción, A: Amenazada; R: Rara



Figura 1. Géneros del Orden Cycadales según Walters y col. 2004. A) *Bowenia*; B) *Lepidozamia*; C) *Stangeria*; D) *Microcycas*; E) *Encephalartos*; F) *Cycas*; G) *Ceratozamia*; H) *Dioon*; I) *Zamia*; J) *Macrozamia*; K) *Chigua*.

La distribución de las distintas especies de Zamiaceas en el territorio nacional coincide en gran medida con las principales cadenas montañosas que cruzan el territorio nacional, como son las Sierras Madre Oriental, Madre Occidental y Madre del Sur. Se les encuentra desde el nivel del mar hasta cerca de los 2,000 m.s.n.m. Forman parte de varios tipos de vegetación, aunque en ningún caso de modo dominante, entre los que se incluyen los matorrales de dunas costeras, las selvas altas, medianas y bajas, los bosques de durifolios, los bosques mesófilos y los pinares (Gómez Pompa, 1997). Esto no debe interpretarse, por supuesto, que se les va a encontrar en todos los sitios en los que se asientan los tipos de vegetación señalados, pues la mayoría de las especies mexicanas, de manera similar a lo que ocurre con la mayoría de las demás especies en otras latitudes del globo, están naturalmente apenas representadas por unas pocas centenas de individuos adultos (Gómez Pompa, 1997).

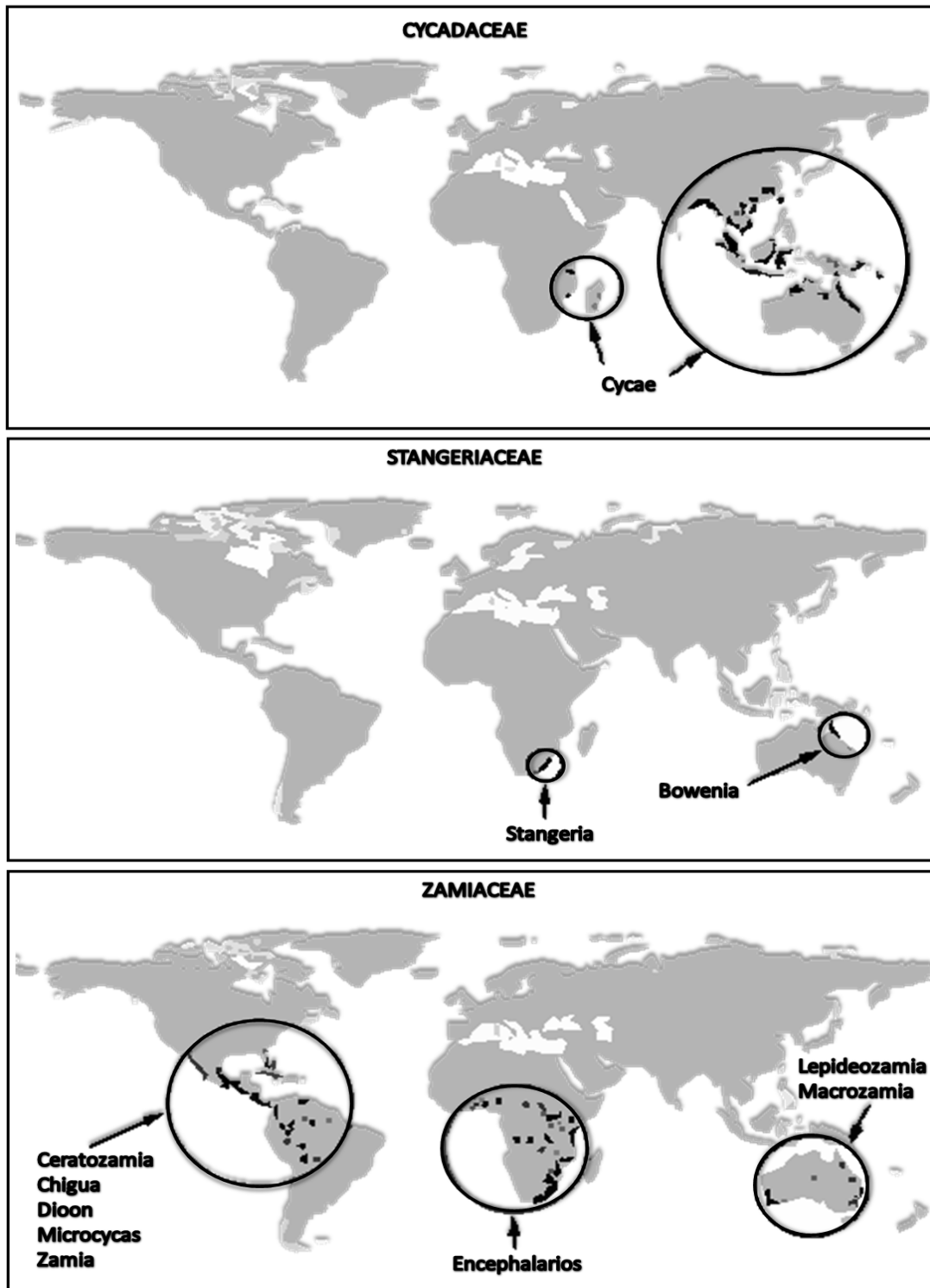
Las más altas densidades en términos del número de especies se encuentran en Queensland, Australia, 11 especies de 4 géneros; Sudáfrica, 29 especies de 2 géneros y en México donde se encuentran distribuidas en 3 géneros, *Ceratozamia*, *Zamia* y *Dioon* y se han reportado 34-35 especies (Osborne, 1990, Vovides, 1988) de las cuales en una estimación conservadora, un 75% son endémicas (Figura 2).

2.1.1 Biología y estado de conservación de las cícadas.

Las cícadas en México, han sido un recurso natural menospreciado, hasta recientemente en que su popularidad como plantas ornamentales ha aumentado, lo cual aunado a la relevancia y demanda que tienen en otros países, hacen prever una mayor colecta y destrucción de sus poblaciones silvestres (Vovides, 1988).

Con el resurgimiento en el interés sobre todos los aspectos, incluyendo su cultivo, ha habido un saqueo de las poblaciones en su hábitat de muchas especies de cícadas de plantas y semillas (Figura 3), con desafortunadas consecuencias. Algunas especies ya se han extinguido en su ambiente natural y muchas otras se han reducido hasta el punto en que su reproducción natural ya no es posible (Yañez, 2006). En algunos casos, existen más plantas de una especie en particular bajo cultivo que las que subsisten en su ambiente natural (Jones, 1993). De acuerdo con la IUCN, en 1997, 83% de las especies de cícadas estaban

amenazadas, incluyendo el 100% de las especies de Stangeriaceae, 89% de Zamiaceae y el



57% de Cycadaceae.

Figura 2. Distribución mundial – Áreas de distribución de las especies de los 11 géneros y tres familias de Cycadales (Donaldson, 2003).

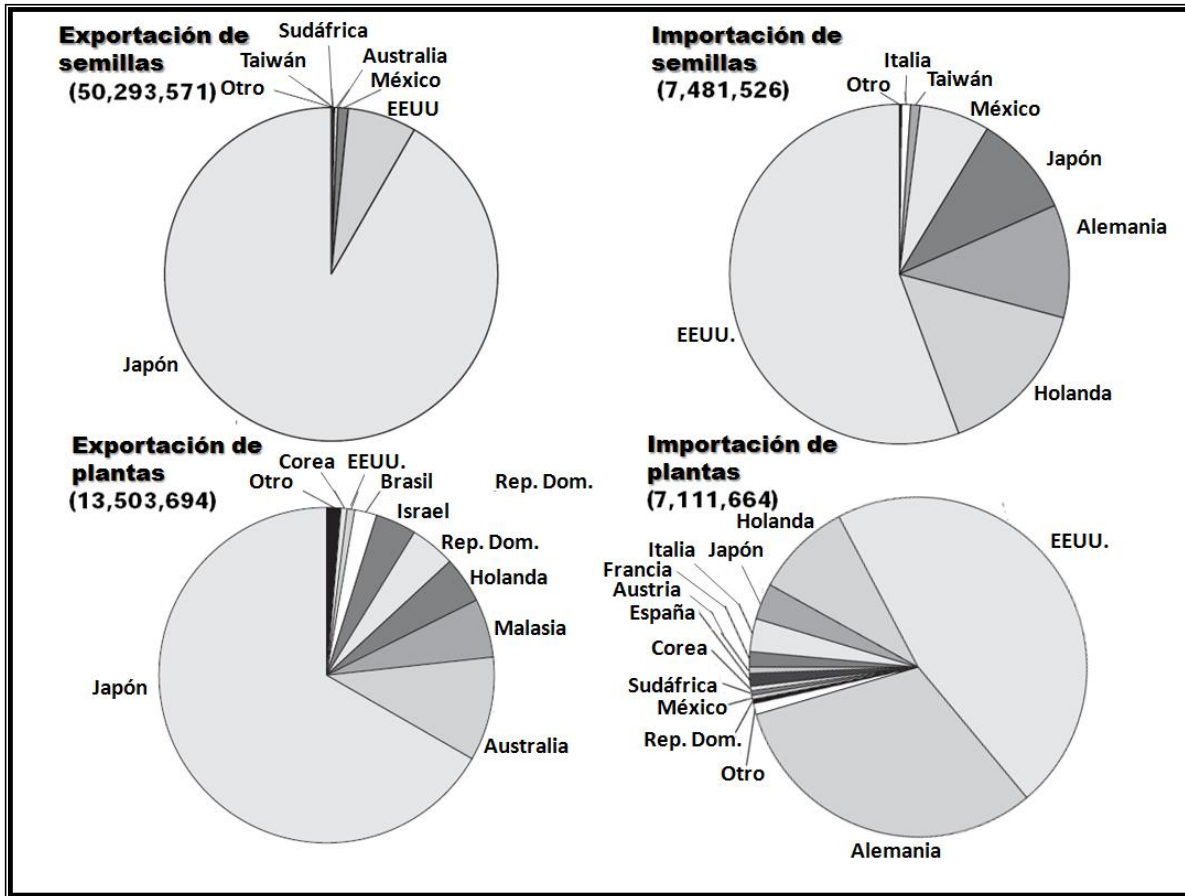


Figura 3. Importación de semillas de cícadas (Donaldson *et al.*, 2003).

Aunque estas plantas, con su gran antigüedad, evidentemente tienen todas las cualidades necesarias para adaptarse a nuevos ambientes y sobrevivir a cambios ambientales drásticos, la destrucción acelerada de sus hábitats, la falta de vigilancia, la legislación ineficaz, su lento desarrollo y errática proliferación amenazan su existencia. En algunos países se eliminan poblaciones enteras debido al desmonte de grandes extensiones de bosques para la extracción de madera, agricultura, realizada sin considerar su presencia en el área y la urbanización (Jones, 1993; Vovides e Iglesias, 1994a; Broome, 2000; Whitelock, 2002).

Existen varias alternativas para proteger no sólo a este grupo importante de plantas sino a todas las formas de vida. Una recomendación general es proteger el hábitat natural y conservar *in situ* la vida silvestre (Toledo, 1988; Velázquez, 1988). Otra alternativa es la

protección por las leyes nacionales de cada país y dar seguimientos a todas las medidas de conservación por todos, si se quiere que estas plantas sobrevivan. Los jardines botánicos son depositarios de un porcentaje de especies amenazadas alrededor del mundo, así como también son importantes centros para realizar investigación científica, conservar y propagar especies, difundir conocimientos y educación ambiental, y como sitios recreativos y de esparcimiento para los visitantes (Semarnat, 2005).

2.1.2 Ciclo biológico y ecología.

A las cícadas se las conoce a veces como 'fósiles vivientes', lo cual indica que han cambiado muy poco durante millones de años, pero son realmente un grupo de plantas muy diverso. Las especies de cícadas difieren entre sí en forma de crecimiento, comportamiento de conicidad, tamaño y número de conos, tamaño de semilla, longevidad, polinización, biología, agentes de dispersión, tolerancia a la sequía, tolerancia a la sombra y su capacidad para sobrevivir a los incendios. Estos factores influyen en su abundancia, el lugar en que crecen, la amplitud de su distribución y cómo responden a la recolección. A pesar de las numerosas diferencias entre especies, todas las cícadas comparten algunas características:

- a) crecen con relativa lentitud;
- b) tienen una corteza primaria medulosa y rica en fécula, que les hace vulnerables al moho. Por lo tanto, la mayoría de las especies viven en suelos bien drenados. Esto significa también que los tallos pueden dañarse fácilmente cuando se extraen o trasplantan y que entre las plantas que no se tratan con cuidado la mortalidad es alta;
- c) son dioicas (las plantas maduras producen conos masculinos o femeninos). Esto significa que el tamaño efectivo de las poblaciones pequeñas es con frecuencia inferior a la mitad del número de plantas maduras en la población;
- d) las semillas no tienen período inactivo. El embrión se desarrolla lento pero continuamente hasta la germinación, lo cual sucede normalmente pocos meses después de la dispersión. Por esto, la vida de las semillas es relativamente corta y está sometida a daños por desecación;

e) tienen raíces coraloides especiales que contienen cianobacterias simbióticas. Las cianobacterias pueden fijar el nitrógeno atmosférico, lo que permite a las cícadas sobrevivir en medios pobres en nutrientes; y

f) todas tienen raíces contráctiles, al menos como plantones, que llevan al sensible y creciente ápice bajo la superficie del suelo, donde queda protegido contra las consecuencias de la sequía y de incendios. Las cícadas habitan en toda una serie de hábitats, desde bosques tropicales hasta praderas abiertas y tierras cubiertas de maleza semiáridas. Muchas especies se limitan a sustratos particulares, como suelos pobres en nutrientes, afloramientos de piedra caliza o serpentina, dunas y acantilados escarpados (Norstog y Nicholls, 1997).

2.1.3 Crecimiento y reproducción.

Aunque las cícadas son plantas generalmente de larga vida y lento crecimiento, hay al menos tres formas o hábitos de crecimiento que difieren en longevidad y tasa de crecimiento (plantas de tallos subterráneos de pequeño a mediano tamaño, plantas con tallos aéreos aislados y plantas con tallos múltiples). Las especies con tendencia a desarrollar tallos múltiples (sobre todo de retoños/vástagos que se desarrollan en la base del tallo principal) pueden tener ciclos de vida particularmente largos, en que nuevos retoños sustituyen a los tallos moribundos viejos (Lázaro, 2002). Las cícadas son plantas leñosas que poseen raíz, tallo, hojas y estructuras reproductoras conocidas como conos o estróbilos. Sus raíces principales son gruesas y carnosas, pero también presentan raíces apogeotrópicas, erguidas y ramificadas, llamadas raíces coraloides (Giddy, 1974; Norstog y Nicholls, 1997) (Figura 4).

Es difícil medir la esperanza de vida global de las distintas plantas. Es sabido de plantas que fueron cultivadas hace más de 1 000 años (Whitelock, 2002), y las estimaciones sobre la longevidad de plantas en la naturaleza varían de 125 años para las pequeñas especies de sotobosques forestales, como *Encephalartos villosus* (Donaldson, 1995) a 900 años las especies mayores, como *Dioon edule* (Vovides, 1990); sin embargo, incluso plantas bastante grandes no son necesariamente muy viejas. Vogel y colaboradores (1995) estimaron que especímenes de *Encephalartos transvenosus* que medían 3 m de altura tenían sólo 150 años.

La edad hasta la primera reproducción varía considerablemente entre especies, y también depende de las condiciones de crecimiento. En condiciones de cultivo, algunas especies de *Zamia* tardan sólo entre dos y tres años en crecer desde la semilla hasta 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, los estudios sobre el terreno de especies de *Encephalartos* indican que la edad de la primera formación de conos puede variar de 15 a 40 años, según la especie (Raimondo y Donaldson, 2003).

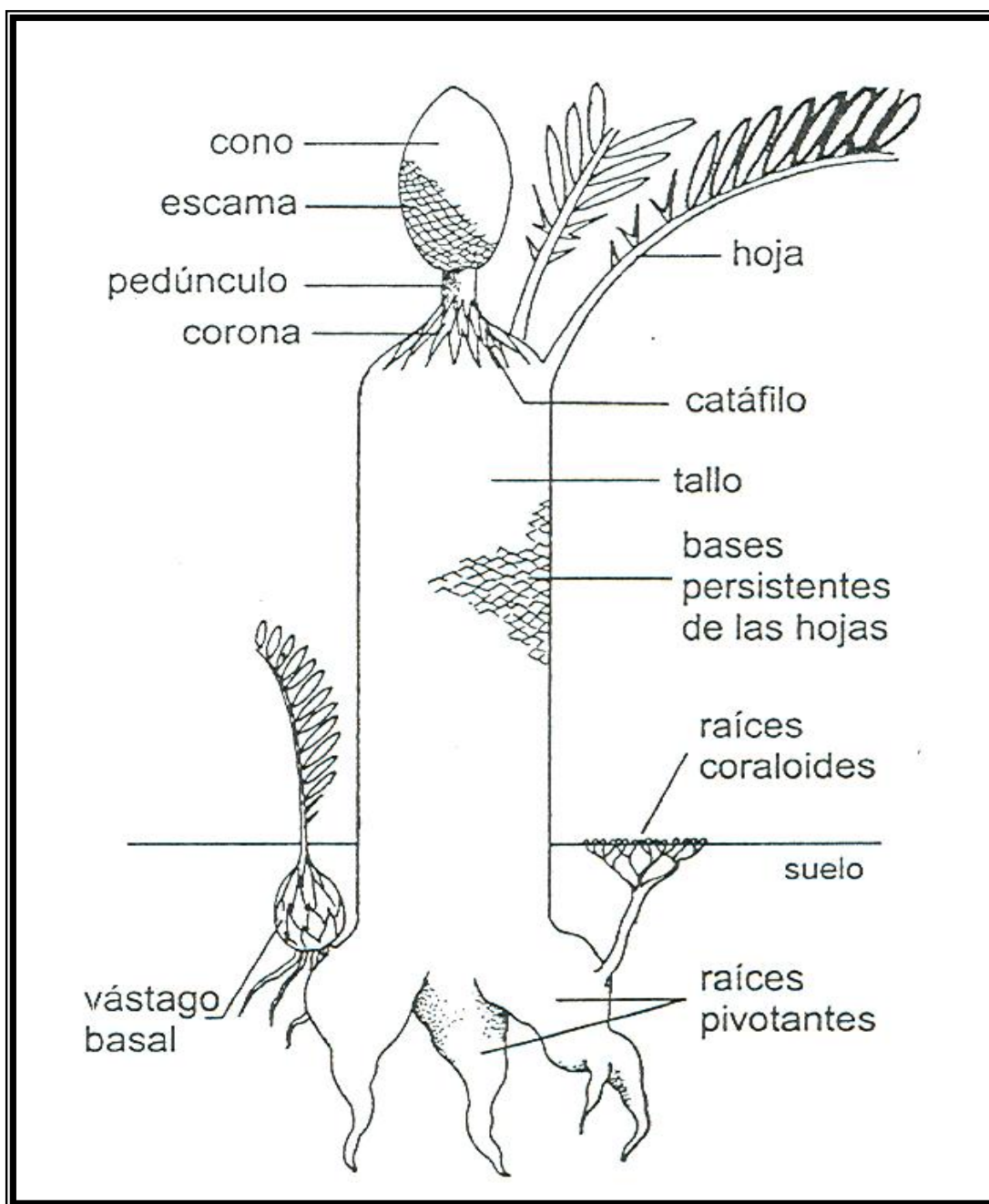


Figura 4. Morfología general de las cícadas (Tomada de Giddy, 1974).

La introducción de semillas es esporádica en la mayoría de las poblaciones de cícadas. Algunas especies pasan largos períodos sin reproducción, seguidos de un episodio de gran reproducción (durante la etapa semillera), que podría estar asociado a un suceso como el fuego. Distintas plantas pueden formar conos en un corto número de años, pero Vovides (1990) midió intervalos de hasta 52 años. Cuando en una población se reproducen sincrónicamente, una población integrada por varios centenares de plantas podría producir decenas de miles de semillas.

Normalmente sólo sobrevivirán unas cuantas semillas dispersas en lugares seguros, en tanto que las de lugares menos favorables se desecarán o serán comidas por roedores (Raimondo y Donaldson, 2003; Vovides, 1990). Otras especies producen conos más erráticamente sin reacción aparente a sucesos ambientales. Esas poblaciones producen relativamente pocas semillas durante cada episodio de reproducción. En ambos casos, la obtención satisfactoria de semillas puede ser poco frecuente, y en general la rotación de la población es lenta.

Las cícadas alcanzan edades muy avanzadas (500-1000 años o más); son de muy lento crecimiento, por ejemplo, individuos de *Dioon edule* Lindley de unos 2 m de altura se les calcula una edad de más de 2000 años (Vovides y Peters, 1987; Vovides Com. Pers.), presentan hojas pinnadas alternas que forman una espiral en forma de corona en el ápice del tronco, las hojas son persistentes (3-10 años), en algunas especies las hojas alcanzan hasta 3 m de longitud como en *Encephalartos villosus* Lem., al caer permanecen las bases que brindan soporte estructural al tronco el cual está reforzado internamente por una compleja serie de trazas foliares.

El crecimiento secundario es escaso en comparación con otras gimnospermas y plantas leñosas en general. Aún cuando en algunos taxa están presentes zonas definidas en crecimiento concéntrico éstas no constituyen incrementos estacionales y no se encuentran los típicos anillos de crecimiento anual de las plantas leñosas. Las cícadas son plantas dioicas, forman órganos reproductores en conos o estróbilos, las microsporofilas de los conos masculinos llevan abundantes microsporangios dispersos que producen grandes células espermáticas móviles como las de sus ancestrales helechos, en los conos ovulados las

esporófilas llevan óvulos desnudos marginales que después de la fertilización se desarrollan en semillas en forma de drupas, algunas veces de color brillante, contienen un verdadero embrión como las plantas con flor (Vovides *et al.*, 1983).

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

2.1.4 Germinación en cícadas.

La germinación es un proceso de reactivación de la maquinaria metabólica de la semilla, la emergencia de la radícula (raíz) y de la plúmula (tallo), conducentes a la producción de una plántula. Fisiológicamente, la germinación comienza con las etapas iniciales de reactivación bioquímica y termina con la emergencia de la radícula (Hartmann y Kester, 1990).

Para que la germinación se inicie se deben llenar tres condiciones:

Primera: la semilla debe ser viable; o sea, el embrión debe estar vivo y tener capacidad de germinar.

Segunda: La semilla no debe de estar en alguna etapa de letargo ni el embrión debe ser quiescente. No deben existir barreras fisiológicas, físicas ó químicas para la germinación.

Tercera: La semilla debe encontrarse en las condiciones ambientales apropiadas: disponibilidad de agua, temperatura, oxígeno y luz en algunas ocasiones. Estas condiciones pueden cambiar con el tiempo (Hartmann y Kester, 1990).

En el caso de las cícadas, la germinación es hipogea. Durante la germinación, la radícula emerge a través de la esclerotesta y crece hacia el sustrato. Los cotiledones permanecen dentro de la semilla hasta después de que el sistema radical está bien establecido

en el suelo. Pronto, el gametofito femenino y la primera hoja emergen de la semilla, mientras la testa y los cotiledones marchitados permanecen unidos a la plántula durante mucho tiempo (Bhatnagar y Moitra, 1996; Norstog y Nicholls, 1997). Por lo general, la plántula genera primero una hoja; a continuación aparecen las hojas adicionales en intervalos y pueden pasar varios años antes de que empiecen a arreglarse en coronas (Norstog y Nicholls, 1997).

2.1.5 Etnobotánica.

Existe una diversidad de usos de las cícadas los cuales se pueden clasificar con base en: comestibles, medicinales, adornos, plantas ornamentales vivas, plantas venenosas, insecticidas y otros (Vázquez, 1990; Jones 1993).

Las cícadas se utilizan como fuente de alimento en muchos países y por diversas culturas. Se ha demostrado que su explotación como alimento por humanos no es nuevo y de hecho, algunas culturas las han utilizado desde tiempos prehistóricos (Jones, 1993).

Las semillas también se consumen (la masa constituida por el megagametofito y el embrión) después de algún tratamiento para neutralizar o destruir las toxinas. Algunas culturas han desarrollado técnicas que, básicamente, utilizan calor y lavado con algunas variaciones. Estas técnicas consisten en cosechar las semillas maduras, secarlas al Sol hasta perder la sarcotesta, mondarlas para desprender la testa y entonces rebanarlas (Sri Lanka), aplastarlas o molerlas (Guam, Java), tostarlas (Islas Andaman, México) o hervirlas, cambiándoles el agua varias veces (México, Fiji) (Vázquez, 1990; Jones, 1993).

En México, las semillas hervidas de *Dioon edule* y *D. spinulosum* se muelen y con la masa obtenida, se elaboran atoles y tortillas. En Honduras se preparan tortillas, tamales, atole, pan, rosquillas, y chicha (aguardiente), con las semillas de *Dioon mejiae* y *Zamia standleyi* (Bonta, 2003).

Otros de los usos en nuestro país, utilizan a *Zamia fischeri* para acelerar el parto; la infusión de semillas de *Ceratozamia mexicana*, consumidas frescas y crudas actúan como un

potente vermífugo; y *Zamia spartea* se utiliza como remedio contra mordeduras de serpientes, aunque esta información no se ha corroborado (Vázquez, 1990; Jones, 1993).

2.1.6 Protección de las cícadas.

Las cícadas son plantas protegidas por las leyes, de acuerdo a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN), en 1997, 83% de las especies de cícadas estaban amenazadas, incluyendo 100% de las especies Stangeriaceae, 89% de Zamiaceae y 57% de Cycadaceae.

Todas las cícadas están clasificadas como especies con cierto grado de amenaza (Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001). La Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección del Medio Ambiente, determina los principios y la reglamentación para poder utilizar en el país especies de fauna y flora silvestres. Todos los usos de la flora silvestre están abarcados por esta ley, y especialmente en la ley sobre especies amenazadas promulgada en 1994 (NOM-059-ECOL-1994).

Los permisos de recolección son autorizados por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAP). Aunque se necesitan permisos para la recolección, la recolección ilegal sigue siendo un problema en algunas zonas (Lillo *et al.*, 2000), en particular de especies raras. La destrucción del hábitat representa un considerable problema para las especies de cícadas en México. Aproximadamente el 50% de las especies tienen al menos una población en una zona protegida como reserva de la biosfera (Stevenson *et al.*, 2003), pero muchas poblaciones no están debidamente protegidas. Uno de los objetivos del plan de conservación y recuperación de cícadas mexicanas es aumentar la protección y la adecuada protección de los hábitats de las cícadas (Lillo *et al.*, 2000).

La mayor parte de la recolección silvestre está dirigida a semillas para viveros. El uso de la fauna y flora silvestres en México se rige por la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección del Medio Ambiente, promulgada por el Congreso en 1986. Las especies amenazadas figuran también en una ley promulgada en 1994 (NOM-059-ECOL-1994), que

contiene disposiciones sobre la reproducción artificial en viveros de producción sostenible registrados, conocidos con el nombre de Unidad de Manejo de Vida Silvestre (UMAS).

El primer vivero para la producción sostenible de cícadas se puso en marcha en 1990, destinado a una población de *Dioon edule* en Monte Oscuro en el distrito de Chavalillo, Veracruz (Vovides e Iglesias, 1994b). Aquí, los campesinos desbrozan partes del hábitat de cícadas y podan también las coronas de grandes cícadas, que venden como grandes plantas aparentemente bien arraigadas.

La comunidad acordó establecer en Monte Oscuro un vivero, utilizando semillas recolectadas en la naturaleza, en el entendimiento de que se utilizaría para i) conservar el hábitat natural como fuente de semillas, y ii) reintroducir las plantas producidas en el vivero para compensar el retiro de semillas. Como resultado, se han conservado unas 80 hectáreas de hábitat de selva espinosa tropical (Vovides, 2000).

Se han creado otros dos viveros en los estados de Veracruz bajo la dirección de investigadores de la Universidad Veracruzana (para *Zamia furfuracea* y *Ceratozamia mexicana*). Ha comenzado el establecimiento de otros cuatro viveros en el Estado de Chiapas, para la producción de *Dioon merolae* y *Ceratozamia norstogii* en la zona intermedia de la reserva de biósfera de La Sepultura; dos viveros más para conservar a *C. matudae* y *Zamia soconuscensis*, en la zona intermedia de la reserva de la biósfera de El Triunfo.

2.1.7 Interacciones ecológicas.

Todas las cícadas son altamente tóxicas (Whiting, 1963; Smith, 1966; Porter y Teas, 1971; Duncan *et al.*, 1990; Siniscalco, 1990; Bell, 1993; Duncan, 1993). Por ejemplo, contienen dos grupos de azúcares nitrogenados (cicasina y macrozamina), entre otras substancias tóxicas, que representan los compuestos naturales carcinogénicos más potentes que se conocen. En consecuencia, los organismos con los que sostienen interacciones ecológicas, tanto de cooperación como antagónicas, son poco diversos, altamente especializados y de distribución coincidente con las especies del Orden Cycadales. De esta especialización resulta un corolario funesto para tales organismos: como no podrían

sobrevivir fuera de su asociación con las cícadas, la extinción de éstas, sus plantas hospederas, significaría también su propia extinción.

Mantienen asociaciones de cooperación con algas cianofíceas fijadoras de nitrógeno atmosférico, micorrizas, polinizadores y dispersores de semillas (Tang, 1987, 1989). La asociación de raíces apogeotrópicas con algas cianofíceas es de tipo simbiótico (o sea, la alianza es muy íntima y su disolución causa la muerte de los participantes); el resultado de la relación hace posible la fijación de nitrógeno atmosférico, lo cual es una importante función en el ecosistema (Grove *et al.*, 1980). Las raíces de las cícadas también establecen una asociación simbiótica con hongos, denominadas micorrizas, con lo que se propicia la absorción de minerales. La polinización es cantarófila (por escarabajos), la cual se considera primitiva; las especies de escarabajos involucradas son de las familias Curculionidae y Languridae (Norstog y Fawcett, 1989). Las semillas son dispersadas por gravedad y animales (aves, roedores y, quizá, cangrejos) (Tang, 1989; Eckenwalder, 1980b).

Las asociaciones antagonistas ocurren esencialmente por herbivoría y competencia por luz. Las hojas son depredadas por herbívoros específicos (orugas de mariposas del género *Eumaeus*, familia Lycaenidae, y escarabajos de la especie *Aulacoscelis melanocera*, familia Crisomelidae (Duporchet y Chevrolat, 1843). Ocasionalmente también son depredadas por escarabajos minadores de la familia Buprestidae. La depredación puede ser afectada por las condiciones de conservación del entorno natural; por ejemplo, en un estudio sobre herbivoría en *Ceratozamia mexicana* se encontró que la apertura del dosel facilitaba el encuentro del herbívoro específico (*Eumaeus debora*) con las plantas hospederas, lo que provocaba que la pérdida de área foliar fuera mayor que en las zonas donde el dosel se mantenía relativamente cerrado (Beltrán y Torres, 1995).

2.2. *Dioon merolae*.

Dentro de las especies de cícadas que se encuentra en peligro de extinción está *Dioon merolae*, endémica de Chiapas y Oaxaca. *Dioon merolae* De Luca Sabato y Vázquez-Torres es

una cícada perteneciente a la familia Zamiaceae (Norstog y Nicholls, 1997), y que en el estado de Chiapas solo se distribuye en pequeños manchones dentro de la vegetación de la Depresión Central (Palacios y Cabrera, 1997; Miranda 1998), como elemento importante de la vegetación en el NO de la Sierra Madre (Pérez *et al.*, 1995). Recientemente se tienen reportes de dos poblaciones de *D. merolae* que se distribuye en el estado de Oaxaca, en lo que corresponde a la Sierra de Juárez y Sierra Madre del Sur, dentro del drenaje del Río Tehuantepec (Chemnick *et al.*, 1997).

2.2.1 Clasificación de la especie.

Según la clasificación de De Luca Sabato y Vázquez Torres (1981), *Dioon merolae* pertenece al Reino vegetal, a la División Cycadophyta, Orden Cycadales, Familia Zamiaceae, Género *Dioon* y Especie *merolae* De Luca Sabato y Vázquez Torres.

2.2.2 Descripción de la familia Zamiaceae.

Es el Orden Cycadales, al que pertenecen las familias en las que generalmente se acepta la clasificación de las especies vivientes de cícadas de todo el mundo. Se compone de las familias Cycadaceae, Stangeriaceae y Zamiaceae (Crane, 1988).

La familia Zamiaceae fue descrita por Heinrich Reichenback en 1837, es la familia de cícadas más grande y se divide en dos subfamilias Encephalartoideae y Zamiaceae, cada una de las cuales está subdividida a su vez en cuatro tribus a saber: *Diooeae*, *Encephalarteae*, *Ceratozamiaceae*, *Zamiaceae*. La tribu *Diooeae* fue descrita por Julius Schuster en 1932, e incluye un único género: *Dioon*, el cual se distribuye en México, Nicaragua y Honduras (Jones, 1993).

Las cícadas constituyen el grupo de plantas espermatofitas vivientes más primitivas, hoy en día, son presumiblemente el grupo más antiguo de Gimnospermas (Chamberlain, 1919; Eckenwalder, 1980). Su máximo desarrollo, relación adaptativa y distribución sobre la faz de la Tierra ocurrieron a mediados de la Era Mesozoica (periodo Jurásico) hace aproximadamente 150 millones de años. Actualmente están representadas por unas 250 especies (Osborne *et al.*, 1999) que se distribuyen por el mundo en zonas geográficamente

restringidas (Chamberlain, 1919; Jones, 1993; Norstog y Nicholls, 1997). México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en diversidad de cicadas (Vovides, 2000).

2.2.3 Descripción y estatus del género *Dioon*.

El género *Dioon* comprende alrededor de 12 especies, casi todas endémicas a los lugares donde se distribuyen (INE, 2000). Dentro de nuestro país se distribuyen 11 de ellas, desde el estado de Sonora hasta Chiapas (Sabato y De Luca, 1985), con diferentes tipos de endemismos tales como, puntuales, locales y regionales (INE, 2000) (Tabla 3, Figura 5). Solo *Dioon mejiae* es endémica de Honduras, *Dioon merolae* De Luca, Sabato y Vázquez Torres, es una especie que pertenece a este género y que está protegida por las leyes mexicanas (Flores y Gérez, 1988). La NOM-059-ECOL-2001 establece que todas las especies de cicadas del país se encuentran bajo alguna categoría de protección y muy particularmente a *D. merolae*, se le considera como especie en peligro de extinción (ver Figura 6 A-D) (INE, 2000; Diario oficial, 2002).

Al igual que todas las cicadas, son plantas dioicas, es decir son de sexos separados, la diferencia entre masculinos y femeninos es muy notoria y se expresa claramente en las estructuras reproductivas que son microstróbilos y megastróbilos (Yáñez, 2006).

Los microstróbilos o conos masculinos tienen una forma alargada, más o menos cilíndrica, algunas veces son decumbentes, de hasta 40 cm de longitud por 10 cm de ancho, son de color verde amarillento cuando jóvenes, pero al madurar se tornan de color café oscuro y las esporófilas de las que se compone el cono, se separan dejando entrar el aire lo que hace posible liberar el polen, además tienen un aroma penetrante y persistente que recuerda a las inflorescencias de las palmas y a la resina de las coníferas (Pérez, 1994).

Los megastróbilos o conos femeninos son de forma ovoide y densamente lanosos, se desarrollan en la parte terminal del tronco de la planta, al igual que los conos masculinos, pero son de mayor tamaño, alcanzan hasta 45 cm de largo por 25 cm de ancho, con un peso promedio aproximado de 6.37 Kg (Pérez, 1994).

Las semillas del género *Dioon* son de las más grandes para la familia Zamiaceae, ocupando el 4º lugar, con un volumen promedio de 15 cm³, son de forma ovoide y miden 3

cm de diámetro (Sabato y De Luca, 1985). Se encuentran dentro del cono hasta que éste se ha desintegrado; entonces el embrión se encuentra bien desarrollado (maduración). Las semillas se ven cubiertas por un tejido carnoso de color amarillo, llamado sarcotesta, posteriormente la sarcotesta se va resecando hasta que las semillas son liberadas por completo del cono (Pérez, 1994).

El tronco puede ser subterráneo cuando mide escasos 3 a 5 cm de altura o aéreo si la planta es adulta, en este caso pueden crecer hasta 4.60 m (Lázaro, 2002), pero el promedio es de 3 m de altura (Pérez, 1994). El diámetro del tronco oscila entre 2 y 70 cm. Una planta adulta de *D. merolae* puede tener de 5 a más de cien hojas dispuestas a manera de corona en el extremo del tallo (Jones, 1993). Las hojas son aplanadas, de 80 a 110 cm de longitud, de disposición ascendente y arreglo helicoidal en forma de corona en la parte distal del tronco o tallo, están compuestos de folíolos subopuestos, linear lanceolados, rígidos y coriáceos, que tienen los márgenes imbricados (Pérez, 1994).

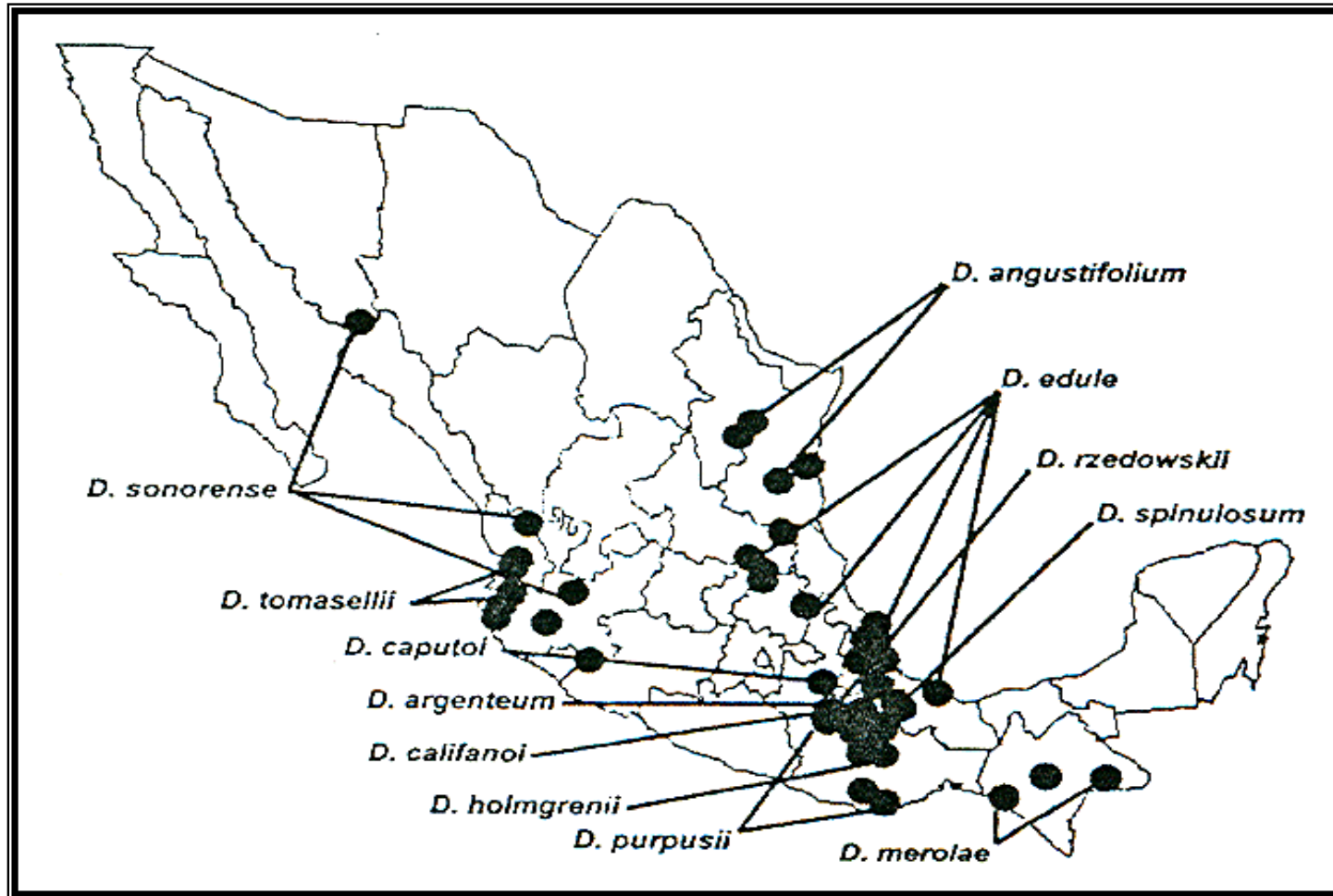


Figura 5. Mapa de distribución del género *Dioon* en la República Mexicana (Jones, 1993).

Tabla 3. Tipos de endemismos y estatus para el género *Dioon* dentro de la República Mexicana (INE, 2000).

| ESPECIE | ENDEMISMO | ESTATUS |
|----------------------------------|-----------|---------|
| <i>Dioon lindi</i> | Puntual | A |
| <i>Dioon califanoi</i> | Local | P |
| <i>Dioon caputoi</i> | Puntual | P |
| <i>Dioon edule angustifolium</i> | Local | A |
| <i>Dioon edule edule</i> | Regional | A |
| <i>Dioon holmgrenii</i> | Local | A |
| <i>Dioon merolae</i> | Regional | P |
| <i>Dioon purpusii</i> | Puntual | P |
| <i>Dioon rzedowskii</i> | Puntual | A |
| <i>Dioon spinulosum</i> | Local | P |
| <i>Dioon tomasellii</i> | Regional | A |

A: Amenazada, P: En peligro de extinción

En estado juvenil las hojas son tomentosas y suaves, a causa de las células epidérmicas llamadas tricomas (Jones, 1993), posteriormente se tornan glabras y coriáceas con espinas en ambos márgenes y una espina terminal en la parte apical de cada folíolo (Pérez, 1994). La planta produce y se alimenta básicamente por tres tipos de raíces. El sistema primario de raíces es equivalente al que se encuentra en la mayoría de las plantas con flores y consta de una raíz principal. Las raíces laterales se desarrollan a partir de la raíz principal y son más pequeñas, la función esencial de ambas raíces es el anclaje y la obtención de nutrientes y agua. El tercer tipo de raíces laterales crece hacia arriba o apogeotrópicamente y se bifurcan repetidamente como corales, de ahí que se denominen raíces coraloides. Tales raíces son únicamente en las cícadas ya que contienen a las algas verde-azules *Nostoc* que viven en simbiosis y dan como resultado la fijación de considerables cantidades de nitrógeno atmosférico (entre 19 a 60 kg de N por ha) (Jones, 1993; Norstog y Nicholls, 1997; Lambers *et al.*, 1998).

Las hojas de las cícadas nacen en una corona en el extremo superior del tallo, dispuestas en espiral sobre el eje, son pinnadas (excepto algunas especies de *Bowenia*), y con folíolos aplanados (Figura 6-B). El número de hojas en la corona varía enormemente con la especie y edad de la planta. Mientras muchas de las especies con mayor crecimiento pueden

tener coronas exuberantes de hasta 100 hojas o más, algunas de los tipos más pequeños con tallos subterráneos pueden tener menos de 5 hojas en la corona de una planta madura (Jones, 1993; Vovides, 1999). Las cícadas maduras producen anual o bienalmente tres clases de órganos foliares en serie. La temporada de crecimiento inicia con la producción de un verticilo de catafilos, seguidos por uno de esporofitos (cono), si la planta es reproductiva y luego por un verticilo de hojas para finalizar con otro de catafilos (Norstog y Nicholls, 1997). Por lo general, la producción de hojas es precedida por la caída de las hojas del periodo anterior (Yáñez, 2006).

2.2.4 Usos e importancia de *Dioon merolae*.

En el municipio de Suchiapa Chiapas existe una vieja tradición llamada de la Santa Cruz que se celebra el día 3 de mayo de cada año. Dicha celebración considera recolectar grandes cantidades de hojas maduras de *D. merolae* como ofrenda principal en los altares (Figura 6 E y F), para tal efecto, peregrinos van hasta los lugares donde se encuentran las poblaciones naturales de *D. merolae*, cortan cientos de hojas maduras que son necesarias para la ofrenda, y las llevan hasta el lugar donde se celebra la Santa Cruz (Pérez y Rodríguez 1992; Gómez-Pompa *et al.*, 2000), así mismo, Jones (1993) reporta a *D. merolae* como una ofrenda muy importante dentro de la celebración de las festividades del día de muertos (1º y 2 de noviembre).

Además, de la importancia religiosa y evolutiva, las cícadas tienen una importancia ecológica. Muchas especies crecen en suelo pobres, rocoso y poco profundos; los cuales son muy susceptibles a la erosión, actuando éstas como formadoras y retenedoras de suelo, así también, aportan apreciables cantidades de nitratos a sus ecosistemas (Halliday y Pate, 1976; Grove *et al.*, 1980; Guo-Fan *et al.*, 1993).

2.3 Biotecnología

La palabra *Biotecnología* viene del griego «βίος» *bios*, vida, y tecnología del griego «τεχνολογος», formada por *tekne* (τεχνη, "arte, técnica u oficio") y *logos* (λογος, "conjunto de

saberes"), pero para una definición más clara y objetiva según el Convenio sobre Diversidad Biológica de 1992, la biotecnología podría definirse como: "*toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos*".



Figura 6. Ejemplares de *Dioon merolae*, endémica de Chiapas y Oaxaca, México (A-F). A) Cono femenino, Jiquipilas, Chiapas; B) Planta en un jardín; C y D) Población silvestres de *D. merolae* (Fotografías, Sandra Cabrera); E y F) Cientos de hojas de *D. merolae*, cortadas y utilizadas como adorno en las festividades de la Sta. Cruz (Fotografías, Miguel A. Pérez Farrera).

Los experimentos pioneros de Jensen en 1796 y de Pasteur en 1885, que permitieran la producción de las primeras vacunas contra la viruela y la rabia respectivamente, son ejemplos contundentes de la capacidad de las técnicas de la biotecnología para contender con problemas relevantes para la sociedad, en este caso con los organismos patógenos causantes de estas enfermedades. La biotecnología tradicional ha estado presente desde tiempos inmemorables en la solución de muchos problemas importantes, no sólo en el campo de la salud, sino también en el de la producción de alimentos a través de procesos de fermentación, tales como el pan o la cerveza (Bolívar, 2003).

Sin embargo, hablar hoy de la Biotecnología Tradicional ya no remite de manera exclusiva a procesos ligados a la producción de alimentos y bebidas, como ocurría en el pasado reciente. La aparición de la Biología Molecular en los años cincuenta, ayuda a descifrar la estructura del material genético, así como los mecanismos celulares que permiten traducir en proteínas la información genética, estas áreas de la Biología hicieron posible el surgimiento de la *Biotecnología Moderna*. La cual basada en las técnicas de la ingeniería genética abrió el campo de las aplicaciones como la posibilidad de aislar, editar y manipular el material genético, lográndose incluso el trasplante de genes entre especies, creándose así los organismos transgénicos. Este conjunto de conocimientos sobre el material genético y las proteínas de la célula viva, así como de las metodologías para manipularlos, constituye una de las plataformas de despegue de la biotecnología moderna (Bolívar, 2003).

La biotecnología moderna se puede definir como una actividad multidisciplinaria, cuyo sustento es el conocimiento de frontera generado en diversas disciplinas (entre otras, biología molecular, ingeniería bioquímica, microbiología, inmunología, bioquímica, genómica, bioinformática, ingeniería de proteínas), que permite el estudio integral y la manipulación de los sistemas biológicos (microbios, plantas y animales). A partir de dicho estudio integral y del uso de los sistemas biológicos, sus productos y sus partes, la biotecnología moderna busca hacer una utilización inteligente, respetuosa y sustentable de la biodiversidad, mediante el desarrollo de tecnología eficaz, limpia y competitiva para facilitar la solución de problemas importantes en sectores tales como el de la salud, el agropecuario, el industrial y del medio ambiente. Sin embargo, hay serios cuestionamientos como el uso o introducción de maíz transgénico a los centros de diversidad como México.

De lo anterior, se desprende que hay un conjunto de disciplinas y campos disciplinarios (alimentos, agronomía, agrobiotecnología, biorremediación, medicina molecular, monitoreo y diagnóstico, etc.), que se sustentan a su vez en la biotecnología (Figura 7) (Bolívar, 2003).

Las aplicaciones de la biotecnología son numerosas y a continuación se citan solo algunos ejemplos como:

- Biotecnología médica. Algunos ejemplos son el diseño de organismos para producir antibióticos, el desarrollo de vacunas más seguras y nuevos fármacos, los diagnósticos moleculares, las terapias regenerativas y el desarrollo de la ingeniería genética para curar enfermedades a través de la manipulación génica.

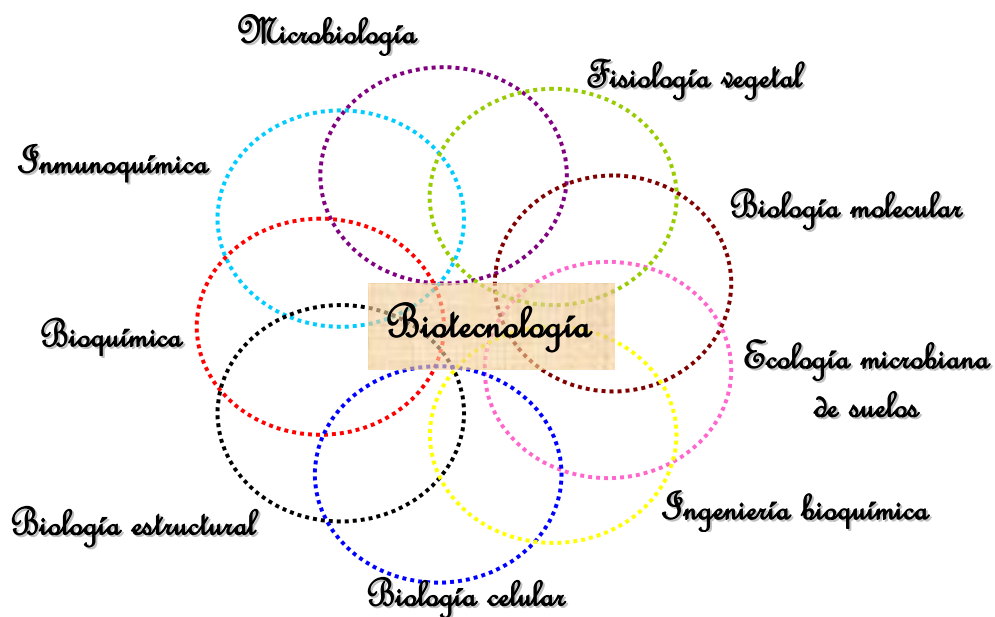


Figura 7. Disciplinas que sustentan a la Biotecnología (Bolívar, 2003).

- **Biología industrial.** es aquella aplicada a procesos industriales. Un ejemplo de ello es el diseño de microorganismos para producir un producto químico o el uso de enzimas como catalizadores industriales, ya sea para producir productos químicos valiosos o destruir contaminantes químicos peligrosos (por ejemplo utilizando oxidorreductasas) (Xu y Feng, 2005). También se aplica a los usos de la biología en la industria textil, en la creación de nuevos materiales, como plásticos biodegradables y en la producción de biocombustibles. Su principal objetivo es la creación de productos fácilmente degradables, que consuman menos energía y generen menos desechos durante su producción. Esta biología tiende a consumir menos recursos que los procesos tradicionales utilizados para producir bienes industriales (Frazzetto, 2003).
- **Biología agrícola o biología vegetal.** Un ejemplo de ello es el diseño de plantas transgénicas capaces de crecer en condiciones ambientales desfavorables o plantas resistentes a plagas y enfermedades. Se espera que la biología verde produzca soluciones más amigables con el medio ambiente que los métodos tradicionales de la agricultura industrial. Un ejemplo de esto es la ingeniería genética en plantas para expresar plaguicidas, con lo que se elimina la necesidad de la aplicación externa de los mismos, como es el caso del maíz Bt (Comisión Europea, 2006).
- **Biología marina.** es un término utilizado para describir las aplicaciones de la biología en ambientes marinos y acuáticos. Aún en una fase temprana de desarrollo sus aplicaciones son prometedoras para la acuicultura, cuidados sanitarios, cosmética y productos alimentarios (Comisión Europea, 2006).

2.3.1 Biología vegetal

En la agricultura, la biología se orienta a la superación de los factores limitantes de la producción agrícola a través de la obtención de variedades de plantas tolerantes a condiciones ambientales negativas (sequías, suelos ácidos), resistentes a enfermedades y plagas, que permitan aumentar el proceso fotosintético, la fijación de nitrógeno o la

captación de elementos nutritivos. También se apunta al logro de plantas más productivas y/o más nutritivas, mediante la mejora de su contenido proteínico o aminoácido. Una de las ramas de la biotecnología enfocada a la agricultura es la Biotecnología vegetal que es la utilización de las técnicas biológicas modernas, que utilizan a las plantas o sus partes (células vegetales) para producir o mejorar alguna característica que sea de utilidad en la agricultura, en la biodiversidad o para ella misma (Roca, 1993). Ejemplos de la aplicación de la Biotecnología Vegetal son: producción de plantas con tolerancia a condiciones adversas, resistencia a herbicidas específicos, control de plagas, cultivo durante todo el año. Problemas de enfermedades y control de malezas ahora pueden ser tratados genéticamente en vez de con químicos.

Una de las técnicas usadas es el CTV, la cual es importante no solo porque es el área de la biotecnología que tiene actualmente mayor aplicación práctica en el campo de la agricultura, y es una herramienta versátil en la solución de los problemas básicos y aplicados de la biología de las plantas; constituye, en efecto, el puente necesario para llevar a cabo las manipulaciones genéticas desde el laboratorio hasta el campo (Roca, 1993).

2.3.2 Aplicaciones de la biotecnología vegetal

Las perspectivas y utilización de los métodos de propagación en la biotecnología vegetal son numerosos, entre los que se encuentran: las técnicas de cultivo de tejidos. Entre sus aplicaciones se pueden reconocer las siguientes categorías: Propagación vegetativa, variación somaclonal, hibridización somática, eliminación de enfermedades, líneas celulares mutantes, intercambio de germoplasma, cultivos de embriones, transferencia de cromosomas, transferencia de genes, cultivo de anteras y haploidea. Otra aplicación económica importante, es la obtención de metabolitos secundarios por cultivo celular como: aceites esenciales, que se emplean como sazonadores, perfumes y solventes; glucósidos: "saponinas", aceite de mostaza para colorantes; alcaloides tales como morfina, cocaína, atropina, etc. de gran utilidad en la producción de fármacos, de los que se conocen más de 4000 compuestos, la mayoría de origen vegetal; enzimas: "hidrolasas", "proteasas", "amilasas", "ribonucleasas".

Otras de las aplicaciones que encontramos en la agricultura:

- Micropropagación acelerada de material vegetal seleccionado o transformado.
- Mantenimiento de bancos de germoplasmas.
- Evaluación de plantas resistentes o tolerantes a estrés abiótico como alta salinidad, estrés hídrico, bajas temperaturas, etc.
- Resistencia a herbicidas, a herbívoros, a enfermedades.
- Germinación *in vitro*.
- Propagación de especies en vías de extinción.
- Conservación y cultivo de especies de mucho valor.
- Obtención de plantas libres de enfermedades. Se cultiva el meristemo apical, que no tiene conexión con el resto de la planta y está libre de microorganismos.
- Micropropagación (propagación vegetal "*in vitro*") rápida de plantas ornamentales. Una vez definido el procedimiento en tubos de cultivo, es relativamente fácil llevar las plantas a otros países y cultivarlas en invernaderos.
- Obtención de híbridos incompatibles sexualmente. Se pueden cambiar los genomas de 2 plásmidos diferentes, para obtener híbridos somáticos.

- Plantas transgénicas: a través de la introducción de genes de interés.

2.4 Cultivo de tejidos vegetales (CTV).

El cultivo de tejidos vegetales es parte de la biología que se basa en la totipotencialidad celular (Dodds y Roberts, 1982) que ha establecido un conjunto de técnicas que hacen posible dividir a un organismo en sus bloques constituyentes y cultivar asépticamente *in vitro* protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones, y plántulas en condiciones controladas (medio nutritivo, pH, temperatura, atmósfera, etc.) (George y Sherrington, 1984; Chávez, 1993).

El éxito y trascendencia de este método ha permitido el establecimiento de nuevas y mejores alternativas de mejoramiento genético como la hibridación de protoplastos, cultivo de tejidos haploides (anteras y óvulos), generación de variabilidad genética, estudios de crecimiento, producción de metabolitos secundarios para uso industrial y medicinal, conservación del germoplasma, estudios básicos, etc. (George y Sherrington, 1984; George, 1993).

El fundamento teórico del cultivo *in vitro* es el concepto de la totipotencialidad celular. Schleiden y Schwann (1887) describieron en su teoría celular, que la célula es capaz de subsistir por sí sola si las condiciones externas le son favorables. Más tarde a Morgan (1901) se le atribuye el término de la totipotencialidad celular propiamente dicho, que dice que una célula es capaz de desarrollarse hasta formar un organismo completo si las condiciones ambientales le son favorables y si se le aplican los estímulos adecuados.

No fue sino hasta que Haberlandt (1902) fundamentado con la idea de la totipotencialidad celular desarrolló el primer cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Desafortunadamente sus trabajos no fueron exitosos debido a que utilizó un medio de cultivo relativamente simple y por otra parte, tejidos vegetales demasiado diferenciados.

Sin embargo, White (1932) logró el primer cultivo *in vitro* estable utilizando en sus experimentos ápices de raíces de jitomate. Los tejidos meristemáticos del ápice radical propiciaron crecimiento en longitud de los mismos en el medio de cultivo. La falla en los

intentos realizados por varios investigadores entre 1902 y 1932 se debió, como lo menciona White, a la mala elección del material vegetativo y a la simplicidad de los medios de cultivo utilizados. El logro de White le dio un impulso al desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro*; sin embargo en sus trabajos realizados hasta entonces no obtuvo proliferación celular en forma, los ápices de raíz solo crecieron en longitud como lo harían normalmente como parte de la raíz de la planta intacta. No fue sino hasta 1934 cuando Gautheret logró proliferación celular *in vitro* en tejidos de cambium provenientes de plantas adultas.

En 1939 Gautheret, Nobecourt (en tejidos de zanahoria) y White (en tejidos de tabaco) habiendo trabajado independientemente estos tres investigadores, publicaron casi simultáneamente la formación de una masa de células parenquimatosas (callo) a partir de los explantes (tejidos) utilizados en sus experimentos. Este hecho significativo constituyó en sí otro paso más en el establecimiento firme de las técnicas de cultivo *in vitro*.

La regeneración *in vitro* sólo es posible cuando logra establecer explantes en condiciones asépticas e iniciar el cultivo *in vitro*, éstos se pueden ver influenciados por múltiples factores, entre los más trascendentes están: el tipo y el estado fisiológico de los explantes, la variabilidad genética de éstos, los reguladores de crecimiento y el medio nutritivo utilizado (George, 1993).

Los componentes del medio de cultivo están químicamente balanceados en sus sales minerales, fuentes de carbono, vitaminas y aminoácidos por lo que una correcta elección del medio puede ayudar a obtener respuestas favorables. Otros factores que se deben considerar son el pH, luz, y la temperatura de incubación. La manipulación de todos estos factores permite al investigador variar las condiciones de cultivo y llegar a dirigir la respuesta morfogénica y biosintética de las células (Dodds y Roberts, 1982).

De manera general, George y Sherrington (1984) establecieron cinco etapas para llevar a cabo el proceso de la micropropagación.

Etapas 0: Selección de la planta madre y preparación, la cual debe ser típica de la variedad y estar libre de patógenos.

Etapas 1: Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia. Una vez escogida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes.

Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia. Para lograr la asepsia se pueden utilizar campanas de flujo laminar donde se mantiene el ambiente estéril.

Etapa 2: Multiplicación de los brotes. En esta etapa se induce la multiplicación de órganos y estructuras que sean capaces de dar como resultado nuevas plantas intactas.

Etapa 3: Elección de un medio de enraizamiento de los explantes. En esta etapa se prepara a las plántulas para que puedan llevar a cabo la fotosíntesis y sobrevivir sin suplemento artificial de carbohidratos. Para enraizar los explantes se utilizan principalmente dos métodos:

- Enraizamiento *In vitro*

Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga auxinas. Esta operación se realiza en la campana de flujo laminar. Este método permite ser más flexible a la hora de escoger los brotes, ya que éstos obtienen del medio la fuente de energía para enraizar, y por tanto no es necesario que tengan las hojas muy bien desarrolladas para realizar la fotosíntesis.

- Enraizamiento *Ex Vitro*

Los explantes se deben transferir a un sustrato limpio, aunque no necesariamente estéril, que puede ser una mezcla de turba con perlita o vermiculita. Con este método es necesario que el medio de enraizamiento esté libre de organismos patógenos y que los brotes tengan las hojas bien desarrolladas, ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para enraizar y desarrollarse. Los explantes deben de plantarse en contenedores cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada, y hacerlos enraizar en el laboratorio, o ponerlos en 'multipots' dentro de un invernadero en un área sombreada con "fog-system (nebulización)" o "mist-system (rocío fino)".

Etapa 4: Aclimatización de los explantes enraizados. Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatización. Si los explantes fueron enraizados *in vitro* como *ex vitro*, en el momento en que se extraen los explantes de los recipientes de enraizamiento están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas “perezosos” para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación del explante.

Por otra parte crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cerosa bien desarrollada, que es la barrera para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. Los explantes deben ser aclimatizados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz.

La regeneración de plantas a través de CTV pueden ser por dos vías diferentes en las cuales se pueden obtener plantas completas y son: 1) Organogénesis (directa o indirecta), 2) Embriogénesis somática (directa o indirecta) (Figura 8) (George y Sherrington, 1984; Bonga y von Aderkas, 1992).

2.4.1 Organogénesis.

La Organogénesis es un evento morfogenético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión vascular entre los nuevos brotes y el tejido materno (Pérez, 1998). Mediante la Organogénesis se pueden obtener tallos, raíces o flores (George, 1993). Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división celular (Joy Iv y Thorpe, 1995).

George (1993) describió que los métodos de propagación son básicamente: por la generación de brotes a partir de brotes axilares; por la formación de brotes adventicios, y/o embriones somáticos adventicios ya sea de manera directa o indirecta.

Organogénesis Directa. El proceso de iniciación de brotes se da a partir de adicionar al medio de cultivo citocininas, por ejemplo; Benciladenina (BA), sola o acompañada de una auxina (en bajas concentraciones), por ejemplo ácido naftalenacético (ANA), con lo que se induce la diferenciación de brotes (Kantha, 1982).

La etapa de enraizamiento puede darse junto con la propagación de brotes; los factores que pueden acelerar dicho proceso son las auxinas (IBA, IAA, etc.), carbohidratos y fotoperíodo (Gautheret, 1966). Generalmente los brotes se separan del tejido madre y se pueden subcultivar individualizados en un medio sin reguladores o con IBA, auxina de las más utilizadas para el enraizamiento *in vitro* (Escobar *et al.*, 1986; George, 1993).

Organogénesis Indirecta. Por esta vía se incluye la fase de callo. La cual está integrada por células meristemáticas (meristemoides) antes de formar órganos en el explante (Dodds y Roberts, 1982), las células que van a inducir la Organogénesis estarán localizadas en la superficie del explante además de estar en contacto con el medio nutritivo (Widholm *et al.*, 1985). Se inicia induciendo al tejido para que se presente la fase de callo, lo cual se logra con altas concentraciones de auxinas y bajas concentraciones de citocininas. El callo cuenta con diferentes tipos de células (en tamaño y tipo); cuando éstas están bien establecidas en el medio, empieza a haber actividad meristemática ya sea por una célula o por un grupo de células de callo; estas células serán precursoras de órganos como raíces y/o brotes (Widholm *et al.*, 1985).

2.4.2 Embriogénesis somática.

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). Los embriones somáticos son

estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno; estas estructuras son capaces de crecer, germinar y formar plantas completas (Sharp *et al.*, 1980; Gómez; 1998), se ha descrito, como en el caso de la zanahoria que tanto embriones cigóticos como somáticos son estructural y bioquímicamente idénticos (Ammirato, 1989).

Según Sannasgala (1989) y Escalant y Teissont (1989) el embrión somático presenta las siguientes características:

- Tienen autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por la epidermis). Histológicamente se plantea que no tienen conexión con el tejido vascular materno por lo que pueden ser separados fácilmente de éste.
- Es una estructura bipolar con un ápice radical, apical y cotiledones

Según Parrot (1993), la inducción del estado embriogénico incluye la inducción de los mismos mecanismos genéticos que conducen a la embriogénesis cigótica. Contrariamente a los embriones cigóticos, los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes, sino que poseen la misma combinación genética de la planta fuente del explante. La propagación de plantas, a través de la embriogénesis somática, representa el método más eficiente de la multiplicación clonal de plantas que se ha desarrollado hasta la fecha (Sharp *et al.*, 1980; McKersie y Brown, 1996; Gómez, 1998). Se puede emplear tanto en especies que se reproducen por semillas como aquellas de propagación vegetativa (Gray, 1997).

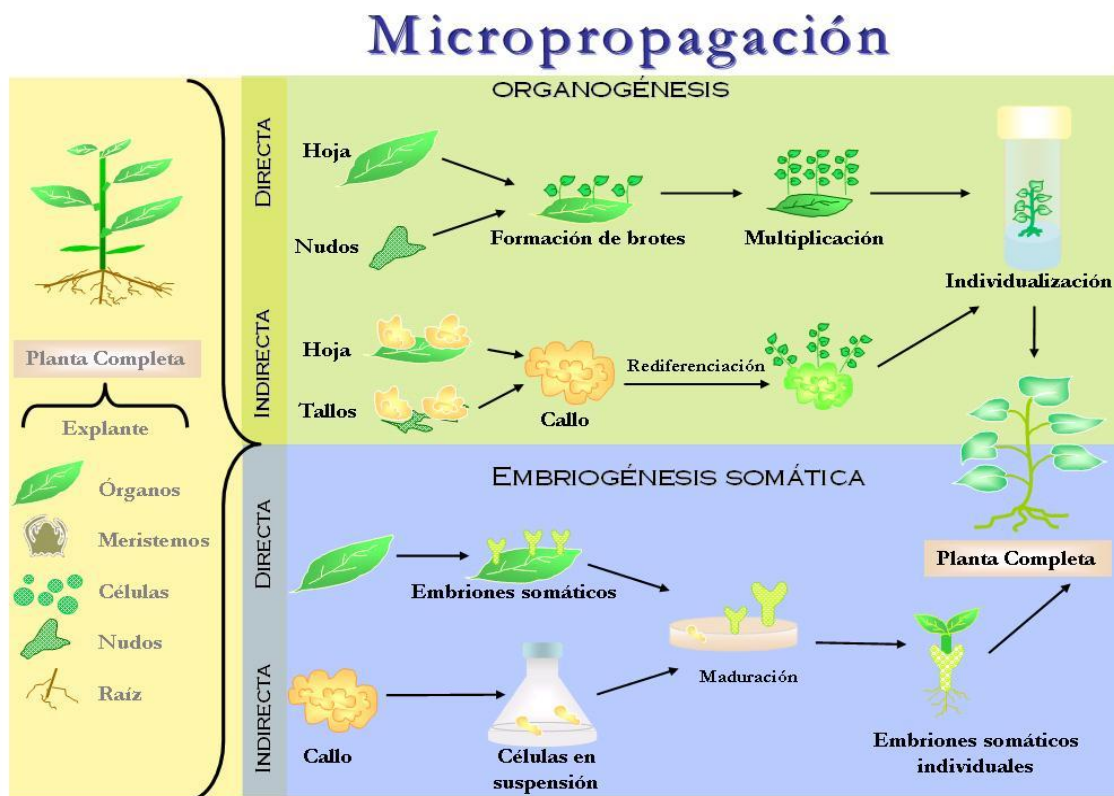


Figura 8. Vías morfogénicas en el cultivo de tejidos vegetales (George y Sherrington, 1984; modificado por Cabrera).

2.5 Morfogénesis en cícadas.

La forma usual en que las gimnospermas han sido regeneradas *in vitro* ha sido a partir de yemas adventicias formadas por organogénesis en tejidos de plántulas (Bonga, 1987). Los reportes sobre embriogénesis somática son escasos y solo se han logrado mediante cultivos de embriones cigóticos, megagametofitos y secciones de cultivo de plántulas en cultivo *in vitro* (Norstog y Rhamstine, 1967; Rohr *et al*, 1989; Attree y Fowke, 1991). La regeneración a partir de tejidos somáticos de gimnospermas maduras ha sido un gran obstáculo, hay pocos reportes de regeneración a partir de estos, en realidad solo Bonga (1981; 1982), Ball *et al*. (1978) y Ball (1981) que describieron el desarrollo de brotes adventicios, respectivamente de *Larix decidua* Mill. y *Sequoia sempervirens* Endl., por lo que hasta ahora existe una publicación sobre embriogénesis a partir de estructuras vegetativas de plantas adultas de gimnosperma, incluidas las cícadas. Por lo que todo intento sobre morfogénesis *in vitro* a partir de estructuras somáticas de gimnospermas debe de aportar resultados de gran interés. Los

estudios en cícadas sobre embriogénesis somática y en general de morfogénesis *in vitro* son escasos (Tablas 4, 5 y 6). Los resultados presentan grandes semejanzas con los encontrados en coníferas sobre las que existe un mayor conocimiento del proceso de embriogénesis somática *in vitro*.

Tabla 4. Embriogénesis somática en Gimnospermas

| ESPECIE | EXPLANTE | REFERENCIA |
|------------------------------------|-----------------------------|--|
| <i>Abies alba</i> L. | E inm | Schuller <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>Larix decidua</i> Mill. | M inm | Aderkas <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>L. eurolepis</i> A. Henry | E inm | Hakman <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>Picea abies</i> L. | E inm E mad E mad | Hakman y von Arnold, 1985 Gupta y Durzan, 1986 Jain <i>et al.</i> , 1988 |
| <i>Picea glauca</i> (Moench) Voss. | Protoplastos E Inm E mad | Hackman y Fowke, 1987 ^a Tremblay <i>et al.</i> , 1991 ^a |

E: embrión cigótico; mad: maduro; inm: inmaduro; M: megagametofito

El estado de inmadurez influye en la frecuencia de inducción, la cual decrece conforme la semilla madura (Becwar *et al.*, 1990; citados por Attree y Fowke, 1991). En especies de *Pinus* los embriones en un estado precotiledonario son más morfogenéticos; en *Picea* responden mejor los embriones en las primeras etapas cotiledonarias (Attree y Fowke, 1991). A partir de embriones maduros se han podido regenerar cultivos embriogénicos con semillas almacenadas unos cuantos meses y hasta por 10 años o más (Tremblay, 1991 citado por Attree y Fowke, 1991). Pero en comparación con los embriones inmaduros las condiciones para la inducción son más restrictivas y el proceso es más tardado (Gupta y Durzan, 1986).

En coníferas la inducción de cultivos embriogénicos a partir de plántulas, se ha logrado precultivando en un medio con una citocinina, generalmente BAP; por ejemplo los explantes utilizados han sido cotiledones de *Picea abies* (Lelu *et al.*, 1987 citados por Attree y Fowke, 1991) y *Sequoia sempervirens* (Bourgarkard y Fabre, 1988). Los megagametofitos son haploides y dado que estos no son tejidos somáticos, si no gaméticos, los embriones que se forman de ellos se denominan haploides o gaméticos. Los megagametofitos de *L. decidua* que fueron propicios para la inducción embriogénica se colectaron 4 semanas después de la fertilización (Nagmani y Bonga, 1985). También a partir de megagametofitos de *Picea abies* se

regeneraron embriones haploides (Simola y Santanen, 1990 citados por Attree y Fowke, 1991).

Tabla 5. Respuestas morfogénicas *in vitro* en cícadas.

| | Autor | Especies | Explante (respuesta) |
|-------|-------------------------|--|--|
| 1948 | LaRue | <i>Zamia floridiana</i> | M (Raíz, brotes, pseudobulbos) |
| 1950 | LaRue | <i>Cycas revoluta</i> | M (Raíz, bulbos, pseudobulbos) |
| 1965 | Norstog | <i>Zamia integrifolia</i> | M, Em (callos, raíz, hojas, SE) |
| 1967 | Norstog y Rhamstine | <i>Zamia pumila</i> | M, Em inmaduro (SE) |
| 1979 | De Luca <i>et al.</i> | <i>Cycas revoluta</i> <i>Ceratozamia mexicana</i> | M (H) M (raíz coraloide) |
| 1979 | De Luca y Sabato | <i>Cycas revoluta</i> , <i>Macrozamia comunis</i> | M (raíz coraloide) |
| 1980 | Ribera Rosa unpubl. | <i>Zamia pumila</i> | M (SE) Osborne, 1990 |
| 1982 | Peña y Grillo | <i>Microcycas calocama</i> | M (brotes, raíz, pseudobulbos) |
| 1983 | Laliberte <i>et al.</i> | <i>Encephalartos villosus</i> | Semillas (estructuras nodulares) |
| 1987 | Henson | 35 spp. <i>Zamia pumila</i> | Megspl, Micspl, H, OV, CR (C) (R) |
| 1987 | Osborne y van Staden | <i>Stangeria eriopus</i> | R (H) |
| 1992 | Chávez <i>et al.</i> | <i>Ceratozamia mexicana</i> <i>C. hildae</i> | M, Em (SE, R, plántulas, brotes) |
| 1992 | Chávez <i>et al.</i> | <i>Zamia pumila</i> , <i>Z. fischeri</i> , <i>Z. furfuracea</i> | M, Em (SE, R, plántulas, brotes) |
| 1992c | Chávez <i>et al.</i> | <i>C. mexicana</i> | H- individuos maduros (SE, plántulas) |
| 1995 | Litz <i>et al.</i> | <i>C. hildae</i> | H- individuos maduros (SE, plántulas) |
| 1996 | Jäger y van Staden | <i>Encephalartos dyerianus</i> <i>E. natalensis</i> | Em, (SE, brotes) Em, (SE, brotes) |
| 1996 | Jäger y van Staden | <i>E. cycadifolius</i> | Em (SE) |
| 1998 | Chávez <i>et al.</i> | <i>C. euryphyllidia</i> | H- individuos maduros (SE, plántulas) |
| 1999 | Chávez y Litz | <i>Dioon edule</i> | M, Em (R, brotes) |
| 2008 | Cabrera <i>et al.</i> | <i>Dioon merolae</i> | M, Em (R, brotes) |

M: megagametofito; Em: embrión cigótico; SE: embrión somático; Megspl: megasporófilos; Micspl: microsporófilos; H: hoja; OV: ovulo; CR: raíz coraloide; C: callo; R: raíz.

Durzan y Durzan (1991) aplicaron una terminología para discernir entre los distintos tipos de poliembrionía (Tabla 7) dependiente de la naturaleza del tejido o estructura original y utilizaron el término poliembriogénesis para identificar y enfatizar el proceso (poliembrionía cigótica o somática) que ocurre en cultivos *in vitro* de embriones cigóticos o

somáticos en coníferas, sin que intervenga una fase de callo. Este proceso ocurre como resultado de la gemación o división de embriones cigóticos o somáticos (poliembrionía por división o poliembriónesis).

Tabla 6. Embriogénesis somática en cícadas.

| ESPECIE | EXPLANTE | REFERENCIAS |
|--|--------------------------------|--|
| <i>Zamia pumila</i> | M M, E E E M, N, E | LaRue, 1948; 1954 Norstog, 1987 Norstog y Rhamstine, 1967 Webb <i>et al.</i> , 1983 Chávez <i>et al.</i> , 1992a |
| <i>Zamia fischeri</i> | M, E | Chávez <i>et al.</i> , 1992b |
| <i>Zamia furfuracea</i> | M, E | Chávez <i>et al.</i> , 1992b |
| <i>Ceratozamia hildae</i> | M, E H | Chávez <i>et al.</i> , 1992a Litz, <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>C. euryphyllidia</i> | H | Chávez <i>et al.</i> 1998 |
| <i>C. mexicana</i> | M, E | De Luca <i>et al.</i> , 1979 |
| <i>C. mexicana</i> var. <i>robusta</i> | M, E H | Chávez <i>et al.</i> , 1992a Chávez <i>et al.</i> , 1992c |
| <i>Encephalartos cycadifolius</i> | E | Jäger y van Staden, 1996b |
| <i>Encephalartos dyerianus</i> | E | Jäger y van Staden, 1996a |
| <i>Encephalartos natalensis</i> | E | Jäger y van Staden, 1996a |

E: embrión cigótico; M: megagametofito; H: hoja de planta adulta; N: núclea

Tabla 7. Origen y características de las poliembrionías cigótica y somática *.

| TIPO | ORIGEN | GENOTIPO RECUPERADO |
|---|--|--|
| Simple (policigótica) | Varios huevos en un megagametofito | Variable debido a la fertilización |
| División o gemación (cigótica o somática) | Formación de múltiples embriones por segmentación de un embrión, comúnmente con un estado de núcleos libres | Idénticos a la nueva generación |
| Esporofítica (falsa poliembrionia) | 1. varios megagametofitos 2. gemación del núcleo, etc. 3. explantes de fases embrionaria, juvenil y/o madura | Variable debido al genotipo materno variación (somaclonal) basada en el genotipo fuente |

| | | |
|--------------|--|---|
| Gametofítica | 1. megagametofitos 2. microgametofito | Variable debido al genotipo materno Variable basada en el genotipo paterno y posible polispermia |
|--------------|--|---|

* Durzan y Durzan (1991)

Entre los principales medios de cultivo utilizados se encuentran W, MS y B5 (Tabla 8), enriquecidos con hidrolizado de caseína, glutamina, myo-inositol. En general los medios contienen altos niveles de sales, de NH_4^+ y NO_3^- (Thorpe, 1988 citado por Thorpe *et al.*, 1991).

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

Tabla 8. Medios de cultivo utilizados para la inducción de embriones somáticos en cícadas y coníferas.

| ESPECIE | MEDIO BASAL | REFERENCIA |
|---|---|---|
| <i>Ceratozamia hildae</i> | B5 modif. | Chávez <i>et al.</i> , 1992a |
| <i>C. mexicana</i> | W modif. | De Luca <i>et al.</i> , 1979 |
| <i>C. mexicana</i> var. <i>Robusta</i> | B5 modif. | Chávez <i>et al.</i> , 1992a, c |
| <i>Zamia fischeri</i> | B5 modif. | Chávez <i>et al.</i> , 1992a |
| <i>Zamia furfuracea</i> | B5 modif | Chávez <i>et al.</i> , 1992b |
| <i>Encephalartos dyerianus</i> , <i>E. natalensis</i> | B5 modif | Chávez <i>et al.</i> , 1992a |
| <i>Zamia pumila</i> | W W modif y Norstog MS modif. B5 modif | LaRue, 1948 Norstog, 1965 Norstog y Rhamstine, 1967 Chávez <i>et al.</i> , 1992b |
| <i>Sequoia sempervirens</i> | MS 50% | Bourgkard y Favre, 1988 |

| | | |
|-----------------------------------|-----------|---------------------------|
| <i>Encephalartos cycadifolius</i> | B5 y MS | Jäger y van Staden, 1996b |
| <i>Dioon merolae</i> | B5 modif. | Litz, 1995 |

MS: Murashige y Skoog (1962); Norstog: Norstog y Smith (1963); W: White (1943); B5: Gambort *et al.*, (1968).

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

Tabla 9. Cultivos *in vitro* de *Dioon*.

| Especie | Explante | Respuesta Morfológica | Medio | Referencia |
|-----------------------|------------------|-----------------------|---|------------------------------|
| <i>Dioon edule</i> L. | Megagametofitos | C, S | Medio Litz (18.6-23.2 μ M K; 2.3-9.0 μ M 2,4-D) | Chávez y Litz, 1999 |
| <i>Dioon edule</i> L. | Embrión cigótico | C, S | Medio Litz (18.6-23.2 μ M K; 2.3-9.0 μ M 2,4-D) | Chávez y Litz, 1999 |
| <i>Dioon meroale</i> | Embrión cigótico | C, S | Medio Litz (9 μ M K; 9-21.3 μ M 2,4-D) | Cabrera <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Dioon meroale</i> | Megagametofitos | C, S, CR | Medio Litz (9-21.3 μ M 2,4-D) | Cabrera <i>et al.</i> , 2008 |

C: callo; CR: raíz coraloide; S: brote; SE: embrión somático.

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

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

La capacidad morfogénica demostrada en varias especies de cícadas a partir de megagametofitos y embriones cigóticos, aunado a la regeneración de brotes a partir de raíces de plántulas de *Stangeria eriopus*, y el desarrollo de embriones somáticos a partir de folíolos de tres especies de *Ceratozamia* y *Dioon* (Tabla 9), son avances en el conocimiento que impulsan a explorar la posibilidad de promover el potencial regenerativo *in vitro* de estructuras somáticas de plantas maduras. *Dioon merolae* De Luca, Sabato & Vázquez-Torres es una especie en peligro de extinción a la que el cultivo de tejidos podría ayudar a su conservación y a obtener un mayor conocimiento de la misma.

3. Justificación.

La especie *Dioon merolae*, es endémica de Chiapas y Oaxaca. Su importancia radica en varios aspectos tales como el biológico al ser fijadora de nitrógeno atmosférico; evolutivo al pertenecer al grupo de las gimnospermas más antiguas; etnobotánico por su uso religioso y cultural en diferentes pueblos de México; y como planta ornamental.

Desafortunadamente con la destrucción de su hábitat, provocado por la sobreexplotación y el saqueo ilegal de plantas y semillas, la especie *Dioon merolae* se encuentre en grave peligro de extinción. Sumado a esto, la planta presenta serias dificultades para su propagación, pues sus semillas tardan mucho en germinar (de 4 meses a 1 año) y aún no se han tomado medidas para la conservación y propagación ni *in situ* ni *in vitro*. El uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, permitiría obtener cultivos morfogénicos, además de micropropagar masivamente la especie, brindando al mismo tiempo una fuente que provea continuamente del material vegetal.

Por ello es importante resaltar la realización de estudios para su conservación y que sirvan como base para la obtención de plantas masivamente, de buena calidad; la elaboración de programas de manejo y preservación que permitan continuar con los usos tradicionales y también con la comercialización de la especie, pero sin que esto provoque una merma significativa en su población. El presente trabajo pretende establecer condiciones de cultivo *in vitro* de *D. merolae* que puedan conducir a su micropropagación mediante la organogénesis o la embriogénesis somática a partir de folíolos jóvenes, embriones cigóticos y

megagametofitos y con ello contribuir de esta manera al desarrollo de nuevas técnicas de cultivo para esta especie en peligro de extinción.

4. Objetivos.

4.1 Objetivo general.

Establecimiento de condiciones *in vitro* para la inducción de morfogénesis en *Dioon merolae* De Luca, Sabato y Vázquez Torres (Zamiaceae) especie en peligro de extinción.

4.2 Objetivos particulares.

- Establecer cultivos asépticos *in vitro* a partir de megagametofitos, embriones cigóticos y folíolos.
- Describir y evaluar la acción de diferentes reguladores de crecimiento en la promoción de respuestas morfogénicas a partir de folíolos inmaduros de plantas adultas de *D. merolae*.
- Evaluar la acción de diferentes reguladores de crecimiento en la promoción de respuesta morfogénica a partir de embriones cigóticos y megagametofitos de *D. merolae*.
- Determinar histológicamente la identidad de las estructuras en diferentes etapas de desarrollo

5. Materiales y Métodos.

5.1 Obtención del material biológico.

Se recolectaron semillas de *D. merolae* en enero y en agosto de 2004 de poblaciones naturales, localizadas al noroeste del Ejido Andrés Quintana Roo, municipio de Jiquipilas, Chiapas (Figura 6). La colecta de los conos femeninos en donde se encuentran las semillas se realizó de la siguiente forma: antes de cortar el cono se extrajo una escama del cono y se sacó una semilla de la parte apical, otra de la parte media y otra de la basal, mientras el cono estaba *in situ*, y posteriormente las semillas se cortaron a la mitad longitudinalmente para determinar el estado de madurez (Figuras 9 y 10). Se obtuvieron un total de 93 semillas las cuales estuvieron libres de insectos.

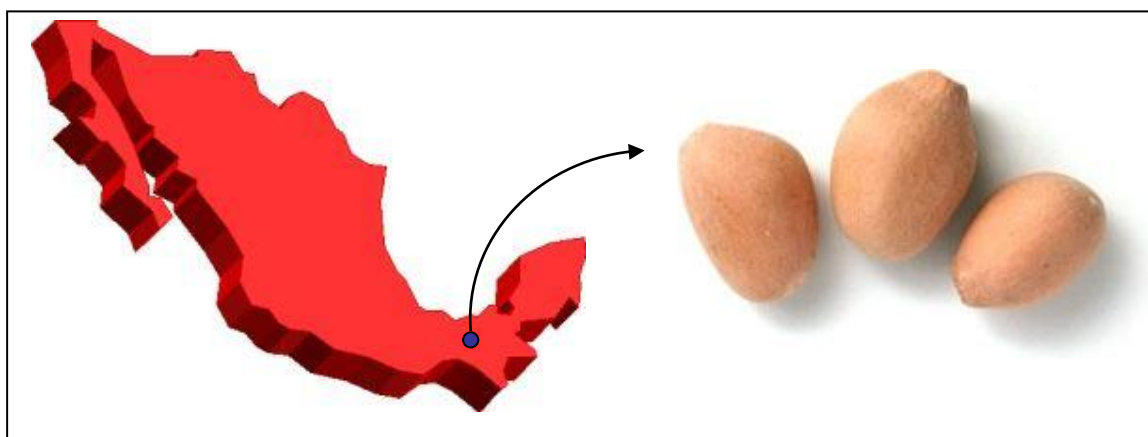


Figura 9. Semillas de *Dioon merolae* colectadas en Jiquipilas Chiapas.

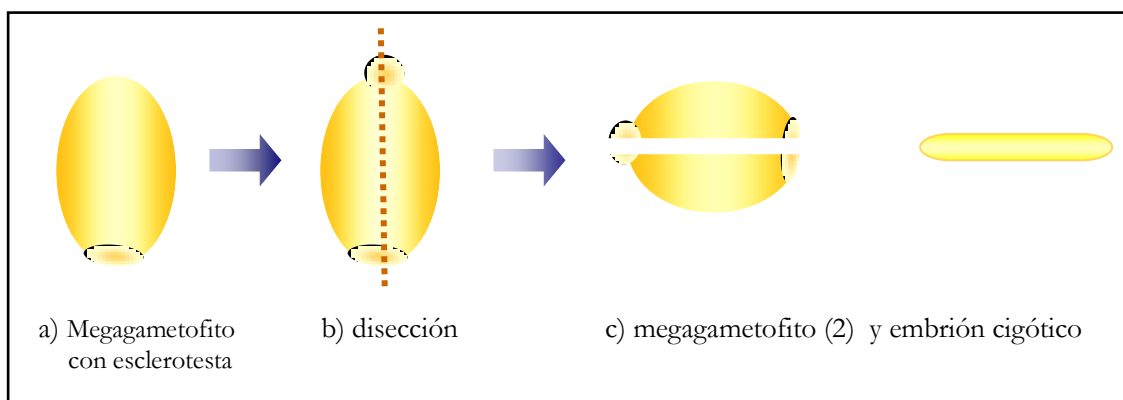


Figura 10. Disección del megagametofito para la obtención de los explantes.**5.2 Desinfección de los explantes.**

A partir de conos que empezaban a madurar, las semillas fueron lavadas con detergente, se enjuagaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico) al 30% (v/v) por 30 min, en agitación. Bajo condiciones asépticas se rompió y se removió la esclerotesta (cubierta dura) quedando al descubierto el megagametofito. Los megagametofitos fueron desinfectados agitándolos 30 s en etanol 70% y posteriormente 20 min en hipoclorito de sodio 20% (v/v), después se enjuagaron 3 veces con agua destilada esterilizada. Se disectaron longitudinalmente, el embrión se separó del megagametofito de cada semilla y ambos tejidos fueron utilizados como explantes. El embrión cigótico fue usado intacto y el megagametofito fue dividido en dos piezas iguales (Figura 10).

Folículos. De un individuo adulto fueron colectados ápices de hojas inmaduras con folíolos de aproximadamente 3–30 mm de longitud, se lavaron 1- 2 min con agua corriente. Subsecuentemente sumergidos durante 5 min en una solución de detergente suave, en agitación.

Se desinfectaron con etanol al 70% por 30 segundos, seguidos de NaOCl al 10% (v/v) conteniendo 2-3 gotas del emulsificante tween-20 (polioxitileno sorbitan monolaurato) por cada 100 ml de solución (con la finalidad de romper con la tensión superficial) y se mantuvieron en agitación por 20 min. Los explantes se enjuagaron 2 veces con agua destilada desionizada esterilizada antes de ser sembrados asépticamente. Los folíolos se cultivaron en forma individual en cajas petri en medio nutritivo semisólido de inducción (Chávez, 1993).

5.3 Preparación y esterilización del medio de cultivo.

El medio de cultivo consistió en un medio denominado Litz (Richard E. Litz y Víctor M. Chávez, 1993; Chávez *et al.*, 1992a - c; 1998) que contenía los macronutrientes del medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968), los micronutrientes y compuestos orgánicos del Murashige y Skoog (MS) (1962), y en concentraciones de mg l⁻¹; glutamina 100, hidrolizado de caseína 100, asparagina 100, arginina 100, ácido ascórbico 100; sacarosa 60 g l⁻¹. El medio de cultivo (medio de inducción) fue suplementado con las combinaciones del ácido 2,4-

diclorofenoxiacético (2,4-D) (0, 0.45, 2.26, 4.52, 9.05 μM) con kinetina (K) (0, 2.32, 4.60, 9.30, 13.90 μM), definidas a lo largo del presente estudio como 2,4-D/K, obteniéndose 24 combinaciones o tratamientos y un control. El pH del medio se ajustó a 5.7, y se adicionaron 4 g/l de Gellan-gum. El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave durante 15 min a 121°C y 1.5 kg/cm².

La unidad experimental consistió de un frasco con un explante (un embrión o la mitad de un megagametofito), o una caja petri/4 explantes de folíolos, con diez repeticiones por tratamiento. Los cultivos fueron incubados en oscuridad a 25°C, y subcultivados mensualmente en medio de inducción. Las variables que se evaluaron fueron: a) porcentaje de embriones germinados, b) porcentaje de explantes que formaron callos, c) número de brotes. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson (X_2) para medir las diferencias de la variable de germinación.

Los explantes fueron cultivados en medio de inducción semisólido previamente descritos para otras especies de cícadas (Chávez *et al.*, 1992a-c; 1998).

5.4 Análisis histológico.

Uno de los procedimientos que han apoyado el entendimiento y el conocimiento de los procesos de distintos estados morfogénicos de los cultivos *in vitro* son los estudios histológicos. Es por esto que el propósito de este análisis fue de caracterizar histológicamente las estructuras generadas durante el desarrollo de los procesos de los cultivos *in vitro*. Se procesaron muestras de megagametofitos y de embriones cigóticos a diferentes tiempos (cada mes) y en diferentes partes del proceso morfogénico, de los cultivos que formaron callo y en estados precotiledonarios de embriones cigóticos de *D. merolae* se tomaron muestras cada mes y por triplicado para su análisis histológico.

A) Obtención del material vegetal

El material para su procesamiento se identificó y etiquetó. Se tomaron muestras representativas, y libres de algún ataque de patógenos.

B) Fijación

Las secciones de callo fueron fijados con Navashin (Apéndice II) en viales de 20 ml de capacidad durante 24 h (Johansen, 1940), en agitación constante y después se enjuagaron con agua corriente por 2 h aproximadamente para eliminar todo el fijador (Sandoval, 2005).

C) Deshidratación

Posteriormente se realizó la deshidratación a través de una serie gradual de solución agua-alcohol etílico-alcohol terbutílico (ATB), con concentraciones de 30%, 50%, 70%, 95%, 100% y ATB absoluto. Las muestras permanecieron 24 h en cada solución. La infiltración e inclusión se realizaron con paraplast puro por 24 h (Johansen, 1940; Sandoval, 2005).

D) Infiltración

Del último cambio de ATB se desechó un poco, para sólo dejar el volumen que cubriera la muestra. Posteriormente, a intervalos de 1 hora, se agregaron hojuelas de paraplast puro (Curtis, 1986), colocando los viales tapados en la estufa a 60 °C, hasta doblar el volumen inicial del último cambio de ATB puro. Después de haber alcanzado dicho volumen, se destaparon los viales colocándolos nuevamente dentro de la estufa para la completa evaporación del TBA, dejándolo de esta manera durante 24 h. Se vació el paraplast del vial y se reemplazó con paraplast puro fundido y se dejó en la estufa por un periodo de 48 h (Sandoval, 2005).

E) Inclusión

El material se incluyó en paraplast puro del mismo punto de fusión. Para hacer los bloques, se vertió paraplast fundido en recipientes de papel encerado (“cubos”) y se colocó la muestra de callo en el centro, dejándolos enfriar y solidificar. Los cubos se refrigeraron a 4°C por un intervalo de 2 a 3 h, después de las cuales se eliminó el exceso de paraplast y se montaron en una base de madera o portabloques, refrigerando nuevamente por 2 a 3 h (Sandoval, 2005).

F) Obtención de secciones

Se obtuvieron cortes de 6, 8, 10 μm de espesor con un micrótopo de rotación American Optical 820. Los listones se colocaron en un baño de flotación (agua a 23-25 °C más una pizca de grenetina disuelta) hasta que estuvieron completamente extendidos, se recuperaron con un portaobjetos y se dejaron secar por un periodo de 24 h a temperatura ambiente (Sandoval, 2005).

G) Desparaplastificación y rehidratación

Se colocaron los portaobjetos en una canastilla y se introdujeron a la estufa (60 °C) por un periodo de 20 min para su desparaplastificación (Johansen, 1940). Para rehidratar las muestras se colocaron en la canastilla en un tren de alcoholes graduales, dejándolos 10 min en cada solución (xileno puro, xileno-alcohol etílico 1:1, etanol absoluto, 96%, 70%, 50%, 30% y agua destilada) (Sandoval, 2005).

H) Tinción con Safranina “O” – Verde rápido

Las muestras se tiñeron con la técnica dicrómica safranina-verde rápido (Sass, 1958). Esta técnica de tinción utiliza dos colorantes selectivos para ciertos tejidos, proporcionando un buen contraste entre los distintos tipos celulares. La safranina tiñe estructuras

nucleares, paredes celulares lignificadas, cutinizadas y suberizadas. El verde rápido es un colorante ácido que actúa sobre estructuras citoplasmáticas y paredes celulósicas.

Las muestras rehidratadas se tiñeron con safranina (Apéndice IV) durante 24 h, para posteriormente lavarlas con agua destilada. Posteriormente se sometieron a un tren de deshidratación de alcoholes graduales 30%, 50%, 70% y 96%, por un periodo de 5 min en cada uno. Se les agregó verde rápido (Apéndice V) durante 2 min, para después retirar el exceso de verde rápido con alcohol absoluto. A continuación se les aplicó aceite de clavo por un periodo de 8 min para finalmente colocarlas en xileno por 5 min (Sandoval, 2005).

I) Montaje

Las preparaciones obtenidas se montaron en resina sintética Permout y se dejaron secar en el horno a 60°C durante 15 días como preparaciones permanentes.

J) Limpieza y etiquetado

Una vez que se secó la resina, las laminillas se limpiaron y se etiquetaron con los siguientes datos: nombre de la especie, familia, fecha de obtención de muestra, estructura, tipo de tinción, nombre del procesador y fecha de elaboración (Sandoval, 2005).

K) Registro

Posterior al registro de las laminillas, éstas se analizaron y se capturaron imágenes digitales a través de un fotomicroscopio Carl Zeiss-Axioskop.

6. Resultados y Discusión.

6.1 Obtención del material biológico.

Se realizaron dos colectas en 2004: primero en enero y se obtuvieron semillas maduras y la segunda colecta en agosto, para la obtención de los folíolos de *D. merolae* de poblaciones naturales localizadas al noroeste del ejido de San Andrés Quintana Roo, municipio de Jiquipilas Chiapas. En la colecta del material se observó que las poblaciones mantenían una muy poca cantidad de folíolos inmaduros en las plantas adultas y de las cuales se recolectaron aproximadamente 250 folíolos. Las hojas mostraban una apariencia verde como se muestra en la figura 11. Las semillas se caracterizaron por ser de gran tamaño 3.5 cm^3 dispuestas en forma helicoidal en el megastrobilo (Figura 12 A-B), y se obtuvieron un total de 93 semillas las cuales estuvieron libres de patógenos.



Figura 11. Hojas jóvenes de *Dioon merolae*.

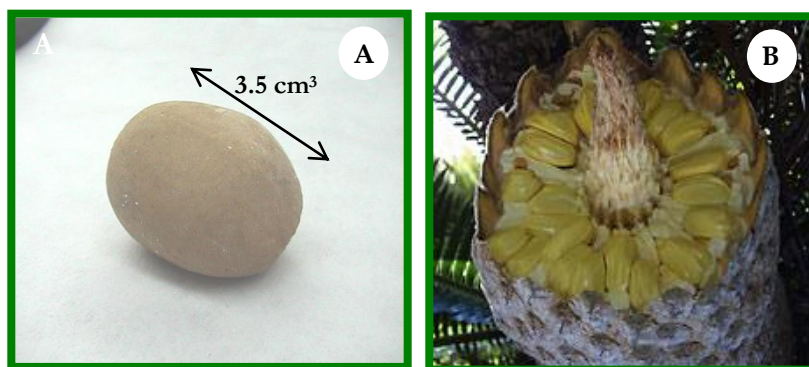


Figura 12. Semilla con esclerotesta (A) y cono de semillas de color amarillo (con la sarcotesta) (B).

6.2 Germinación.

Un proceso muy importante fue inducir y observar el proceso de germinación *in vitro* para poder describir y comparar el desarrollo y tiempo con lo que ocurre en la naturaleza o bajo condiciones de invernadero. De los conos colectados, las semillas contuvieron embriones con una longitud promedio igual o mayor a $\frac{3}{4}$ de longitud del megagametofito lo cual es un indicativo que las semillas estaban maduras, de acuerdo a los datos que menciona Pérez (1994) y Vovides (1992) en donde si el promedio de la longitud del embrión era igual o mayor a $\frac{3}{4}$ de la longitud del megagametofito ellos reportaron conos maduros.

Al tiempo de la siembra, el 90% de los embriones tenían un largo suspensor enrollado, con un cuerpo de embrión (0.7-1 cm longitud) de color pajizo o amarillo claro, inicialmente ovalado elongado, en estado cotiledonar temprano y conforme se hidrataron y desarrollaron, se elongaron hasta alcanzar eventualmente una forma cilíndrica. La superficie de los embriones se notó más endurecida y su color se volvió un poco más amarillento; entonces en los embriones de menor tamaño se empezó a notar una ligera depresión en el ápice, como un preludio de la definición de los cotiledones (Figura 13 A-B).

En tres de los embriones de mayor tamaño, al término de 15 días después de la siembra, sus cotiledones se elongaron de manera prominente. Eventos semejantes *in vitro* no han sido descritos para otra especie de *Dioon* ni siquiera para *D. edule* (Chávez y Litz, 1999). Pérez y Vovides (1997) describieron el crecimiento de los cotiledones en semillas de *Dioon edule* y *D. merolae*, como el inicio de la germinación a 24 días después de la siembra en condiciones de suelo (Pérez *et al.*, 1999).

En algunos embriones la primera manifestación de germinación, a los 20 días de iniciados los cultivos fue el inicio del desarrollo de una radícula, que llegó a alcanzar hasta 1-2 cm longitud a los 4 meses, sin el posterior desarrollo de un brote (Figura 13 C). En otros dos embriones, a los 40 días de la siembra emergió una yema pubescente entre los cotiledones y un mes después, la primera hoja (pecíolo y un grupo de folíolos sin extenderse) habían alcanzado ca. 1.5 cm longitud. En estos embriones no se desarrolló una raíz; en su lugar se desarrolló callo amarillento, húmedo con áreas de aspecto mucilaginoso. Eventos

semejantes fueron descritos tanto para embriones cigóticos como somáticos por Chávez *et al.*, (1992) y Litz *et al.*, (1995) en cultivos de *Ceratozamia*. En *D. merolae* solo un embrión desarrolló tanto radícula como tallo con una hoja, obteniéndose una plántula que al cabo de 9 meses de iniciados los cultivos presentaron una hoja con un pecíolo de 4 cm longitud, sin que los folíolos se hubieran expandido (Figura 13 C).

La germinación ocurrió en 11 de los 24 tratamientos ensayados; en mayor medida con 2.32, 4.60, 9.30, 13.90 μM K y con 0, 0.45, 2.26 μM 2,4-D, no obstante, a concentraciones de K (2.32 μM) y de 2,4-D (0.45 y 2.26 μM) al igual que con 0.45 μM de 2,4-D el embrión tendió a dar una respuesta morfológica. Los embriones germinaron y también desarrollaron brotes a la vez (Tabla 10). La prueba de Chi-cuadrado (X^2) mostró que a $p < 0.05$ el valor teórico es 16.83 y el valor calculado es 2.7×10^{-2} por lo tanto no existieron diferencias significativas en los porcentajes de germinación.

Rinaldi y Leva (1995) reportaron que embriones de *Cycas revoluta* con longitud menor a 7 mm no presentaron germinación, la cual ocurrió y aumentó con la longitud hasta alcanzar 100% (1.7-19.4 mm), sin embargo no describieron los cambios morfológicos que aplicaron como criterio de germinación. Para *D. merolae* los embriones pudieron desarrollar un brote y no raíz y viceversa, así como plántulas completas con brote y raíz y estas respuestas fueron consideradas como germinación de los embriones.

6.3 Cultivos de megagametofitos.

Formación de callo. Los megagametofitos al momento de la siembra presentaron una coloración blanca; muy compactos e hidratados, a partir de las primeras dos semanas de cultivo en un amplio rango de combinaciones de reguladores de crecimiento (en altas y bajas concentraciones de auxina y citocinina), manifestaron un notorio crecimiento general, conservando su integridad. Al término del primer mes de cultivo sólo en algunos de ellos se observó una restringida formación de callo en la zona de corte, cercana a los arquegonios (Tabla 10, figura 14 A-C). Entre el segundo y tercer mes de cultivo, en la parte superior del megagametofito, emergió un tipo de callo friable, de color amarillento a hialino, en algunos casos con aspecto húmedo, de superficie sinuosa, algunas de estas estructuras adquirieron una evidente conformación nodular.

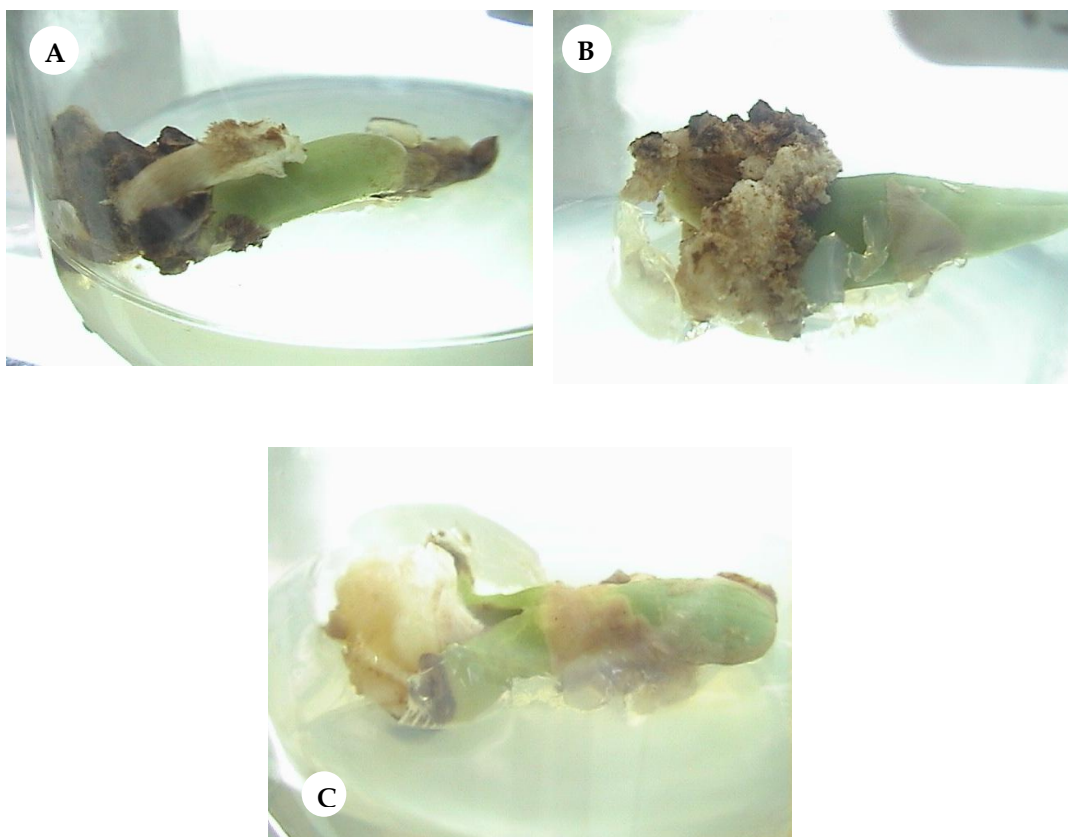


Figura 13. Germinación en medio Litz modificado con diferentes concentraciones de auxinas y citocininas. A, B y C. Proceso de germinación de *Dioon merolae* a los 15 días de siembra *in vitro*. A) Elongación e hidratación del embrión cigótico con el crecimiento de callo ($4.52 \mu\text{M}$ 2,4-D); B) Se observa la formación de callo en medio Litz con $4.52/4.60 \mu\text{M}$ 2,4-D/K; C) Formación de callo de forma compacta de color blanco-amarillento en medio Litz con $0.45/9.30 \mu\text{M}$ 2,4-D/K.

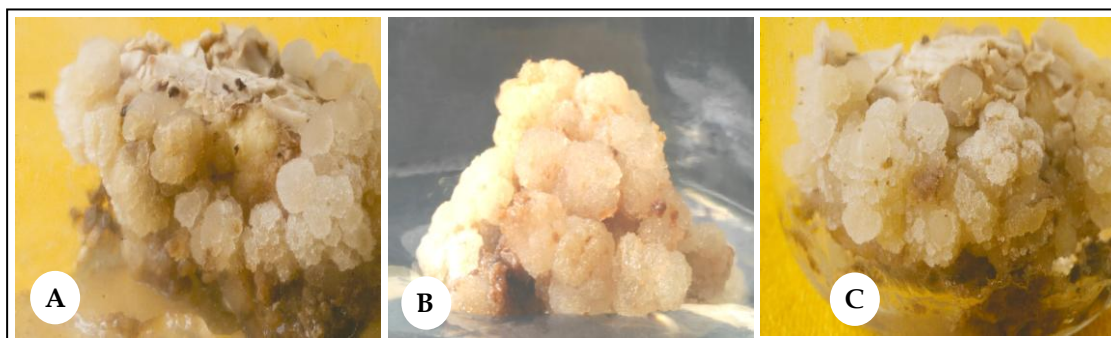


Figura 14. Formación de callo a partir de megagametofitos en medio Litz. A) Callo friable poco oxidado ($2.26/2.32 \mu\text{M}$ 2,4-D/K); B) megagametofito con cúmulos de masa callogénica ($4.52/9.3 \mu\text{M}$ 2,4-D/K); y C) callo hialino poco friable ($9.30 \mu\text{M}$ K).

Adicionalmente se observaron cúmulos de filamentos cristalinos semejantes a las masas de (embriones y suspensores) proembriones reportadas en *Ceratozamia* spp. y *Zamia* spp. (Chávez *et al.*, 1992a; b; Litz *et al.*, 1995), así como en los cultivos embriogénicos de otras gimnospermas, *Abies* (Schuller *et al.*, 1989), *Picea* (Hackman y von Arnold, 1985; Gupta y Durzan, 1986), *Pinus* (Becwar *et al.*, 1990). Al término de cuatro meses de iniciados los cultivos, se observó que en el control, se había formado callo, los tratamientos en que se obtuvo la mayor cantidad fueron con 0.45 μM 2,4-D + 9.30 μM K; y con 2.26 μM 2,4-D + 13.9 μM K (Tabla 11).

En estudios previos con *Zamia* (Chávez *et al.*, 1992b; Norstog and Rhamstine, 1967; Webb *et al.*, 1983), *Ceratozamia* (Chávez *et al.*, 1992a; De Luca *et al.*, 1979) y *Dioon edule* (Chávez and Litz, 1999) el inicio del callo ocurrió en un amplio rango de combinaciones de reguladores de crecimiento, pero no alcanzó a la totalidad de los tratamientos ni al control, aún después de 7 meses de cultivo.

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

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

Los tejidos somáticos solo habían resultado en la formación de callo hasta que Osborne y van Staden (1987) publicaron su investigación sobre la regeneración de brotes a partir de secciones de raíz de plántulas de la especie Sudafricana *Stangeria eriopus*. Henson (1980) menciona que a partir de hojas de *Zamia* sp. se formaron raíces.

6.4 Raíces coraloides.

A los tres meses de iniciados los cultivos, en el área cercana al corte, en solamente dos megagametofitos, se formaron nódulos, hidratados, café-amarillentos, que se encontraban en grupos compactos de (12-20) cada nódulo medía aproximadamente 1 mm (Figura 15 I-J). Al término de 8 meses de observación de estos cultivos, los nódulos no habían proliferado, sólo incrementaron ligeramente su altura y semejaron pequeños cilindros, compactos, de aspecto menos hidratado, de color café o amarillento en los cultivos que contenían una baja concentración de auxina y una alta concentración de la citocinina (4.52 μM 2,4-D y 13.90 μM K).

De Luca y Sabato (1980) en cultivos de megagametofitos de *Cycas revoluta*, describieron “crecimientos esféricos” análogos de nódulos de raíces coraloides, este proceso de organogénesis ocurrió en medio White, después de tres meses de cultivo en presencia de K con 2,4-D (1.13, 2.26 y 4.52 μM) ambas en la misma concentración.

En *D. merolae* el desarrollo ocurrió en medio Litz, más rico en sales y compuestos orgánicos y (tratamiento con 4.52 μM 2,4-D y 13.9 μM K) ambos estudios en presencia de K con 2,4-D. En cícadas, las raíces coraloides presentan una característica forma nodular a cilíndrica y están en simbiosis con cianobacterias.

En cultivos de megagametofitos de *Cycas revoluta* L. y *Macrozamia communis* L. Jonson, también fueron descritas estas estructuras como primordios de raíces coraloides (De Luca *et al.*, 1980; Osborne, 1990; Jones, 1993). En *D. merolae* se desarrollaron sin haberse detectado la presencia de microorganismos y que su desarrollo *in vitro* refleja que son estructuras propias del sistema radical de las cícadas (De Luca y Sabato, 1980).

Se ha observado que en el córtex de las raíces coraloides que presentan las cícadas contienen cianobacterias endosimbiontes (Algas verde-azules) las cuales pueden fijar N_2 , aunque las cianobacterias son fotosintéticas activas cuando se encuentran en su existencia libre (Lambers *et al.*, 1998). La capacidad de la simbiosis cícada-cianobacteria para fijar N_2 ha

sido conformado en un número limitado de investigaciones de campo y laboratorio. En pruebas realizadas en todas las especies de *Encephalartos* y una *Stangeria*, se comprobó que son capaces de fijar N₂ (Vessey *et al.*, 2004). El éxito en la relación simbiótica entre las cícadas y a las cianobacterias, probablemente se deba a la coevolución tan antigua entre los organismos (Vessey *et al.*, 2004).

Aún en la actualidad se desconoce la forma exacta en que ingresan las cianobacterias a las raíces de las cícadas, es posible que estas bacterias sean, oportunistas, capaces de entrar a una raíz por varias rutas, ya sea a través de heridas accidentales en las raíces, de las lenticelas en la epidermis o a través del córtex externo (Nortstog y Nicholls, 1997). También se ha encontrado la existencia de compuestos fenólicos en las células adyacentes en donde se encuentran las bacterias simbiotes en las raíces coraloides, los cuales se encuentran entre los metabolitos secundarios más distribuidos en las plantas (Lobakova, *et al.*, 2004)

Es importante señalar que las cianobacterias son fotosintéticas en fase de vida libre y están restringidas a la superficie del suelo, por lo que no es asombroso que la formación de raíces nodulares no ocurra en plántulas de *Zamia pumila* en cultivo estéril sometidas a oscuridad constante. En cambio, bajo intensidades reducidas de luz la formación es fuertemente estimulada, aunque la luz brillante inhibe la elongación de las raíces primarias y secundarias normales (Webb, 1981; 1982). Sin embargo, las raíces nodulares se forman aún sometidas en la oscuridad en plántulas de *Macrozamia* cultivadas, aunque su formación se acelera si se proporciona algo de luz (Nortstog y Nicholls, 1997).

6.5 Cultivos de embriones cigóticos.

El desarrollo de la radícula ocurrió en pocos casos (10%), y más frecuentemente fue sustituida por el crecimiento de callo. La germinación ocurrió en 11 de los 24 tratamientos ensayados, en mayor medida con K (4.60, 9.30, 13.90 μM) con 2,4-D (0, 0.45, 4.52 μM)

En los primeros 45 días de cultivo, los embriones dieron una respuesta morfogénica en 17 de los tratamientos ensayados (Tabla 11). Esto se vio influenciado por

altas concentraciones de 2,4-D y con altas concentraciones de kinetina (4.60, 9.30, 13.90 μM con 9.05 μM 2,4-D).

En los cultivos de embriones se observó el desarrollo de brotes adventicios en los tratamientos con medio Litz con 9.05 μM 2,4-D y 13.9 μM de K (Figura 16 A-D). Éstos se desarrollaron y se diferenciaron dando origen a los primeros folíolos después de 8 semanas de cultivo (Figura 16 E).



Figura 15. Raíces coraloides formadas *in vitro* y las obtenidas *in situ*. I) Raíces obtenidas *in vitro* en el área cercana a los arquegonios, a partir de megagametofitos de *Dioon merolae* en medio de inducción con 4.52 μM 2,4-D y 13.9 μM K, J) Raíces coraloides de *Macrozamia douglasii* obtenidas *in situ* (Jones, 1993).

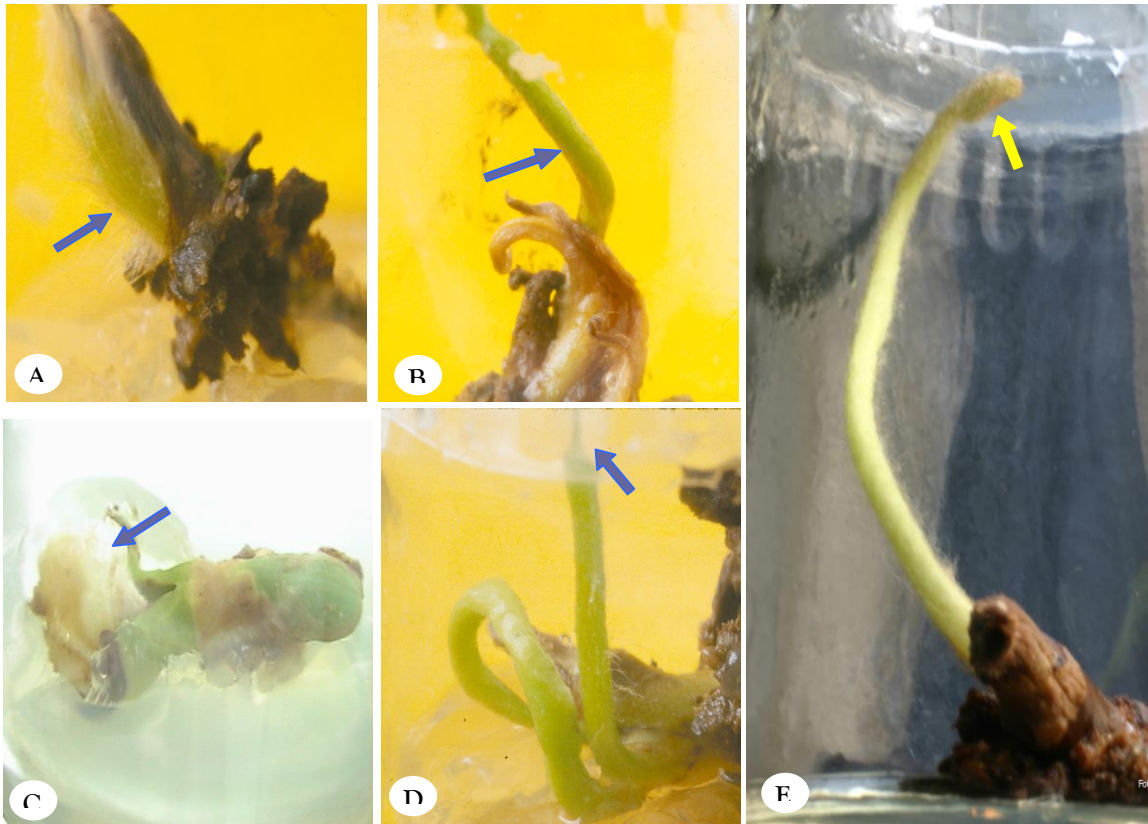


Figura 16. Respuestas morfogénicas de embriones cigóticos de *Dioon merolae* en medio Litz modificado con $9.05 \mu\text{M}$ 2,4-D y $13.9 \mu\text{M}$ de K. A) Embrión a partir de callo; B) Formación de un brote a partir de callo; C) Callo opaco, compacto a los 7 días de siembra; D) Desarrollo y emergencia de la radícula a los 15 días de siembra; E) Formación de los primeros folíolos en la parte superior.

Callo

Al cabo de dos meses de cultivo fue evidente el inicio de la formación de callo, el cual fue más frecuente con el tiempo, en el extremo radicular de los embriones, aunque también se generó en el ápice de los cotiledones. El callo fue friable en las zonas que no tenían contacto con el medio de cultivo, en tanto que fue más compacto en contacto con el medio. El callo se formó en embriones que germinaron o no. La formación de callo ocurrió más frecuentemente (en un 80%) a altas concentraciones de kinetina (4.60 , 9.30 , $13.90 \mu\text{M}$) con 2,4-D (0.45 , y $9.05 \mu\text{M}$). Fue notorio que no ocurrió ni la germinación ni crecimiento de callo en ausencia de reguladores de crecimiento.

En algunas regiones el callo fue nodular y llegó a diferenciarse en brácteas pubescentes de las cuales llegó a emerger una hoja, de manera semejante a como ocurrió a partir de callo generado de megagametofitos (Figura 16 C).

6.6 Cultivo de folíolos.

En el cultivo de los folíolos se observó una respuesta muy generalizada causada por la alta oxidación de los tejidos utilizados como explantes. El daño observado en los folíolos posterior al ser seccionados generó la liberación de muchos compuestos fenólicos causando una oxidación irreversible que fue letal para la mayoría de ellos (Figura 17 A-D).

Este fenómeno se debe a que los explantes se tornan cafés a negros poco después de haberlos sometidos a cortes, cuando esto ocurre se inhibe el crecimiento y el tejido generalmente se muere (George y Sherrington, 1984).

El proceso de oxidación puede prevenirse por diversas formas una de ellas es con la utilización de soluciones antioxidantes (como por ejemplo ácido cítrico y ácido ascórbico) que actúan reduciendo la actividad de la polifenol oxidasa, enzima que tiene una actividad mayor a un pH de 6.5 y se reduce a medida que el pH baja (George y Sherrington, 1984). Por lo que sumergiendo los explantes en una mezcla de ácido ascórbico y ácido cítrico no solo se expone a los explante a agentes reductores sino que también baja el pH (Ichihashi y Kako, 1977, citado por George y Sherrington, 1984). Esto se ha reportado como un método efectivo para disminuir el ennegrecimiento de los tejidos o explantes en los cultivos, así como también a menudo se asume que previene la oxidación de los fenoles.

Es importante mencionar que el estado de madurez del explante juega un papel muy importante ya que está relacionado con la respuesta fisiológica obtenida, asimismo se ha reportado que los tejidos jóvenes tienen una mayor capacidad regenerativa en comparación con los presentes en un explante de un individuo adulto (Vyskot y Jára, 1984). Son muy escasos los estudios realizados con cultivos *in vitro* utilizando folíolos como explantes, Henson (1980) (Tabla 5) utilizaron secciones de folíolos juveniles de 3 cm de longitud maduros y de distintas especies, en el que obtuvieron solo la formación de callo que requirió mucho tiempo para crecer. Osborne (1988) cita sobre el trabajo realizado de que no se formó callo a

partir de hojas maduras de *Zamia pumila* completamente expandidas. Otros reportes realizados con secciones de pecíolo, folíolos, base de hojas, con 5 especies de *Encephalartos*, incubados en oscuridad y en medio SH, solo se obtuvo la formación de callo que posteriormente se necrosó (Osborne, 1988).

Chávez *et al.* (1992b) reportó que a partir de folíolos jóvenes de plantas adultas de *Ceratozamia mexicana*, la respuesta morfogénica se ve favorecida, para la formación de embriones somáticos y que secciones apicales más inmaduros de los folíolos respondieron en la formación de callo pero a medida que las secciones del explante fueron más pequeñas estas se oxidaron y no respondieron.

Para el caso de otras especies de gimnospermas se ha observado que se han utilizado diversas estructuras como explantes como hojas inmaduras en *Musa*, *Euphoria longan* (longan) y *Santalum album* (sándalo) (Lakshimi Sita, 1986). Otros explantes ensayados son la núcela, que se han probado en *Citrus* spp., mango, níspero (Carron y Enjalric, 1985, citados por Litz y Jaiswal, 1991).

6.7 Organogénesis.

A partir de nódulos en callo de megagametofitos se diferenciaron sólo dos brotes (3 y 6 meses) los cuales inicialmente estuvieron conformados de dos brácteas pubescentes (0.5 cm), de color pajizo o amarillo claro. Solamente en uno de estos brotes emergió entre las brácteas un pecíolo (3 cm, 7 meses) en cuyo ápice se observó un grupo de folíolos, los cuales permanecieron sin extenderse al término de un año después de iniciados los cultivos. Esta respuesta se reportó a partir de brotes de megagametofitos de *Zamia fischeri* y *Z. pumila* que pudieron llegar o no, a extender sus folíolos (Chávez *et al.*, 1992b).

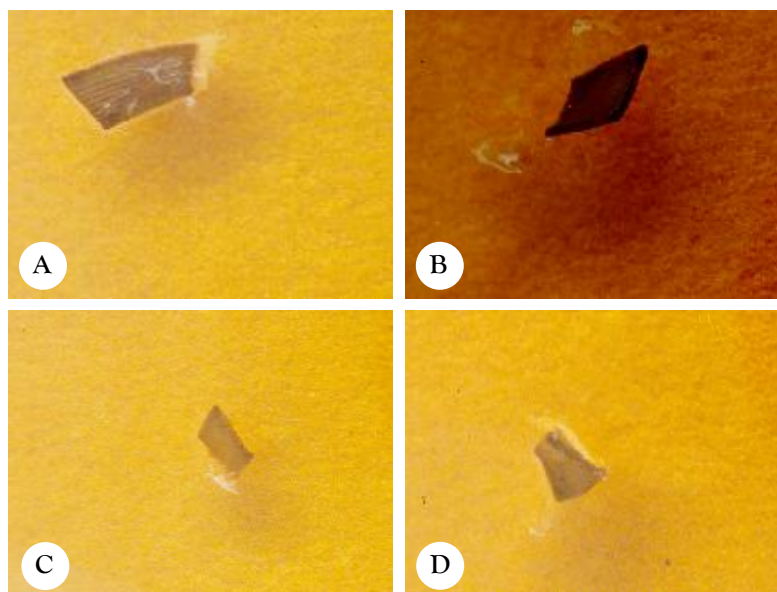


Figura 17. Cultivo de folíolos jóvenes de *D. merolae*, en medio de inducción. A) Folíolo oxidado a los 8 días de cultivo; B) Tejido muerto a los 30 días de cultivo; C y D) Folíolos oxidados en el tratamiento control.

Para *D. merolae* la formación de brotes sólo ocurrió en los tratamientos $9.05 \mu\text{M}$ 2,4-D con 4.60 y $9.30 \mu\text{M}$ K (Tabla 10), a diferencia del cultivo de megagametofitos de *D. edule* en los que se formaron con solo 2,4-D ($2.26 \mu\text{M}$), como también se reportó para *Ceratozamia hildae*, *C. mexicana* (Chávez *et al.*, 1992a) y *Zamia fischeri* (Chávez *et al.*, 1992b).

La inducción de brotes adventicios a partir de cultivos de embriones cigóticos ocurrió vía directa en los tratamientos $4.52 \mu\text{M}$ 2,4-D + $9.30 \mu\text{M}$ K y también con solo 2,4-D, en tanto que por vía indirecta fue con 4.60 , 9.30 y $13.90 \mu\text{M}$ K en presencia de $9.05 \mu\text{M}$ 2,4-D (Tabla 11). Estos valores de 2,4-D con K concuerdan con el rango de concentraciones reportado por Chávez y Litz (1999) para promover el desarrollo de brotes en cultivos de *D. edule* (9.29 - $13.94 \mu\text{M}$ K con 0.45 - $9.05 \mu\text{M}$ 2,4-D). Bajo las condiciones ensayadas, los embriones cigóticos de *D. merolae* resultaron más morfogenéticos que los megagametofitos, no obstante, los brotes adventicios no generaron raíces aún cuando fueron subcultivados a medio basal. La organogénesis directa ocurrió en 5 diferentes formulaciones de medio de crecimiento, generalmente en un intervalo de altas concentraciones de 2,4-D (4.52 y 9.05

μM) con kinetina (4.60, 9.30 y 13.9 μM) estos datos coinciden con los reportados por Chávez *et al.* (1999) para *Dioon edule* (Tabla 11).

Tabla 10. Morfogénesis *in vitro* a partir de megagametofitos de *Dioon merolae* a 45 días de cultivo.

| 2,4-D (μM) | Kinetina (μM) | | | | |
|----------------------------|----------------------------|------|---------|---------|-------|
| | 0 | 2.32 | 4.60 | 9.30 | 13.90 |
| 0 | ~ | ~ | ~ | ~ | ~ |
| 0.45 | ~ | 80C | 80C | 85C | ~ |
| 2.26 | ~ | 80C | ~ | 70C | 85C |
| 4.52 | ~ | ~ | 80C | 80C | 80C |
| 9.05 | ~ | 75C | 80C (1) | 80C (1) | 80C |

C: porcentaje de explantes que formaron callo. (#) Número de callos que formaron brotes.

~: sin respuesta.

10 repeticiones por tratamiento.

Tabla 11. Morfogénesis *in vitro* a partir de embriones cigóticos de *Dioon merolae* a 45 días de cultivo

| 2,4-D (μM) | Kinetina (μM) | | | | |
|----------------------------|----------------------------|------|---------|---------|---------|
| | 0 | 2.32 | 4.60 | 9.30 | 13.90 |
| 0 | ~ | ~ | 70G | 75G | 80C |
| 0.45 | 50G | ~ | 75G | 75G | 75G |
| 2.26 | ~ | 75G | 80C | ~ | 80C |
| 4.52 | 50G | ~ | 75G | 75G (1) | ~ |
| 9.05 | 50G (2) | ~ | 80C (2) | 80C (2) | 80C (2) |

C: porcentaje de embriones que formaron callo. G: porcentaje de embriones que germinaron (#) Número de callos que formaron brotes.

~: sin respuesta.

10 repeticiones por tratamiento.

6.8 Embriogénesis somática.

En el callo generado de un embrión cigótico en etapa precotiledonaria se observó un filamento delgado (menos de 1 mm) y largo (1-1.5 cm) de color blanco amarillento opaco y parecido a un suspensor, como lo descrito en general para gimnospermas, tanto en embriones cigóticos y somáticos de distintas especies de cícadas, *Ceratozamia* y *Zamia* (Chávez *et al.*, 1992a, b, c, 1998, Litz *et al.*, 1995b); y de coníferas, como lo citado por Hakman y von Arnold (1985) que cultivaron embriones cigóticos inmaduros de *Picea abies*, y obtuvieron numerosos embriones somáticos con largos suspensores.

Gupta y Durzan (1986) lograron cultivos embriogénicos a partir de embriones maduros de *Pinus lambertiana*, en particular de células del suspensor, el cultivo era mucilaginoso claro y rodeaba a un callo blanco que contenía embriones somáticos en distintos estados de desarrollo con largos suspensores (saliendo del callo) que en morfología se asemejaban a los estados tempranos del desarrollo de los embriones cigóticos. Además, encontraron numerosas células embrionarias con largos suspensores presentes en la matriz mucilaginosa, observaciones semejantes se describieron en cultivos embriogénicos de *C. mexicana* (Gupta y Durzan, 1986).

Para *D. merolae*, en repetidas ocasiones en que se realizó la fragmentación y subcultivo de callo se observó el aspecto acuoso, mucilaginoso, incoloro, transparente y finamente granular del interior de los cultivos semejantes a los embriogénicos, con la presencia de grandes células vacuoladas alargadas, lo que permite suponer que éstas de aspecto parenquimáticas podrían ser células iniciales de los embriones somáticos como se mencionan también para coníferas Durzan y Durzan (1991), Von Aderkas y Bonga (1988) y Litz *et al.* (1995).

El probable embrión somático generado en los cultivos de *D. merolae* permaneció sin cambio, no obstante que había sido subcultivado a medio sin reguladores de crecimiento 6 meses antes. Chávez *et al.* (1995) reportaron que en los cultivos de folíolos de *C. mexicana*, el desarrollo de los primeros embriones somáticos fue detenido y los embriones no formaron cotiledones y por más de un año no formaron ni un brote ni raíces en medio sin reguladores, cada embrión somático medía aproximadamente 1.0 cm y 1-1.5 mm de espesor.

En cultivos de *Ceratozamia* se obtuvo embriogénesis somática a partir de callos obtenidos de folíolos inmaduros de plantas adultas, dichos embriones somáticos germinaron se desarrollaron en medio semisólido, sin reguladores de crecimiento, con 0.5% de carbón activado y baja intensidad de luz ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 16 h de fotoperíodo (Chávez y Rubluo, 1995; Chávez *et al.*, 1998).

Estos resultados son importantes ya que los estudios sobre morfogénesis experimental en cícadas han demostrado que la regeneración ocurre vía organogénesis o embriogénesis somática. Aunque las características morfológicas pueden bastar para reconocer la naturaleza de las estructuras regeneradas éstas llegan a ser limitadas para el reconocimiento pleno, como ocurrió en el estudio de De Luca *et al.*, (1979) en el cual las estructuras regeneradas fueron identificadas erróneamente como embriones somáticos. Un análisis histológico revelaría la identidad de tales estructuras así como las semejanzas y diferencias respecto al mismo proceso morfogénético en otras gimnospermas, como lo hecho por Chávez (1993) donde se identificaron las estructuras en cada etapa de desarrollo de embriones somáticos de *C. mexicana*.

Las cícadas son recalcitrantes en términos de regeneración *in vitro*, pero a la vez revelan que con base en la experimentación el potencial morfogénético ha podido ser expresado (mayoritariamente) en explantes ovulares, vía organogénesis y de embriogénesis somática. A partir de tejidos somáticos de plántulas existe sólo un reporte de organogénesis (Osborne y van Staden, 1987), en tanto que de tejidos de planta adultas, no existía publicación hasta 1993, cuando se demostró que a partir de folíolos inmaduros de plantas adultas respondieron a la embriogénesis somática (Chávez, 1993).

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

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

Dioon merolae De Luca, Sabato & Vázquez-Torres es una especie en peligro de extinción a la que el cultivo de tejidos podría ayudar a su conservación y a obtener un mayor conocimiento de la misma. La capacidad morfogénica demostrada a partir de megagametofitos y embriones cigóticos, aunado a la regeneración de brotes a partir de raíces de plántulas de *Stangeria eriopus*, son avances que impulsan a explorar la posibilidad de promover el potencial regenerativo *in vitro* de estructuras somáticas de plantas maduras.

El medio de cultivo que se utilizó en todos los experimentos es un medio propuesto por Litz (Litz *et al.*, 1995), se ha utilizado para el cultivo de folíolos de *Ceratozamia mexicana*. Este medio de cultivo reúne muchos de los componentes que demuestran jugar un papel importante en morfogénesis de las cícadas (Chávez *et. al.*, 2007).

El medio Litz es muy rico en fuentes de nitrógeno como ha sido recomendado no sólo para inducir a embriogénesis somática sino también para cultivar embriones. De los aminoácidos empleados en el medio de cultivo se encuentra la glutamina y asparagina que son los más efectivos para estimular el crecimiento *in vitro* del embrión. Es por ello que la utilización de la glutamina sobre el crecimiento de embriones inmaduros de cebada fue reconocida desde Brown y seguida de Norstog (1961) y Norstog y Smith (1963 citados por Hu y Wang, 1986). Exceptuando las investigaciones de LaRue (1948) y Webb *et al.*, 1983 en todos los cultivos embriogénicos de cícadas se ha incluido la glutamina.

Otro factor muy importante a considerar en el medio de cultivo es el papel que juegan los fitorreguladores u hormonas de crecimiento, en el presente trabajo se usó la auxina 2,4-D (auxina sintética) juega un papel importante en la inducción de respuestas morfogénicas como la embriogénesis somática, sobre todo cuando se usa sola o en combinación con una citocinina, (BA, 2iP, o K).

En esta investigación se usaron la auxina 2,4-D y la citocinina K. La morfogénesis observada (brotes y callo) se ha observado también en trabajos realizados con *Pinus lambertiana* (Gupta y Durzan, 1986), quienes encontraron la inducción a poliembriogénesis somática y formación de callo en un medio con 2,4-D, cuando se incluyó una concentración de 0.1 mg/L de BA favoreció su desarrollo.

6.9 Análisis histológico.

A los 50 días de iniciados los cultivos, los megagametofitos presentaron cierta desdiferenciación, estaban compuestos principalmente de células de aspecto semiesféricas, isodiamétricas con denso citoplasma, pequeñas vacuolas y núcleos prominentes; células en división fueron observables, así como células sin contenido celular (Figura 18 A). La formación de células parenquimatosas de novo inmersas entre las células de callo, como se observa en la figura 18 B en donde las células están agrupadas, dispuestas en una forma helicoidal y bien delimitada.

En los cortes histológicos los cultivos de callos de megagametofitos fueron uniformes y compuestos de células de aspecto meristemático: pequeñas esféricas, con denso citoplasma y notorios núcleos; células en división fueron observables, en menor número se encontraron células alargadas, en la figura 18 A y B no fue posible identificar una diferenciación morfogénica (Dickison, 2000). En la figura 18 C y D, posterior a los 3 meses de cultivo, el tejido presentó etapas de desarrollo con algunas regiones en diferenciación en donde se observaron células colapsadas en la periferia del callo y centros meristemáticos inmersos en él.

Estos resultados muestran que las células pudieron estar colapsadas por el estrés hídrico que se presentó durante su cultivo *in vitro*, esta respuesta estuvo dirigida hacia la Organogénesis indirecta, al encontrar elementos de conducción dentro del tejido calloso, los cuales son importantes en la formación de tallo (Dickison, 2000). Iniciándose en el interior de estos centros el desarrollo y formación de haces vasculares así como algunos elementos celulares como traqueidas. En algunas secciones de callo se observan colapsadas en pequeñas secciones, dispersos en el callo grupos celulares dispuestos en forma concéntrica

conformando conductos en el centro. Estos resultados muestran el desarrollo inicial de la formación de estructuras diferenciadas (Figura 18 E y F) (Ross *et al.*, 1973; Asbell, 1977).

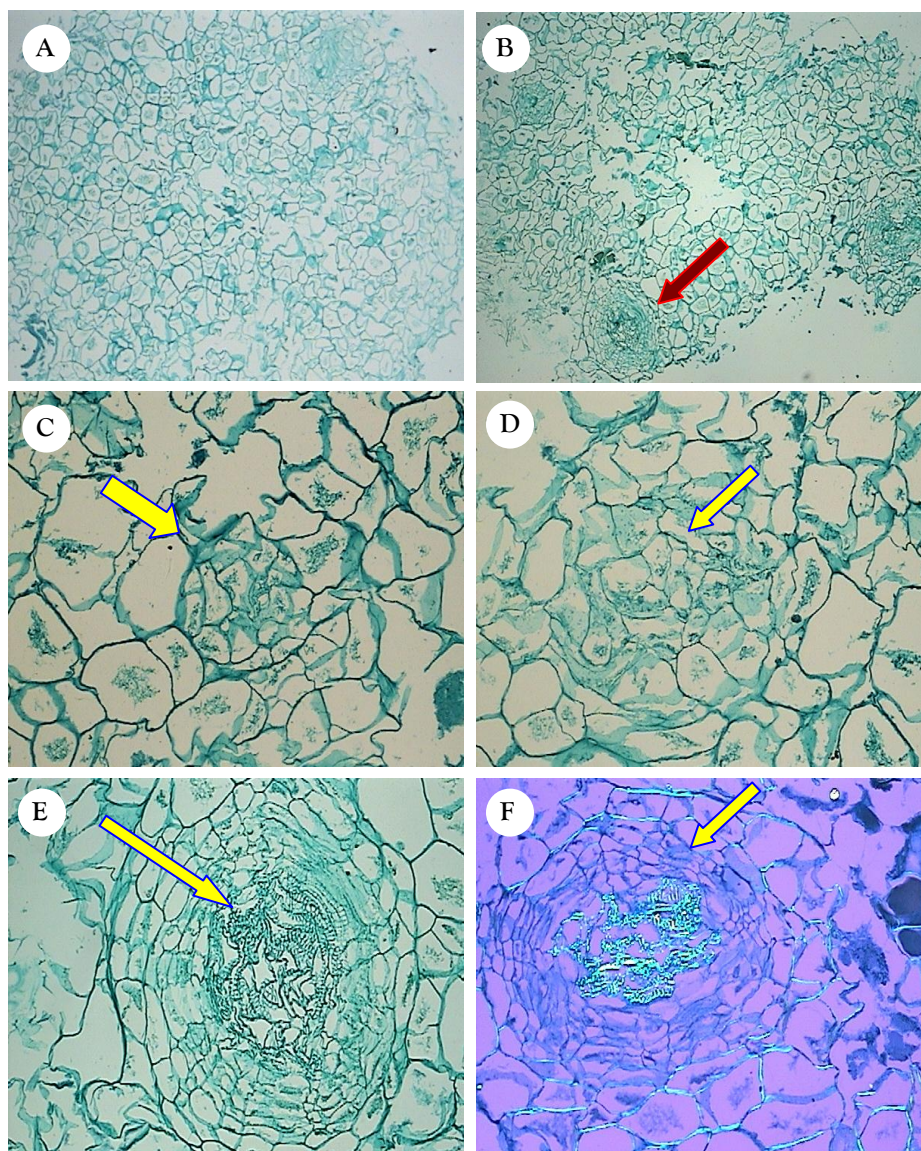


Figura 18. Secciones de callo obtenidas a partir de cultivos *in vitro* de megagametofitos a los 50 días de cultivo en medio Litz, en diferentes etapas de desarrollo. A. Sección transversal de callo (15 días de cultivo), células parenquimáticas con distribución aleatoria X100 B. Sección transversal de callo con algunas regiones en diferenciación, se observa tejido parenquimático X100. C. Centro de diferenciación X20 c.c., iniciando el proceso de desarrollo de haces vasculares D. Centro de diferenciación X20 c.c., iniciando el proceso

de desarrollo de haces vasculares etapa más avanzada. E y F. Centro de diferenciación, muestra los haces vasculares en desarrollo dispuestos en una forma helicoidal y con elementos traqueales con poca refringencia a lignina X20 c.c. (E) y c.f. (F).

Células con aspecto de traqueidas, estructura que recuerda la conformación interna de raíces. Estos resultados son semejantes a lo descrito por Webb (1984) en callos de *Dioon edule* que dieron origen a regiones meristemáticas.

En el caso de los cultivos *in vitro* de los tejidos de embriones cigóticos, se realizó el corte longitudinal de un brote en una etapa temprana de desarrollo, el cual presentó un meristemo con dos primordios de brácteas pubescentes, una de las cuales con una mayor longitud que la otra, lo que hace evidente un desarrollo asincrónico. La base de toda esta estructura estuvo formada de células parenquimáticas, más bien cuadrangulares y de mayor tamaño en relación a las del meristemo; células parenquimáticas y de mayor longitud conformaron las brácteas (Figura 19 A-B).

Fue posible distinguir células con una disposición hacia la periferia evidenciando la formación del meristemo apical de brote (Figura 19 A-B). También se observaron células que mostraron una formación diferente que son alargadas asimétricas dispuestas a lo largo del primordio, desorganizadas de diámetros diferentes que pueden llegar a dar origen a células de conducto vascular. Algunos autores mencionan que la diferenciación cotiledonar de los cultivos proembriogénicos son asincrónicos y puede no estar mediada por alteraciones de las condiciones de estrés en los cultivos (Osborne, 2004).

Estos resultados concuerdan con reportes en la inducción de organogénesis en *Nicotiana tabacum*, en medio MS adicionado con 10 μM de K (Thorpe y Murashige, 1970). En este trabajo se muestra que el proceso no fue asincrónico, pero a los 8 días de cultivo, la división celular en el tejido organogénico produjo visibles zonas de alta actividad mitótica (Joy Iv y Thorpe, 1995). Estas regiones produjeron centros meristemáticos o meristemoides conteniendo células densamente plasmáticas a los 8-14 días de cultivo (Thorpe y Murashige, 1970; Ross *et al.*, 1973; Maeda y Thorpe, 1979).

Estas células son microvacuoladas, contienen una alta acumulación de Taninos (Figura 19 C-D), y el núcleo contiene mucho material nuclear (Ross *et al.*, 1973; Asbell, 1977). Se encontró que los meristemas son inicialmente apolares pero rápidamente muestran dirección y actividad divisoria para formar un primordio unipolar (Thorpe, 1980). El

primordio emergió de la base del callo a los doce días de cultivo (Ross *et al.*, 1973; Thorpe, 1979).

El ápice de una raíz fue seccionado, en el cual se observa el meristemo con células pequeñas de núcleo prominente y por encima de ellas hubo un cambio en la morfología de las células, observándose una cofia, formada de células aplanadas en una capa apretada, las cuales conformaron un estrato más laxo en la punta de la raíz (Figura 19 E-F).

Las observaciones morfológicas de una estructura alargada semejante a un filamento, blanquecino, alargado en su extremo libre hicieron suponer que se trataba de un embrión somático derivado de un embrión cigótico.

Las observaciones morfológicas de una estructura alargada semejante a un filamento, blanquecino, más abultado en uno de sus extremos de un embrión cigótico, evidenciaron la formación de un embrión somático. Las secciones histológicas de este explante a los 7 meses de cultivo en medio sin hormonas pusieron en evidencia el desarrollo de una estructura con las características descritas para los embriones somáticos de otras especies de cícadas (Chávez *et al.*, 1992c), en donde el suspensor alargado tiene a cierta distancia del extremo libre se observó que las células eran isodiamétricas con una formación hacia el centro con la formación de la cofia (Figura 19 F), esta morfogénesis son características típicas de ser un meristemo apical de raíz (Chávez *et al.*, 1992a; 1995), por el otro extremo se observó la formación del meristemo apical de brote (Figura 19 B). Por estas características presentes, se determinó en que se formó un embrión somático.

Otros compuestos que fueron posibles observar en los cortes realizados en los cultivos de callo de megagametofitos fueron taninos, que en algunas células se evidencian por el engrosamiento de las paredes celulares y una coloración café (Figura 19 C-D).

Con la técnica de polarización fue posible identificar estos compuestos de coloración morada-lila (Figura 19 D). Otras de las estructuras celulares que se observaron dentro del meristemo apical fueron las traqueidas que con la polarización se observaron los haces vasculares enrollados en una disposición helicoidal en forma alargada sobrelapados y diferenciados de las células que se encontraron en la periferia (Figura 19 G-H). Estos resultados concuerdan con reportes en la inducción de organogénesis en *Nicotiana tabacum*,

en medio MS adicionado con 10 μM de K (Thorpe y Murashige, 1970). En este trabajo se muestra que el proceso no fue asincrónico.

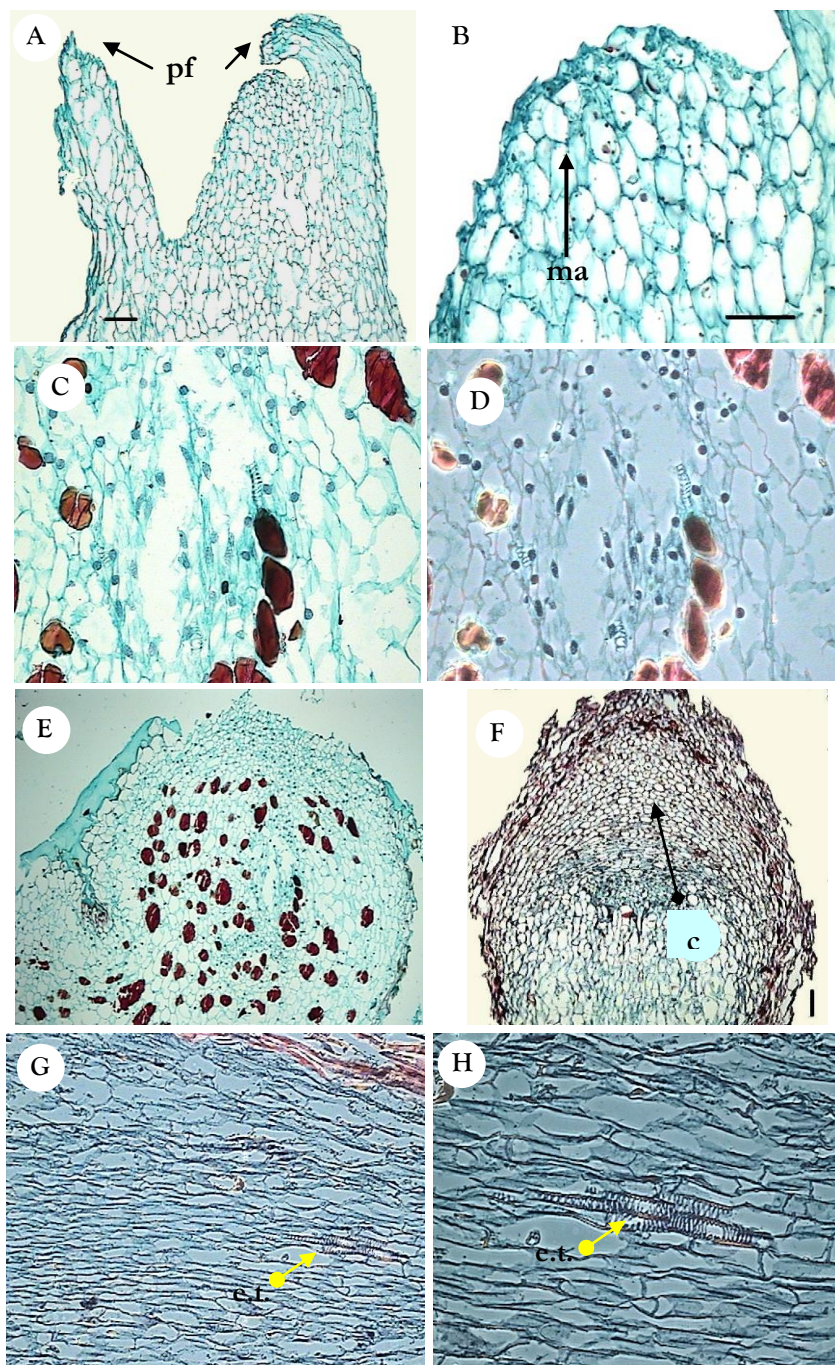


Figura 19. Secciones morfológicas a los 50 días de cultivo. A. Primordios foliares asincrónicos (pf) formado de callo de embrión (7 meses a partir de la siembra, *bar* = 100 μ m). B. Meristemo apical de brote (ma) (*bar* = 50 μ m). C. Callo de megagametofitos con taninos de color café 40x c.c.; D. Haces vasculares con taninos 40x c.f. E. Sección transversal raíz coraloides tejido parenquimático y componentes celulares X100. F. Sección longitudinal de un suspensor obtenido de embrión cigótico con el meristemo radicular y la formación de la cofia (c) (*bar* = 100 μ m). G y H. Elementos traqueales (e.t.) con engrosamientos helicoidales en el meristemo apical de raíz 20x (G) y 40x en c.f. (H).

Fue posible observar en algunas zonas el resultado de la formación de amiloplastos (Figura 20 A-C) que fueron evidenciados por la técnica de polarización que permitió mostrar las “cruces de malta” que son características típicas de estos compuestos, (Figura 20 D-E). Otros compuestos observables en los cortes realizados fueron taninos en la pared celular y células madre del estoma (Figura 20 E-F).

La falta de estudios histológicos sobre los regenerantes *in vitro* de cícadas fue en parte compensada por las descripciones de material *in vivo* de embriones cigóticos, realizados por Chamberlain (1912, 1957) quien señaló que la primera diferenciación se manifiesta como una elongación de las células que formarán al suspensor.

En términos generales, las características observables en los cultivos *in vitro* de *D. merolae* a partir de callo de megagametofito y de embriones cigóticos representan que las respuestas morfogénicas como el desarrollo de brotes y raíces, al igual que la germinación y la formación de callo. Es posible determinar con los estudios histológicos y morfológicos el desarrollo de un estado de dediferenciación a un estado de rediferenciación de los cultivos. Con ello se muestra que es posible lograr la micropropagación de esta especie mediante morfogénesis indirecta.

Los procedimientos *in vitro* pueden ser una importante alternativa de conservación genética y contribuir así a la propagación de especies en peligro de extinción.

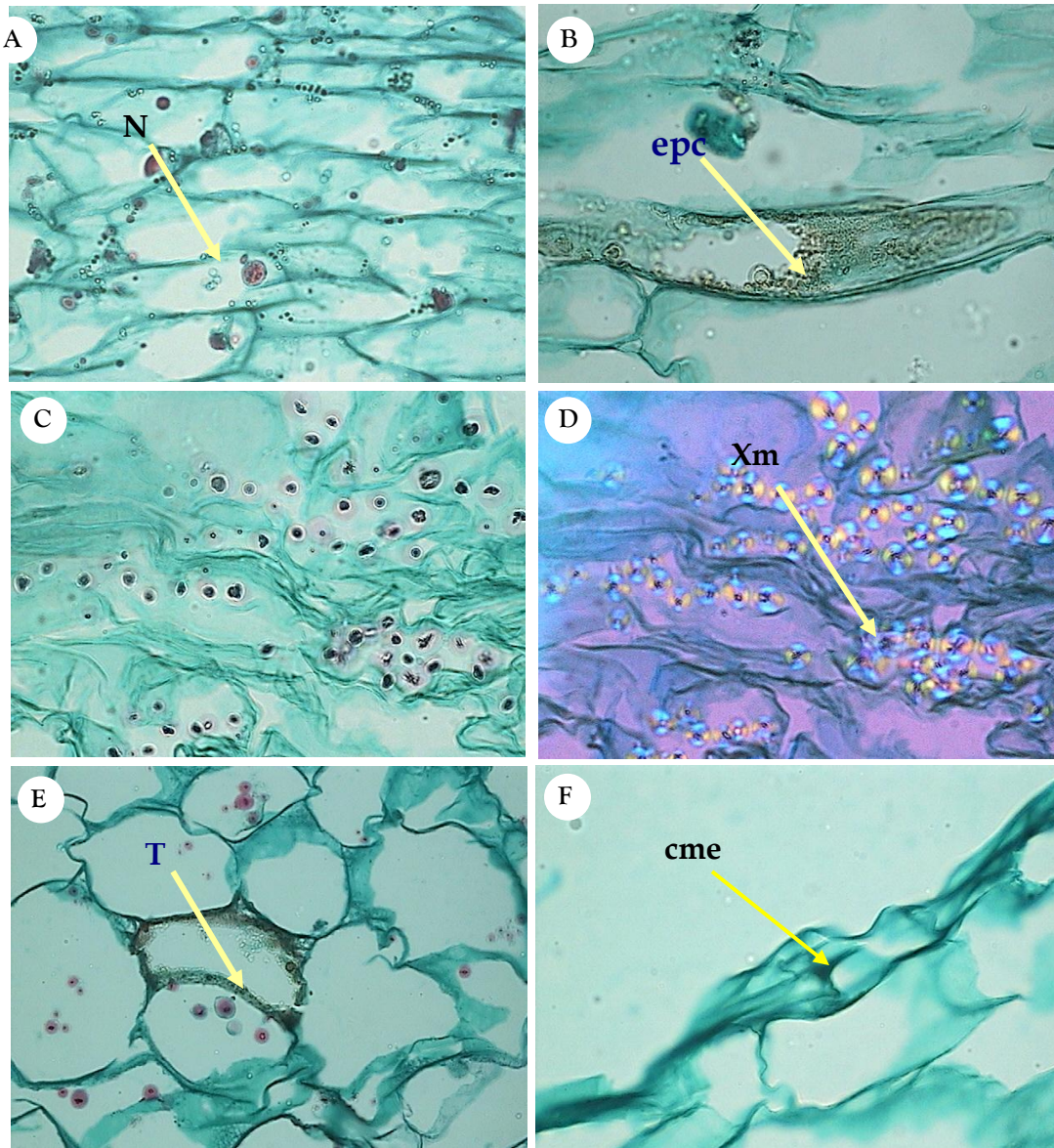


Figura 20. Secciones de diferentes tejidos de megagametofitos con algunos contenidos celulares. A) Sección de tejido de embrión cigótico del meristemo apical con núcleos (N) evidentes 100x c.c.; B) Células de conducto con engrosamiento de la pared celular (epc) y contenidos celulares 100x c.c.; C y D) Observaciones de amiloplastos con la evidente formación de las cruces de malta (Xm) que resaltan por la polarización 100x (c-c.c. y d-pol); E) Taninos observables en la pared celular 40x c.c.; F) Células madre del estoma (cme) 100x c.c.

7. Conclusiones.

- ✿ Se logró la desinfección y el establecimiento de cultivos asépticos de explantes de megagametofitos, embriones cigóticos y folíolos; para estos últimos se recomienda hacer cortes en un medio con antioxidantes.
- ✿ Se obtuvo germinación de embriones cigóticos a las dos semanas de cultivo en contraste con las condiciones naturales donde se reporta que ocurre a los 24 días de la siembra. La mejor respuesta se alcanzó en concentraciones de K ($2.32 \mu\text{M}$) y de 2,4-D (0.45 y $2.26 \mu\text{M}$) al igual que con $0.45 \mu\text{M}$ de 2,4-D.
- ✿ No se observó ninguna respuesta morfogénica en los cultivos de explantes de folíolos, aún cuando se implementaron diversos métodos para su inducción. La alta oxidación de los tejidos al ser seccionados generó la liberación de muchos compuestos fenólicos causando una oxidación irreversible que fue letal para ellos.
- ✿ Se obtuvo una respuesta a la formación de callo de megagametofitos, siendo el mejor tratamiento con $0.45 \mu\text{M}$ 2,4-D + $9.30 \mu\text{M}$ K; y con $2.26 \mu\text{M}$ 2,4-D + $13.9 \mu\text{M}$ K; se concluye que las hormonas no son prescindibles para la inducción de callo pero sí para una mayor proliferación.
- ✿ Se indujo la formación de raíces coraloides únicamente a partir de cultivos *in vitro* de megagametofitos en medio Litz adicionado con $4.52 \mu\text{M}$ 2,4-D y $13.9 \mu\text{M}$ K.
- ✿ La formación de callo en cultivos de embriones cigóticos, ocurrió más frecuentemente a altas concentraciones de kinetina (4.60 , 9.30 , $13.90 \mu\text{M}$) con 2,4-D (0.45 , y $9.05 \mu\text{M}$). Fue notorio que no ocurrió ni la germinación ni crecimiento de callo en ausencia de reguladores de crecimiento.
- ✿ Se logró inducir la organogénesis directa en embriones cigóticos donde se observó la formación de brotes adventicios. La mejor respuesta se dio en 4.60 , 9.30 , $13.90 \mu\text{M}$ y

con 9.05 μM 2,4-D; ésta se ve favorecida cuando se utilizan altas concentraciones de 2,4-D y kinetina.

- ✿ Se logró inducir embriogénesis somática a partir de un embrión cigótico; esta conclusión se sustenta con observaciones morfológicas e histológicas de una estructura filamentosa con características semejantes a las descritas para otras especies de cicadas con embriogénesis somática. Éste es el primer estudio a nivel global sobre embriogénesis somática que se reporta en todo el género *Dioon*.
- ✿ Se demostró que los tejidos haploides (megagametofitos) y diploides (embriones cigóticos) de *D. merolae* tienen el potencial morfogénico para regenerar callo, brotes y raíces.
- ✿ Los estudios histológicos en la morfogénesis de regenerantes *in vitro* de cicadas han sido fundamentales para poder definir los procesos realizados. Este proyecto es el cuarto en donde se analizan histológicamente cultivos *in vitro* de cicadas y es el primero para el género *Dioon*.
- ✿ En el presente estudio surgieron nuevas interrogantes por responder como por ejemplo: ¿Es posible lograr la formación de raíces coraloides a través de cianobacterias simbiotes y que éstas logren mantener su capacidad para fijar N_2 , en cultivos *in vitro*? ¿Es posible inducir embriogénesis somática a partir de otros nuevos explantes? ¿Mantienen las plantas regeneradas a través de esta vía estabilidad genética o presentan variaciones?.
- ✿ Para futuras investigaciones entre los problemas más inmediatos por resolver quedan, evitar la oxidación de los tejidos; poder sostener el desarrollo y llegar a adaptar plántulas a condiciones de invernadero.
- ✿ Los resultados con *D. merolae* tienden a incentivar nuevas investigaciones y a demostrar la plasticidad de sus tejidos para lograr regenerantes que permitan obtener conocimientos de este grupo de plantas tan antiguas y valiosas como son las cicadas y así proporcionar una alternativa para su propagación.

8. Literatura citada.

- Aguilar, C., E. Martínez y L. Arriaga. 2000. Deforestación y fragmentación de ecosistemas: ¿Qué tan grave es el problema en México? CONABIO. *Biodiversitas* 30:7-11.
- Ammirato, P. V. 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter IAPTC No. 57:2-16.
- Asbell, C. W. 1977. Ultrastructural modifications during shoot formation *in vitro*. *In vitro* 13:180.
- Attree, S. M., T. E. Tautorus, D. I. Dunstan y L. C. Fowke. 1990. Somatic Embryo Maturation, Germination and Soil establishment of Plants of Black and White Spruce (*Picea mariana* y *Picea glauca*). *Can. Jour. Bot.* 68:2583-2589.
- Attree, S. M., y L. C. Fowke. 1991. Micropropagation through Somatic Embryogenesis in Conifers. 53-70. En: Y.P.S. BAJAJ (eds). 1991. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 17 High-Tech and Micropropagation. Springer-Verlag, Berlin.
- Ball, E. A. 1981. A Tissue Culture Multiplication of *Sequoia*. En: J.M. Bonga, D.J. Durzan (Eds.) 1987. *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 3 Dordrecht, Martinets Nijhoff.
- Ball, E. A., D. M. Morris y J.A. Rydelius. 1978. Cloning of *Sequoia sempervirens* from Mature Trees through Tissue Culture. 181-226. En: *In vitro* Multiplication of Woody Species, Gembloux; Centre de Recherches Agronomiques de Etat.
- Becerra, M. E. Nombres geográficos indígenas de Chiapas. 3a. (eds). INI, México. 1985:211, 219.
- Becwar, M. R., Nagmani, R., y S. R. Wann. 1990. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. For. Res.* 20:810-817.

- Bell, E. A. 1993. From *Lathyrus* to *Cycas*: a search for dietary neurotoxins. Pp. 16-18 in: Proceedings of Cycad 90, The 2nd International Conference on Cycad Biology. Stevenson, D. W. & K. J. Norstog (eds). Palm & Cycad Societies of Australia, Milton.
- Beltrán, J. y L. Torres-Hernández. 1995. Herbivoría de *Eumaeus debora* Hubner (Lycaenidae) sobre *Ceratozamia mexicana* Brong. En un bosque Mesófilo de montaña. La Ciencia y el Hombre. Univ. Veracruzana. 19:87-93.
- Bergersen, F. J., G. S. Kennedy y W. Wittmann. 1965. Nitrogen Fixation in the coralloid roots of *Macrozamia communis* L. Johnson. Aust. J. Biol. Sci. 18:1135-1142.
- Bhatnagar, S. P. y A. Moitra. 1996. Gymnosperms. New Age International (P) Limited, Publishers. New Dehli, India. 470p.
- Bolivar, Z. F. 2007. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. (eds). Academia Mexicana de Ciencias: Instituto de Biotecnología de la UNAM, CONACYT. 2da edición. 718p.
- Bonga, J. M. 1981. Organogenesis *in vitro* of Tissues from Mature Conifers. *In vitro* 17:511-518.
- Bonga, J. M. 1982. Shoot formation in Callus from the Stalks of Young Female Strobili of *Larix deciduas*. *Can Jour. Bot.* 60: 1357-1359.
- Bonga, J. y P. von Aderkas. 1992. *In vitro* culture tree. Forestry Sciencies. Vol. 38 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 236 p.
- Bonga, J.M., 1987 Clonar propagation of mature trees, problems and possible solutions. 249-271. En: J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.) *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol. 1. Kluwer Acad. Pub. Dordrecht.
- Bonta, M. 2003. Teocinte "Eaof God". *The Cycad Newsletter* 26:7-12.
- Bourgkard, F. y J. M. Favre. 1988. Somatic embryos from callus of *Sequoia sempervirens*. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*. 24:1-7.
- Breedlove, D. E. 1981. Introduction to the flora of Chiapas. First edition. California Academy of Sciences. USA. 33 p.

- Broome, T. 2000. Cultivation of *Dioon mejiae*. *The Cycad Newsletter* 26:6.
- Challenger, A. 1998. Utilización y Conservación de los Ecosistemas terrestres de México. Pasado, Presente y Futuro. 1ª. Edición. Agrupación Sierra Madre. UNAM. México, 847 p.
- Chamberlain, C. J. 1912. Morphology of *Ceratozamia*. *Bot. Gaz.* 53:1-19.
- Chamberlain, C. J. 1919. *The Living Cycads*. Hafner, NewYork.
- Chamberlain, C. J. *Gymnosperms, structure and function*. University of Chicago Press. Chicago. 1957.
- Chávez, V. M. Embriogénesis somática a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia mexicana var Robusta* (Miq) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Ph. D. thesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México city. 1993.
- Chávez, V. M. y A. I. Rubluo. 1995. El cultivo de tejidos vegetales en la conservación. In: Linares, E. P. Dávila, F. Chiang, R. Bye y T. Elias (eds). *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques*. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 123-131pp.
- Chávez, V. M. y A. P. Vovides. 1993. "Regeneración *in vitro* de tres especies de *Zamia*". *Amaranto* 6(4): 12-17.
- Chávez, V. M. y R. E. Litz. Organogenesis from megagametophyte and zygotic embryo explants of the gymnosperm *Dioon edule* Lindley (Zamiaceae, Cycadales). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 58:219-222; 1999.
- Chávez, V. M., R. E. Litz y K. Norstog. 1992a. *In vitro* morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 30:93-98.
- Chávez, V. M., R. E. Litz y K. Norstog. 1992c. Somatic embryogenesis from leaf callus of mature plants of the gymnosperm *Ceratozamia mexicana var. robusta* (Miq) Dyer Cycadales. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 28P:59-63.

- Chávez, V. M., R. E. Litz, K. Norstog y J. Marquez. 1995. Histology of somatic embryogenesis of the cycad *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer. *Plant Sci.* 108:191-200.
- Chávez, V. M., R. E. Litz, M. Monroy, P. A. Moon, y A. M. Vovides. Regeneration of *Ceratozamia eurypyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature-phase trees. *Plan Cell Rep.* 17:612-616; 1998.
- Chávez, V. M., S. Cabrera, P. A. Moon y R. Litz. 2007. Recovery of difficult-to-generate species: the cycad example. *Acta Hort.* 738:51-61.
- Chávez, V. M.; R. E. Litz, K. Norstog. 1992b. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 30:99-105.
- Chemnick, J., T. Gregory, J. Timothy y Salas-Morales. 1997. A revision of *Dioon tomasellii* (Zamaceae) from western Mexico, a range extension of *Dioon merolae*, and clarification of *Dioon purpusii*. *Phytogya*. Vol. 83 (1): 1-6.
- CITES, 2003. URL: <http://www.cites.org>
- Comisión Europea. 2006. *Hacia una futura política marítima de la Unión: perspectiva europea de los océanos y mares*. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas. ISBN 92 79 01821 3.
- Convenio sobre la diversidad biológica. 1992. Documento sobre la diversidad biológica. Río de Janeiro. p.3.
- Crane P. 1988. "Major clades and relationships in higher gymnosperms" In: Beck (ed.) *Origin and evolution of gymnosperms*. Columbia Univ. Pres. N. V. Pp 218-277.
- Curtis, J. 1986. *Microtecnia vegetal*. (eds). Trillas. México, 106 pp.
- De Luca, P.; Moretti, A.; Sabato, S. 1979. Regeneration in megagametophytes of cycads. *Giorn. Bot. Ital.* 113:129-143.
- De Luca, P.; Sabato, S. 1980. Regeneration of coralloid roots on cycad megagametophytes. *Plant Sci. Lett.* 18:27-31.

- De Luca, P.; Sabato, S. y V. M. Vázquez Torres. 1981. *D. merolae* (Zamiaceae) a new species from México. *Brittonia* 33(2):179-185.
- De Luca, P.; Sabato, S.; Balduzzi, A.; Nazzaro, R. 1980. Coralloid root regeneration on *Macrozamia* megagametophytes. *Giorn. Bot. Ital.* 114:271-275.
- Dehgan, B. y B. Schutzman. 1983. Effect of H₂SO₄ and GA₃ on seed germination of *Zamia furfuracea*. *HortScience* 18:371-372.
- Diario Oficial de la Federación 6 de marzo del 2002. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies. Segunda Sección, SEMARNAT.
- Dickison, W. C. 2000. Integrative Plant Anatomy. Harcourt Academic Press. U. S. A. 517p.
- Dodds, J. H. y Roberts, L. W. 1982. Experiments in plant tissue culture. New York (USA): Cambridge University Press. 50p.
- Donaldson, J. S. 1995. Understanding cycad life histories: an essential basis for successful conservation. In: Donaldson, J.S. (eds). *Cycad Conservation in South Africa: Issues, priorities and Actions*. Cycad Society of South Africa, Stellenbosch, South Africa.
- Donaldson, J. S. 2003. (eds). *Cycads: Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN/ SSC Cycad Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Donaldson, J. S., B. Dehgan, A.P. Vovides y W. Tang. 2003. Cycads in trade and sustainable use of cycad populations. In: Donaldson, J. (eds). *Cycads: Status Survey and Conservation Action Plan*. Pp.39-47. IUCN. Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Duncan, M. W. 1993. Cycads as a possible cause of neurological disorders in the Western Pacific. Pp. 19-23 in: *Proceedings of Cycad 90, the 2nd International Conference on Cycad Biology*. Stevenson, D. W. & K. J. Norstog (Eds.). Palm & Cycad Societies of Australia, Milton.

- Duncan, M. W., J. C. Steele, I. J. Kopin y S. P. Markey. 1990. Amino-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam. *Neurology* 40: 767-772.
- Durzan, D. J. y P. E. Durzan. Future Technologies: Model-reference control systems for the scale-up of embryogenesis and polyembryogenesis in cell suspension cultures. En: P. C. Debergh and R. H. Zimmerman, eds. *Micropropagation, Technology and Application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991:389-423.
- Eckenwalder, J. E. 1980a. Cycads: The prime of their Lives. *Bull. Fairchild Trop. Garden*. 35:11-19.
- Eckenwalder, J. E. 1980b. Dispersal of the West Indian cycad *Zamia pumila*. *Biotropica* 12 (1):79-80.
- Ehrlich, P. R. y E. O. Wilson. 1991. Biodiversity studies: Science and Policy. *Science* 253:758-762.
- Escalant, J. y Teissont, J. 1989. Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Reports*. 7:665-668.
- Escobar, H. A., V. M. Villalobos, y A. Villegas. 1986. *Opuntia* micropropagation by axilar proliferation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 7:269-277.
- Flores, V. O. y P. Gerez. 1988. Conservación en México: Síntesis sobre vertebrados terrestres, vegetación y Uso de suelo. Edit. Instituto Nacional de investigaciones sobre Recursos Bioticos-Conservación Internacional, México. Pp. 289-302.
- Frazzetto, G. 2003. White biotechnology» *EMBO reports* 4 (9): 835-837.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, y K. Ojima. 1968. Plant cell cultures. I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158.
- Gautheret, R. J. 1966. Factors affecting differentiation of plant tissues grown *in vitro*. En: W. Beerman (eds). *Cell differentiation and morphogenesis*. North Holland Publishing Co. Amsterdam. 55-71p.

- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. (Part 1). Segunda edición. Edit. Exegetics Limited, London.
- George, E. F. y P. D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Limited, England. 709 pp.
- Giddy, C. 1974. Cycads of South Africa. Purnell. Cape Town, South Africa. 122p.
- Gómez, K. R. 1998. Embriogénesis somática. En: Pérez, P. (eds). Propagación y mejora de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 57-59p.
- Gómez-Pompa, A. 1997. Biodiversity and agriculture: friends or foes? In: Robert A. Rice, Ashley M. Harris and Jennifer McLean (eds). Proceedings of First Sustainable Coffee Congress. Smithsonian Migratory Bird Center. Smithsonian Institution
- Gómez-Pompa, A., A. P., Vovides, N. Ogata, R. Castro-Cortés, J. A. González G. y A. Corona L. 2000. Cycadas: fósiles vivientes en peligro de extinción CD-ROM. Conabio. University of California, Riverside. USA.
- González, M. F. 1998. Historia evolutiva de la vegetación de México. CIENCIAS. Octubre-Diciembre 90pp.
- Gray, D. J. 1997. Synthetic seed for clonal production of crop plants. In: R. B. Taylorson (eds). Recent Advances in the Developmental and Germination of Seeds. 29-45p.
- Grove, T. S., A. M. O'Connell y N. Malajczuc. 1980. Effects of fire on the growth, nutrient content and rate of nitrogen fixation of the cycad *Macrozamia riedlei*. Australian Journal of Botany 28:271-281.
- Guo, F. L., D. Ting-Xiu, Z. Lin y Si-Yuan. 1993. Root nodules and nitrogen fixation in *Cycas panzhihuaensis*. Proc. Cycads 90, 2nd International Conference on Cycad Biology. Stevenson, D.W. & K. J. Norstog (eds). Pcsa, Milton Australia:165-168.
- Gupta, P. K. y D. J. 1986. Durzan. Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. *Bio/Technology* 4:643-645.

- Hakman, I., L. C. Fowke, S. von Arnold y T. Ericksson. 1985. The development of Somatic Embryos in Tissues Cultures Initiated from Immature Embryos of *Picea abies* (Norway Spruce). *Plant Sci.* 38:53-59.
- Hakman, I., y S. Von Arnold. 1985. Plant regeneration Through Somatic Embryogenesis in *Picea abies* (Norway Spruce). *J. Plant Physiol.* 128:149-158.
- Hakman, I., y S. Von Arnold. 1988. Somatic Embryogenesis and Plant regeneration from suspension Cultures of *Picea glauca* (White Spruce). *Plant Cell Rep.* 6:20-22.
- Halliday, J y J. S. Pate. 1976. Symbiotic nitrogen fixation by coralloid roots of the cycad *Macrozamia riedlei*: Physiological characteristic and ecological significance. *Aust. J. Plant Physiol.* 3:349-358.
- Hartmann, H. I. y D. F. Kester. 1990. Propagación de Plantas. Principios y prácticas. Edit. Continental S. A., 3ra edición. México D. F. 145-274.
- Henson, N. 1980. The Formation of Organized Elements and Callus from Cycads in Culture Kew. Int. Rpt. RoyalBot. Gardens, Kew, Surrey, England.
- Hernández, Y. A. 1996. El Triunfo ¿otro sitio de patrimonio mundial de Chiapas? Ala del Sur No. 2. Dir. R. Chanona, Chis., Méx., Pp 12-14. En: Hernández Jonápa, R. 2000. Estructura Poblacional de *Zamia soconoscensis* (Zamiaceae) en un bosque Mésófilo de montaña en la Reserva de la Biosfera del Triunfo, Chiapas, México. Tesis de licenciatura. Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México. Pp 65
- INE-SEMARNAP. 2000. Prep. 6: Protección, conservación y recuperación de la familia Zamiaceae (Cycadales) de México. México D. F., Instituto Nacional de Ecología.
- Jager, A. K. y J. van Staden. 1996a. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Encephalartos dyerianus* y *Encephalartos natalensis*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 45:99-102.
- Jager, A. K. y J. van Staden. 1996b. Somatic embryogenesis in *Encephalartos cycadifolius*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 15:437-440.
- Jain, S. M., R. J. Newton y E. J. Solters. 1988. Enhancement of Somatic Embryogenesis in Norway Spruce (*Picea abies* L.). *Theor. Appl. Genet.* 76:501-506.

- Johansen, D. 1940. Plant microtechnique. Edit McGraw-Hill. U.S.A. 523 pp.
- Jones, D. L. 1993. *Cycads of the world*. Reed, Chatswood, New South Wales, Australia. 312pp.
- Joy Iv, R. W. y T. A. Thorpe. 1995. Shoot Morphogenesis: Structure, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. In: Thorpe, T. A. (eds) *In vitro* embryogenesis in plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 171-214.
- Kartha, K. 1982. Meristem culture and cryopreservation: methods and applications. En: Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. T. A. Thorpe (eds) New York: Academic Press. 181-211.
- Lambers, H., F. S. Chapin y T. L. Pons. 1998. Plant physiological ecology. Springer-Verlag, New York, N.Y, USA. 540 p.
- LaRue, C. D. 1948. Regeneration in the megagametophyte of *Zamia floridana*. *Bull Torrey Bot. Club* 75:597-603.
- LaRue, C. D. 1954. Studies on Growth and Regeneration in Gametophytes and Sporophytes of Gymnosperms. Brookhaven Nat. Lab. Symp. 6:187-208.
- Lawrence, G. H. 1951. Taxonomy of vascular plants. Macmillan Publishing Co. Inc. New York.
- Lázaro, Z. J. Dinámica poblacional de *Dioon merolae* De Luca, Sabato y Vázquez-Torres (Zamiaceae) en dos sitios de la Depresión Central de Chiapas, México. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. México. 2002.
- Lillo, J. C., E. Provencio, F. R. Ruiz de Velasco, L. L. Domínguez, M. Vásquez Torres, A. P. Vovides, M. A. Portilla, C. G. Delfin, M. A. Pérez, L. T. Hernández, J. C. Guevera, B. G. Brizuela, D. V. Selem y H. B. López. 2000. *Protección Conservación y Recuperación de la Familia Zamiaceae (Cycadales) de México*. Semarnap, México.
- Litz, R. E. y Jaiswal, V. S. 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. Micropropagation. Technology and Application. Kluwer Ac. Publ. 247-263

- Litz, R. E., P. A. Moon, V. M. Chavez. 1995b. Somatic embryogenesis from leaf callus derived from mature trees of the cycad *Ceratozamia hildae* (Gymnospermae). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 40:25-31.
- Litz, R. E., P. A. Moon, V. M. Chavez. Somatic embryogenesis in the Cycadales. In: Jain, S. M.; Gupta, P. K.; Newton, R. J., (eds). Somatic embryogenesis in woody plants, vol. 3. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1995a:1-15.
- Lobakova, E. S., G. A. Dubravina, y N. V. Zagoskina. 2004. Formation of phenolic compounds in apogeotropic roots of cycads plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 51:486-493.
- Maeda, E. y T. A. Thorpe. 1979. Shoot histogenesis in tobacco callus cultures. *In vitro* 15:415-424.
- Manguen, A. y R. Montesinos. 1991. Los Chiapanecas, guerreros de la historia pobladores de Suchiapa. (eds) Gobierno del Estado de Chiapas, México. 1:115-116
- McKersie, B. D. y D. C. Brown. 1996. Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. *Seed Science Research* 6:109-126.
- Miranda F. 1998. La vegetación de Chiapas. 2ª. Edición CONACULTA-Gobierno del Estado de Chiapas, México. 596p.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15:473-497.
- Nagmani, R. y J. M. Bonga. 1985. Embryogenesis in Subcultured callus of *Larix decidua*. *Can. J. For. Res.* 15:1088-1091.
- Norstog, K. 1965. Induction of apogamy in megagametophytes of *Zamia integrifolia*. *Amer. Jour. Bot.* 52:995-999.
- Norstog, K. 1987. Cycads and the origin of insect pollination. *Amer. Scient.* 74:270-279.
- Norstog, K. J. y P. K. Fawcett. 1989. Insect-cycad symbiosis and its relation to the pollination of *Zamia furfuracea* (Zamiaceae) by *Rhopalotria mollis* (Curculionidae) *Amer. J. Bot.* 76: 1380-1394.

- Norstog, K. J. y T. J. Nicholls. 1997. The biology of cycads. Comstock Publish Associates. Cornell University Press, Ithaca, N.Y. USA. 363 p.
- Norstog, K. y E. Rhamstine. 1967. Isolation and culture of haploid and diploid *Cycad* tissue. *Phytomorphology* 17:374-381.
- Osborne, R. 1988. An Investigation into *in vitro* culture and phytochemical aspects of some members of the order cycadales. Ph D. Thesis, Department of Botany, Faculty of Science, University of Natal, Pietermaritzburg, 274 pp.
- Osborne, R. 1990. Micropropagation in Cycads. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. March 57:82-88.
- Osborne, R. 1995. The world cycad census and a proposed revision of the threatened species status for cycad taxa. *Biological Conservation* 71:1-12.
- Osborne, R. 2004. Cycad classification: concepts and recommendations (eds) T. Walters, Montgomery Botanical Center, Miami, Florida, USA. 304 p.
- Osborne, R. y J. van Staden. 1987. *In vitro* Regeneration of *Stangeria eriopus*. *HortScience*. 22:1326.
- Osborne, R., Stevenson, D.W. and Hill, K.D. 1999. The world list of cycads. *Proceedings of the 4th International Conference on Cycad Biology*, Panzhihua, China, 1996.
- Palacios, E. y T. G. Cabrera. 1997. La flora de las areniscas en el oeste de Chiapas y una propuesta de conservación. *Revista UNACH* Octubre-Diciembre 1997. México. 8 pp.
- Parrot, W. 1993. Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión, INIBAP. San José, Costa Rica. *Proceedings*. Montpellier, Francia. 183-191.
- Pérez, F. M. A. 1994. Estudio sobre germinación en semillas de espadaña *Dioon merolae* De Luca, P. S. Sabato & Vázquez Torres (Zamiaceae). Tesis de Licenciatura. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 98p.
- Pérez, F. M. y A. P. Vovides y C. Tejeda. 1995. Las Cycadas de la Sierra Madre de Chiapas, México. Resumen del XII Congreso Mexicano de Botánica. Cuernavaca, Morelos, México.

- Pérez, F. M. y A. P. Vovides. 1997. Manual para el cultivo y propagación de cicadas. Instituto Nacional de Ecología, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Instituto de Historia Natural e Instituto de Ecología. 1-33p.
- Pérez, F. M. y G. J. Rodríguez. 1992. The espadaña *Dioon merolae* (Zamiaceae) during the Santa Cruz festivity in Suchiapa, Chiapas. *III International Congress of Ethnobiology: Mexico city*. 1-134.
- Pérez, F. M., Vovides A. P. y M. J. 1999. Alvarez. A study on seed germination of the cycad, *Dioon merolae* (Zamiaceae). *The New Plantsman* 214-218.
- Pérez, P. N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Editorial Instituto de Biotecnología de las Plantas, Sta. Clara, Cuba. Vol. 1:14,57.
- Porter, E. D. y H. J. Teas. 1971. Comparative radiometric effect of emulsin, cycasin, methylazoxymethanol and X-rays in *Zamia integrifolia*. *Radiation Botany* 11: 21-26.
- Raimondo, D. y J. S. Donaldson. 2003. Responses of cycads with different life histories to the impact of plant collecting: simulation models to determine the important life history stages and population recovery times. *Biological Conservation* 111:345-358.
- Reinert, J. 1958. Morphogenese und ihre kontrolle an gewebwkulturen aus carotten. *Naturwissenschaft*. 45:344-345.
- Rinaldi, L. M. y R. A. Vera. 1995. *In vitro* organogenesis from diploid tissues of cycas resoluta Thun. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 43:37-41.
- Roca, W. M. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Edit. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Bogotá, Colombia.
- Rohr, R., P. von Aderkas, y J. M. Bonga. 1989. Ultrastructural changes in Haploid Embryoids of *Larix deciduas* during Early Embryogenesis. *Amer. J. Bot.* 76:1460-1467.
- Ross, M. K., T. A., Thorpe y J. W. Costerton. 1973. Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. *Amer. J. Bot.* 60:788-795.
- Sabato, S. y P. De Luca. 1985. Evolutionary trends in *Dioon* (Zamiaceae). *Amer. Jour Bot* 72:1353-1363.

- Sandoval, Z. E. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos IBUNAM 38. Instituto de Biología, UNAM. 278p.
- Sannasgala, K. 1989. *In vitro* somatic embryogenesis in *Musa*. Ph D. Thesis. Leuven. Bélgica. Katholieke Universiteit Leuven. 172p.
- Schuller, A., G. Reuther y T. Geier. 1989. Somatic embriogénesis from seed explants of *Abies alba*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 17:53-58.
- Semarnat. 2005. URL: <http://www.semarnat.gob.mx/especies/cycadas>
- Sharp, W. R., M. R. Sondahl, L. S. Caldas y S. B. Maraffa. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embriogénesis. In: Janick J. (eds) Horticultural Reviews Purdue University, Avi Publishing Co. Westport. Vol. 2:268-310.
- Siniscalco, Gigliano, G. 1990. Chemotaxonomic significance of MAM glycosides and mucilages in cycads. Pp. 123-131 in: D. W. Stevenson (eds). The Biology, Structure
- Smith, D. W. 1966. Mutagenicity of cycasin aglycone (Methy-lazoxymethanol), a naturally occurring carcinigen. *Science* 152: 1273-1274.
- Stevenson, D. W., R. Osborne y J. Hendricks. 1990. A world list of cycads. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 57:200-206.
- Stevenson, D. W., R. Osborne y K. D. Hill. 1995. The world list of cycads. In: Vorster, P. (eds), *Proceedings of the 3rd International Conference on Cycad Biology*. Cycad Society of South Africa, Stellenbosch, South Africa.
- Stevenson, D. W., Vovides, A. y J. Chemnick. 2003. Regional Overview, New World. In: Donaldson, J.S. (eds), *Cycads: Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN/ SSC Cycad Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Stevenson, D.W. 1992. A formal classification of the extant cycads. *Brittonia* 44: 220-223.
- Stevenson, D.W. y Osborne, R. 1993. The world list of cycads. In: Stevenson, D.W. and Norstog, K.J. (eds), *Proceedings of the 2nd International Conference on Cycad Biology*. Palm and Cycad Societies of Australia, Milton, Queensland, Australia.

- Tang, W. 1987. Insect pollination in the cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae). *Amer. J. Bot.* 74: 90-99.
- Tang, W. 1989. Seed dispersal in the cycad *Zamia pumila* in Florida. *Canadian Journal of Botany* 67: 2066-2070
- Thorpe, T. A. 1979. Regulation of Organogenesis *in vitro*: In: Hughes, K. W. *et al.*, Edit. Propagation of Higher Plant Through Tissue Culture. A Bridge Between Research and Application. *US Tech. Inf. Serv.* Pp. 87-101.
- Thorpe, T. A. 1980. Organogenesis *in vitro*: Structural, physiological and biochemical aspects. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11:71-111.
- Thorpe, T. A. y T. Murashige. 1970. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus culture. *Can. J. Bot.* 48:277-285.
- Thorpe, T. A., I. S. Harry y P. P. Kumar. 1991. Application of Micropropagation to forestry. 311-336. En: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds). *Micropropagation. Technology and application.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Tisserat, B., E. Esan y T. Murashige. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1:1-78.
- Toledo, V. M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo.* Año XIV No. 81:17-30.
- Tremblay, L. y F. M. Tremblay. 1991. Carbohydrate requirements for the Development of black Spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and Red Spruce (*P. rubens* Sarg.) Somatic Embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 27: 95-113.
- Vázquez, T. M. 1990. Algunos datos etnobotánicos de las cícadas en México. *Memoirs of the New Cork Botanical Garden* 57:144-147.
- Velázquez, A. M. 1988. Especies y hábitats en peligro de extinción. *Información Científica y Tecnológica.* 10(147):45-49.
- Vessey, J. K., K. Pawlowski y B. Bergman. 2004. Root-based N₂-fixing symbioses: legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant and Soil* 266:205-230.

- Villalobos, V. M. 1990. Organogénesis. Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. (105): 29-32. Roma. FAO.
- Vogel, J. C., H. Van Der-Merwe y Grobbelaar, N. 1995. The use of radiocarbon for determining the growth rate of arborescent cycads. In: Vorster, P. (eds) Proceedings of the third international conference on cycad biology. Cycad Society of South Africa, Stellenbosch, South Africa.
- Von Aderkas, P. y J. M. Bonga. 1988. Formation of haploids of *Larix deciduas* early embryogenesis. *Am. J. Bot.* 75:690-700.
- Vovides A. P. 1992. Polinización y producción de semillas de cicadáceas y su germinación. Boletín Amaranto. Año 5. No 1:13-16.
- Vovides, A. P, C. Iglesias, M.A. Pérez-Farrera, M. Vázquez Torres y U. Schippmann. 1999. Peasant nurseries: a concept for an integrated conservation strategy for cycads in Mexico. Darwin Technical Manual for Botanic Gardens. BGCI, London (In press).
- Vovides, A. P. 1981. Lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción. *Biótica* 6:219-228
- Vovides, A. P. 1985. Systematic studies on the Mexican Zamiaceae II. Additional notes on *Ceratozamia kuesleriana* from Tamaulipas, Mexico. *Brittonia* 37: 226-231.
- Vovides, A. P. 1988. Relación de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción. En: Flores-Villela O. y Geréz. Conservación en México: Síntesis sobre vertebrados terrestres, vegetación y uso del suelo. INIREB, Apéndice F: 289-302.
- Vovides, A. P. 1990. Spatial distribution, survival and fecundity of *Dioon edule* (Zamiaceae) in a tropical deciduous forest in Veracruz, Mexico, with notes on its habitat. *American Journal of Botany* 77: 1532-1543.
- Vovides, A. P. 2000. México: Segundo lugar mundial en diversidad de cícadas. *Biodiversitas* Año 6, núm. 31.
- Vovides, A. P. y C. G. Iglesias. 1994a. *Dioon edule* Lindl.: conservación y aprovechamiento. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 2:55-59.

- Vovides, A. P. y C. G. Iglesias. 1994b. An integrated conservation strategy for the cycad *Dioon edule* Lindl. *Biodiversity and Conservation* 3: 137-141.
- Vovides, A. P. y C. M. Peter. 1987. *Dioon edule*: la planta más antigua de México. *Ciencia y Desarrollo*. CONACyT 73: 19-24.
- Vovides, A. P., M. Vázquez-Torres, B. Schutzman y C. G. Iglesias. 1993. A new species of *Ceratozamia* (Zamiaceae) from Querétaro and Hidalgo, Mexico. *Novon* 3: 502-506.
- Vovides, A. P., Rees, J. D. & Vázquez-Torres, M. 1983. Zamiaceae. Pp. 1-31 in: Gómez-Pompa, A. (eds.), *Flora de Veracruz*. Fascículo 26. INIREB, Xalapa.
- Vyskot, B. y Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *J. Hortic. Sci.* 59:449-452.
- Walter, T. y R. Osborne. 2004. *Cycad Classification: Concepts and Recommendations*. CAB International, UK.
- Walter, T., R. Osborne y D. Decker. 2004. We hold these truths. In: Walters, T. y R. Osborne (eds) *Cycad classification: concepts and recommendations*. 1-11. CABI Publishing. Cambridge, M. A., USA.
- Webb, D. T. 1981. Effects of light on root growth, nodulation and apogeotropism of *Zamia pumila* L. seedlings in sterile culture. *American Journal of Botany* 69:298-305.
- Webb, D. T. 1982. Effects of light quality on root elongation and nodulation of *Zamia floridana* DC. Seedlings on sterile culture. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 104:253-258.
- Webb, D. T. 1984. Developmental anatomy and histochemistry of light-induced callus formation by *Dioon edule* (Zamiaceae) seedling roots *in vitro*. *Am. J. Bot.* 71(1):65-68.
- Webb, D. T. y R. Osborne. 1988. *In vitro* Regeneration of Cycads. 591-613. En: Y.P.S. BAJAJ (eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2. Trees*. Springer-Verlag, Berlin.
- Webb, D. T., E. S. Rivera y J. Matos. 1983. Callus initiation and organized development from *Zamia pumila* embryo explants. *Ann. Bot.* 51:711-717.
- White, P. R. 1943. *A Handbook of Plant Tissue Culture*. New York 265p.

- Whitelock, L. M. 2002. The Cycads. Timber Press, Oregon, USA.
- Whiting, M. J. 1963. Toxicity of cycads. *Economic Botany* 17: 270-302.
- Widholm, J. M. L. A. Withers, K. R. Wood. 1985. Plant Cell Culture a practical approach. (eds) IRL. Prees. U.S.A.
- Wilson, R. 1989. Threats to Biodiversity. *Sci. Amer.* 261:108-116.
- Xu, Feng. 2005. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology* 1(1): 38-50.
- Yáñez, E. L. 2006. Las cycadas biología y conservación en México. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. Chapingo, México. 209p.

9. Apéndices.

Apéndice I Composición del medio Murashige y Skoog (1962).

| Componente | | MS (g/l) | MS 50% (g/l) |
|---------------------------------------|---------------------------------------|----------|--------------|
| Macronutrientes | (NH ₄)NO ₃ | 1.65 | 0.825 |
| | KNO ₃ | 1.9 | 0.950 |
| | MgSO ₄ * 7H ₂ O | 0.37 | 0.185 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0.17 | 0.085 |
| CaCl ₂ * 2H ₂ O | | 0.44 | 0.220 |

| | | | |
|--|--|----------|-----------|
| Micronutrientes | MnSO ₄ * H ₂ O | 0.01689 | 0.0084445 |
| | ZnSO ₄ * 7H ₂ O | 0.0086 | 0.0043 |
| | H ₃ BO ₃ | 0.0062 | 0.0031 |
| | KI | 0.00083 | 0.000415 |
| | Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O | 0.00025 | 0.000125 |
| | CuSO ₄ * 5H ₂ O | 0.000025 | 0.0000125 |
| | CoCl ₂ * 6H ₂ O | 0.000025 | 0.0000125 |
| FeEDTA | FeSO ₄ * 7H ₂ O | 0.0278 | 0.0139 |
| | Na ₂ EDTA | 0.0373 | 0.01865 |
| Vitaminas | Tiamina | 0.0001 | 0.00005 |
| | Ac. nicotínico | 0.0005 | 0.00025 |
| | Piridoxina * HCl | 0.0005 | 0.00025 |
| Inositol | | 0.10 | 0.5 |
| Glicina | | 0.002 | 0.001 |
| Sacarosa o azúcar refinada | | | 30 |
| Agente gelificante (a elegir) | Agar bacteriológico | | 8.5 |
| | Gel rite | | 5 |
| | Phytigel | | 5 |
| pH | | | 5.7 |

Apéndice II

Preparación de fijador Navashin (Sandoval, 2005).

| Solución "A" | | |
|--------------|-----------------------|-------|
| | Formaldehído (37-40%) | 10 ml |
| | Alcohol (96%) | 50 ml |

| | | |
|--------------|-----------------------|-------|
| | Agua destilada | 35 ml |
| | Ácido acético glacial | 5 ml |
| Solución "B" | | |
| | Formaldehído (37-40%) | 30 ml |
| | Agua destilada | 70 ml |

Las soluciones "A" y "B" se mezclan en el momento de fijar las muestras.

Apéndice III

Preparación de soluciones de alcohol terbutílico (TBA) (Sandoval, 2005).

Proporciones usadas en la preparación de soluciones de TBA, para el proceso de deshidratación en alcoholes graduales.

| TBA % | H ₂ O (ml) | EtOH 95% (ml) | TBA (ml) | EtOH 100% (ml) |
|-------|-----------------------|---------------|----------|----------------|
| 30 | 65 | 30 | 5 | 0 |
| 50 | 50 | 40 | 10 | 0 |
| 70 | 30 | 50 | 20 | 0 |
| 85 | 15 | 50 | 35 | 0 |
| 95 | 0 | 45 | 55 | 0 |
| 100 | 0 | 0 | 75 | 25 |

Apéndice IV

Preparación de colorante Safranina "O" (IC 50240) (Sandoval, 2005).

| | |
|---------------------|-------|
| Safranina "O" | 1 g |
| Metilcelosolve | 50 ml |
| Alcohol 96% | 25 ml |
| Agua destilada | 25 ml |
| Acetato de sodio | 1 g |
| Formaldehído al 37% | 2 ml |

Apéndice V

Preparación de colorante Verde rápido FCF (grado reactivo, IC 42053) (Sandoval, 2005).

| | | |
|--------------|--------------------------|-------|
| Solución "A" | | |
| 1 | Verde rápido | 4 g |
| 2 | Alcohol etílico absoluto | 75 ml |
| 3 | Metilcelosolve | 25 ml |

Se disuelve el colorante en el alcohol y se agrega el metilcelosolve

| | | |
|--------------|--------------------------|-------|
| Solución "B" | | |
| 1 | Alcohol etílico absoluto | 25 ml |
| 2 | Aceite de clavo | 75 ml |

Se mezclan las soluciones "A" y "B" y posteriormente se filtran.

Apéndice VI

Hormonas vegetales y sus efectos en el CTV

| Fitohormonas | Mayores efectos en CTV |
|--|--|
| AUXINAS AIA: Ac. 3 - indolacético ANA: Ac naftalenacético AIB: Ac indol 3-butírico APA: Ac fenilacético 2,4 D: Ac 2,4 diclorofenoxiacético 2,4,5T: Ac 2,4,5 triclofenoxiacético Picloram Dicamba ACP: Ac. Clorofenoxiacético | <ul style="list-style-type: none"> ✚ Formación de raíces adventicias (a altas conc.) ✚ Formación de brotes adventicios (a bajas conc.) ✚ Inducción de embriones somáticos (embrioides) (en parte 2,4D) ✚ División celular ✚ Formación y crecimiento de callos ✚ Inhibición del desarrollo de yemas axilares. ✚ Inhibición del crecimiento de la raíz. |
| CITOKININAS Z: Zeatina ZR: Ribosido de la Zeatina IP: isopenteniladenina IPA: isopenteniladenosina BAP: 6 bencilaminopurina KIN: 6 furfurilaminopurina TDZ: Thidiazuron CPPU: N(2-cloro-4piridil)N-fenil urea | <ul style="list-style-type: none"> ✚ Formación de raíces adventicias (a altas conc.) ✚ Inhibición de la formación de raíces. ✚ División celular ✚ Formación y crecimiento del callo. ✚ Estimulación del desarrollo de yemas axiliares. ✚ Inhibición del alargamiento de los tallos ✚ Inhibición de la senescencia de la hoja. |
| GIBERELINAS GA ₃ : Ac. giberélico GA ₁ , GA ₄ , GA ₇ : (giberelinas) | <ul style="list-style-type: none"> ✚ Alargamiento del tallo ✚ Ruptura de la dormancia de la semilla, embriones somáticos, yemas apicales y bulbos. ✚ Inhibición de la formación de raíces adventicias ✚ Regula la formación de tubérculos, cormos y bulbos. |
| ETILENO | <ul style="list-style-type: none"> ✚ Estimula la senescencia de las hojas ✚ Estimula la maduración de los frutos ✚ Promueve o inhibe la regeneración adventicia (en dependencia del tiempo de aplicación o del genotipo). |
| ACIDO ABCÍSICO | <ul style="list-style-type: none"> ✚ Maduración de embriones somáticos ✚ Facilita la aclimatación ✚ Formación de bulbos y tubérculos ✚ Promueve el desarrollo de la dormancia |

| Fitohormonas | Efectos en cultivo de tejidos |
|--|---|
| POLIAMINAS Putrescina Espermidina Espermina | <ul style="list-style-type: none"> ✚ Promueven la formación de raíces adventicias ✚ Promueven la formación de brotes ✚ Promueven la embriogénesis somática |
| ACIDO JASMÓNICO (JA) MeJa: METILJASMONATO | <ul style="list-style-type: none"> ✚ Promueven la formación de bulbos y tubérculos ✚ Estimula la formación de meristemas. |
| BRASINOESTEROIDES Análogos Biobras 6 Biobras 16 | <ul style="list-style-type: none"> ✚ Estimulan el desarrollo de callos de caña de azúcar ✚ Favorecen recuperación de callos sometidos a estrés |
| OLIGOSACARINAS Pectimorf: oligogalacturónido DPS (12-14) | <ul style="list-style-type: none"> ✚ Estimulan el desarrollo de callos de caña de azúcar ✚ Estimulan el desarrollo de brotes de cítricos. |

Apéndice VII.

Artículo: Interciencia.

Sandra L. Cabrera H., Víctor M. Chávez A., Estela Sandoval Z., Richard E. Litz, Francisco Cruz S., 2008. Morfogénesis *in vitro* de *Dioon Merolae* De Luca, Sabato & Vázquez Torres (Zamiaceae, Cycadales), a partir de megagametofitos y embriones cigóticos. *Interciencia*, Diciembre, 2008. Vol. 33 12:929-934.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00048

Matrícula: 203180267

ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES IN VITRO PARA LA INDUCCION DE MORFOGENESIS EN DIOON MEROLAE DE LUCA, SABATO Y VAZQUEZ TORRES (ZAMIACEAE) ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCION.

En México, D.F., se presentaron a las 13:00 horas del día 30 del mes de marzo del año 2009 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. ELSA BOSQUEZ MOLINA
- DRA. JUDITH MARQUEZ GUZMAN
- DRA. LETICIA BUENDIA GONZALEZ
- DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA



SANDRA LUZ CABRERA HILERIO
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: SANDRA LUZ CABRERA HILERIO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

- APROBAR -

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS



DR. JOSE FRANCISCO FLORES PEDROCHE

PRESIDENTA




DRA. ELSA BOSQUEZ MOLINA

VOCAL



DRA. JUDITH MARQUEZ GUZMAN

VOCAL



DRA. LETICIA BUENDIA GONZALEZ

SECRETARIO



DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA