



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**"EVALUACIÓN DE LAS RESPUESTAS EMBRIOGÉNICAS EN *Cycas
revoluta* Thunb., A PARTIR DE CULTIVO DE CALLOS OBTENIDOS *in vitro*"**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presenta:

VIOLETA ALEJANDRA LÁZARO FLORES

Bajo la supervisión de:

JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O, DOCTOR EN CIENCIAS



Instituto de Horticultura



**DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES**

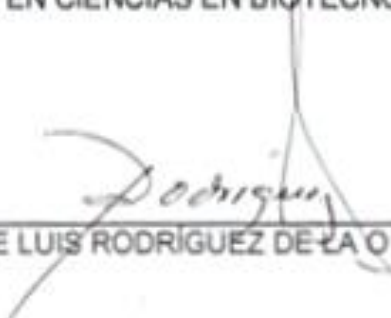
Chapingo, Estado de México a 2 de febrero de 2018.

**"EVALUACIÓN DE LAS RESPUESTAS EMBRIOGÉNICAS EN *Cycas
revoluta* Thunb., A PARTIR DE CULTIVO DE CALLOS OBTENIDOS *in vitro*"**

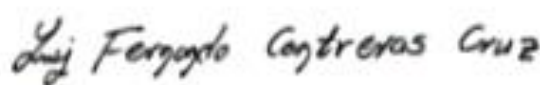
Tesis realizada por VIOLETA ALEJANDRA LÁZARO FLORES, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:


DR. JOSE LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

ASESOR:


DR. LUIS FERNANDO CONTRERAS CRUZ

ASESOR:


DRA. MARÍA SOL ROBLEDO Y MONTERRUBIO

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS.....	ix
DEDICATORIAS.....	x
AGRADECIMIENTOS.....	xi
DATOS BIOGRÁFICOS	xii
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Justificación	2
1.3. Objetivos	3
1.3.1. General.....	3
1.3.2. Específicos.	3
1.4. Hipótesis	4
1.5. Meta	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Generalidades del género <i>Cycas</i>	5
2.1.2. Importancia etnobotánica de la especie.	5
2.1.3. Características distintivas de <i>Cycas</i>	5
2.1.4. Principales contrariedades de permanencia.....	9
2.2. Morfogénesis <i>in vitro</i>	9
2.2.3. Factores que intervienen en los procesos morfogénicos (ES).....	17
2.3. Importancia de análisis histológicos en ES	19
2.3.1. Características de las células embriogénicas.....	19
III. ARTÍCULO 1	22
ABSTRACT	23
INTRODUCCIÓN.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26

Etapa de proliferación. Diferenciación celular, cuantificación de estructuras globulares o proembrionarias e incremento de biomasa.....	27
Variables evaluadas	28
Etapa de maduración. Obtención y maduración de embriones	29
Variables a evaluar	29
Etapa de Germinación. Respuestas asociadas al desarrollo y germinación de embriones somáticos.....	29
Análisis estadístico	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
Cuantificación de estructuras globulares o proembrionarias e IB	31
Características fenotípicas del callo.....	35
Obtención y maduración de embriones somáticos.....	36
Germinación de embriones somáticos	39
CONCLUSIONES.....	41
AGRADECIMIENTOS	42
LITERATURA CITADA.....	42
IV. ARTÍCULO II	47
ABSTRACT	48
INTRODUCCIÓN.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
Proliferación.....	52
Maduración.....	57
Germinación	59
CONCLUSIONES.....	61
AGRADECIMIENTOS	61
LITERATURA CITADA.....	62
LITERATURA CITADA	65

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Tipos y concentraciones de auxina-citocina aplicadas a megagametofitos de <i>Cycas revoluta</i> para inducción del callo.....	26
Cuadro 2. Tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento aplicados a callos amorfos de <i>Cycas revoluta</i> en etapa de proliferación...	27
Cuadro 3. Tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento empleados en la germinación de embriones somáticos de <i>Cycas revoluta</i> ..	30
Cuadro 4. Efecto de cuatro niveles de BA+2,4-D sobre la cantidad de callo y número de estructuras proembrionarias de <i>Cycas revoluta</i> a los 80 dds...	31
Cuadro 5. Efecto de cuatro niveles de kin + 2,4-D sobre la cantidad de callo y número de estructuras proembrionarias de <i>Cycas revoluta</i> a los 80 dds.....	32
Cuadro 6. Efecto de cuatro niveles de kin + picloram (sales al 50%) sobre la cantidad de callo y número promedio de estructuras proembrionarias de <i>Cycas revoluta</i> a los 80 dds.....	33
Cuadro 7. Efecto de niveles de kin + picloram (fuente de nitratos al 50%) sobre la cantidad de callo y número de estructuras proembrionarias de <i>Cycas revoluta</i> a los 80 dds.....	34
Cuadro 8. Significancia obtenida mediante la prueba de X ² de Pearson en la evaluación del contraste estadísticamente significativo entre tratamientos por modalidad en etapa proliferativa de callos de <i>Cycas revoluta</i> a los 80 dds.....	36
Cuadro 9. Maduración de embriones somáticos de <i>Cycas revoluta</i> expresados en el medio de maduración bajo cinco concentraciones de ABA.....	38
Cuadro 10. Tipo y concentraciones de reguladores de crecimiento empleados en el proceso de ES de <i>Cycas revoluta</i> en cada una de sus etapas.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparación esquemática del desarrollo de EPE (40-60 dds) de <i>Cycas revoluta</i> , bajo el efecto de BA + 2,4-D.....	32
Figura 2. Comparación esquemática del desarrollo de EPE (40-60 dds) de <i>Cycas revoluta</i> , bajo el efecto de kin + 2,4-D.....	33
Figura 3. Comparación esquemática del desarrollo de EPE (40-60 dds) de <i>Cycas revoluta</i> , bajo el efecto de kin + picloram (sales inorgánicas al 50%)..	34
Figura 4. Comparación esquemática del desarrollo de EPE (40-60) dds de <i>Cycas revoluta</i> , bajo el efecto de kin + picloram (fuente de nitratos al 50%)..	35
Figura 5. Estructuras proembrionarias de <i>Cycas revoluta</i> de 70 días de edad en las modalidades de MS (1962) empleadas en la etapa de proliferación. a) 4.44 + 1.36 μ M (BA + 2,4-D; nitratos al 50%); b) 13.94 + 6.79 μ M (kin + 2,4-D; sales al 100%); c) 2.32 + 4.14 μ M (kin + picloram; sales al 50%); y d) 2.32 + 4.14 μ M (kin + picloram; nitratos 50%).....	36
Figura 6. a) Callo potencialmente embriogénico de <i>Cycas revoluta</i> derivado de la combinación de 4.44 μ M BA + 1.36 μ M 2,4-D; b) Poliembrionía observada en medio carente de reguladores de crecimiento.....	38
Figura 7. Respuestas embriogénicas satisfactorias de callos de <i>Cycas revoluta</i> al medio de maduración carente de reguladores de crecimiento; a) coloración rosácea adquirida y pro-embriones internos de aspecto externo nodular (10 dds); b) expulsión de estructuras embrionarias globulares inmaduras (30 dds); c) Independencia a la masa callosa madre (70 dds); d) alargamiento de embriones somáticos con el suspensor evidente (70 dds); d) presencia de estructuras pre-cotiledonales (70 dds); y e) cotiledonales (110 dds).....	38

Figura 8. Respuestas de embriones somáticos de <i>Cycas revoluta</i> asociadas al desarrollo y germinación bajo el efecto de $4.44 + 1.35 \mu\text{M}$ (BA + 2,4-D). a-b) crecimiento meristemático bipolar evidente a partir de los 10 (a) y 40 dds (b); crecimiento meristemático apical y radical a los 10 (a) y 220 dds (b); e) expresión coleoptilar de un embrión de 27 dds; f) desarrollo de estructuras precarias a foliolos, actividad fotosintética evidente a los 70 dds (f).....	39
Figura 9. Porcentaje de respuestas asociadas a la germinación de embriones somáticos de <i>Cycas revoluta</i> a los 40 y 210 dds.....	40
Figura 10. a-b) Oxidación evidente del ápice radical de embriones somáticos de <i>Cycas revoluta</i> a los 220 dds; c-d) estructuras globulares embrionarias generadas a partir de ESR.....	41
Figura 11. Tejidos diferenciados a partir de organogénesis en callos de <i>Cycas revoluta</i> ; a-b) raíz normal con tejido epidérmico (E), caliptra (cal) y presencia de suberina en endodermis (en); c-e) raíz coraloide con epidermis definida (E), tejido procambial (pc), zonas de transición a tejido conductor (zdc) y zona algal (zal) con presencia de Norstoc; f-h) tejido similar a megasporófila con epidermis (E), tricomas simples (ts) y canales de taninos (ct) y mucilaginosos (cm) evidentes.....	53
Figura 12. Respuestas organogénicas en callos de <i>Cycas revoluta</i> a partir de kin + picloram con una reducción salina del 50%. a) desarrollo de traqueidas helicoidales, en las que se identifica el parénquima axial (pqa), la placa de perforación (per), pared secundaria (pse), y pared primaria (prim); b-d) estructura en forma de embudo que muestra células parenquimáticas con grandes vacuolas y organización celular en el ápice en etapa de citocinesis.....	54
Figura 13. Respuestas embriogénicas en callos de <i>Cycas revoluta</i> generadas a partir de: a) $6.79 + 13.94 \mu\text{M}$ (2,4-D + kin), estructura pro-embrionaria carente de tejido epidérmico; b-d) $4.65 + 4.14 \mu\text{M}$ (kin + picloram) reducción de sales al 50%, estructuras pro-embrionarias con tejido epidérmico en formación y células con núcleos profásicos.....	55
Figura 14. Tejido calloso de <i>Cycas revoluta</i> con tendencia a la independencia.....	56

Figura 15. Respuestas embriogénicas de callos de <i>Cycas revoluta</i> a partir de 4.44 +1.36 μ M (BA + 2,4-D) a los: a) 85 días, donde se observa la agrupación de células pequeñas y nucleadas con citoplasma denso, las cuales se distinguen de las células parenquimáticas a simple vista; b) pequeñas estructuras globulares proembrionarias con tejido epidérmico y depósitos de almidón evidente en callos de 170 dds.....	57
Figura 16. El medio de maduración carente de reguladores de crecimiento permitió en callos de <i>Cycas revoluta</i> : a) el desarrollo y b) la expulsión de las agrupaciones celulares internas de los callos potencialmente embriogénicos; c) estructura embrionaria globular con el tejido epidérmico en desarrollo, se encuentra aún unida al tejido calloso madre por células suspensorias; d) embrión somático globular independiente con división periclinal.....	58
Figura 17. Estructuras embrionarias de <i>Cycas revoluta</i> de más de 130 días en medio carente de reguladores de crecimiento, expresaron: a) células procambiales; b) tejidos similares a raíces normales; c) tejidos de conducción; d) crecimiento meristemático axilar; y d-e) producción de estructuras globulares con alto nivel de almidón y actividad mitótica notoria.....	59
Figura 18. Respuestas asociadas al desarrollo y germinación de embriones somáticos de <i>Cycas revoluta</i> a partir de 4.44 + 1.35 μ M (BA + 2,4-D); a) tejido embrionario con crecimiento meristemático apical dividido; b) tejido suspensorio de ~3mm de longitud caracterizado por células relativamente grandes, vacuoladas, carentes de núcleo; c) formación de traqueidas y canal de taninos; c) crecimiento meristemático apical; d) tejido endodérmico, células especializadas comienzan a definirse (50 dds); y f) embriones somáticos con tejido suspensor.....	60

ABREVIATURAS

ABA.....	Ácido abscísico
AG ₃	Ácido giberélico
AIA.....	Ácido indolacético
ANA.....	Ácido 1-naftalenacético
BA.....	Benziladenina
BAP.....	Benzilaminopurina
DC.....	Diferenciación celular
dds.....	Días después de subcultivo
ES.....	Embriogénesis somática
ESAF.....	Embriogénesis somática de alta frecuencia
ESBF.....	Embriogénesis somática de baja frecuencia
ESD.....	Embriogénesis somática directa
ESI.....	Embriogénesis somática indirecta
EPE.....	Estructuras pro-embrionarias
FAA.....	Fijador compuesto de formol, agua destilada, ácido acético y alcohol.
IBA.....	Ácido indol-3-butírico
kin.....	Kinetina
MS.....	Medio basal Murashige & Skoog (1962)
PEM.....	Masas pro-embriogénicas
TDZ.....	Thidiazurón
ZE.....	Embrión (es) cigótico (s)
ZT.....	Zeatina
μM.....	Micromolar (10 ⁻⁶ molar)
2ip.....	6-γ,γ-dimetilalilaminopurina
2,4-D.....	2,4-Diclorofenoxiacético

DEDICATORIAS

A Dios.

A mi madre: Isaias Flores Anota (†), por su ejemplo incanzable de lucha
diaria, amor y perseverancia.

A mi padre: Gilberto Lázaro, y hermanos: José, Jairo y Erick, recuerden
que la familia es como las ramas de un árbol, crecemos en distintas
direcciones pero las raíces siguen siendo las mismas.

A la familia Francisco Flores y Aguilar Lázaro por su apoyo desinteresado
hacia mí y mis hermanos.

A ti: Jose Alejandro Román Alba, por creer en mí en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el trayecto de formación académica en el programa “Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola”.

Al Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

A mi comité asesor: Dr. José Luis Rodríguez de la O, Dr. Luis Fernando Contreras Cruz y Dra. María Sol Robledo y Monterrubio, por su orientación, apoyo y disponibilidad desinteresada en la fase experimental, sus conocimientos fueron parte sustancial en la presente investigación.

Al Ing. Mario Iván Venegas Ayala, por la orientación técnica y aporte significativo en la parte histológica.

Al equipo técnico del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Laboratorio de Histología y Citología General de la Universidad Autónoma Chapingo.

Al M.A. Vitaliano Hernández, M.S.P.A. Jesús Hernández y los M.C. Araceli Munguia, Imelda Romero, Daniel Mendoza y Abed Nego, por su amistad.

A mis amigos.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre: Violeta Alejandra Lázaro Flores.

Fecha de nacimiento: 09 de julio de 1993.

Lugar de nacimiento: Zumpango del Río, Guerrero.

CURP: LAFV930709MGRZLL06

Profesión: Ingeniero Agrónomo Fitotecnista.

Cédula profesional: 9987835

Desarrollo académico

Media Superior: Unidad Académica Preparatoria No. 36. Universidad Autónoma de Guerrero (2008-2011).

Superior: Centro de Estudios Profesionales. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (2011-2015).

RESUMEN GENERAL

EVALUACIÓN DE LAS RESPUESTAS EMBRIOGÉNICAS EN *Cycas revoluta* Thunb., A PARTIR DE CULTIVO DE CALLOS OBTENIDOS *IN VITRO*

Con la finalidad de establecer las condiciones *in vitro* que promuevan las principales respuestas morfogénicas asociadas a la obtención de embriones somáticos de *Cycas revoluta* Thunb., se planteó el desarrollo de un protocolo alternativo a la propagación y conservación, así como para el estudio futuro en dicha especie; se sometieron callos amorfos obtenidos de megagametofitos a cuatro combinaciones del medio MS bajo condiciones asépticas, la oscuridad y temperaturas, observando el efecto de 2,4-D, picloram, BA y kin; se evaluaron niveles de diferenciación celular, el necrosamiento, su consistencia, color además se cuantificó el número de estructuras proembrionarias en dicha etapa, así como el incremento mensual de masa y volumen. Los callos potencialmente embriogénicos fueron subcultivados en MS diluyendo en un 75% de KNO₃ y 25% de NH₄NO₃, observando el desarrollo y maduración de embriones somáticos bajo el efecto de ABA en 0, 0.38, 1.13, 3.78 y 5.67 µM, los embriones maduros independientes al tejido calloso, fueron subcultivados en MS para diagnosticar el efecto de BA, 2,4-D, ANA, y AG₃ en el porcentaje de germinación. Se realizaron análisis histológicos para evidenciar los procesos celulares desencadenados en cada una de las etapas de ES. La combinación de 1.36 µM 2,4-D + 4.44 µM BA en MS con la fuente de nitratos al 50% originó callos potencialmente embriogénicos a los 170 dds, capaces de generar embriones en un medio sin la presencia de reguladores de crecimiento a partir de los 10 dds; no obstante, su maduración completa se presentó a los 125 dds. Por lo que la combinación de 1.36 µM 2,4-D + 4.44 µM BA estimularon en un 90% respuestas significativas asociadas al desarrollo y germinación. La presencia de grupos de células de tamaño mínimo, citoplasma denso y núcleo prominente, son características que definieron a los callos potencialmente embriogénicos.

Palabras clave: análisis histológicos, *Cycas revoluta* Thunb., embriogénesis somática, reguladores de crecimiento.

GENERAL ABSTRACT

EVALUATION OF THE EMBRYOGENIC RESPONSES IN *Cycas revoluta* Thunb., FROM CALLUS CULTIVATED *IN VITRO*

In order to establish the *in vitro* conditions that promote the main morphogenic responses associated with obtaining somatic embryos from *Cycas revoluta* Thunb., the development of an alternative protocol for propagation and conservation, as well as for future studies in this species, was proposed. Amorphous calluses derived from megagametophytes were subjected to four modalities of MS medium under aseptic conditions, darkness and ambient temperature, under the effect of 2,4-D, picloram, BA and kin; cell differentiation levels, oxidation, consistency and coloration were evaluated, and the number of proembryonic structure in that stage was quantified, as well as the monthly increase in biomass. Potentially embryogenic calluses were subcultured in MS with 75% dilution of KNO₃ and 25% of NH₄ NO₃, and the development and maturation of somatic embryos under the effect of ABA were evaluated at 0, 0.38, 1.13, 3.78 and 5.67 µM. Mature embryos regardless of callus tissue were subcultured in MS to diagnose the effect of BA, 2,4-D, NAA, and GA₃ on the percentage of germination. To demonstrate the cellular processes triggered in each of the ES stages, histological analyses were performed. The combination of 1.36 µM 2,4-D + 4.44 µM BA in MS with the source of nitrates at 50% originated potentially embryogenic calluses at 170 das, capable of generating somatic embryos in medium lacking growth regulators from 10 das; however, its full maturity occurred no earlier than 125 days. Therefore, the combination of 1.36 µM 2,4-D + 4.44 µM BA stimulated 90% significant responses associated with development and germination. The presence of groups with small-sized cells, dense cytoplasm and prominent nucleus are characteristics that defined the potentially embryogenic calluses.

Keywords: histological analysis, *Cycas revoluta* Thunb., somatic embryogenesis, growth regulators.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las cícadas son un grupo de plantas dioicas y ancestrales que aparecieron en el pérmico, florecieron durante el mesozoico y alcanzaron su máxima distribución durante el Jurásico (Gilbert, 1984). Evolucionaron a partir de las progimnospermas de esporas libres y precedieron a los Gingkoales y Gnetales (Litz, Chávez., and Moon, 1995a; Crane and Upchurch, 1987). Gilbert (1984) las ha denominado 'fósiles vivientes'. En la actualidad existen tres familias: Cycadaceae, Stangeriaceae y Zamiaceae, las cuales constan de 273 especies y 11 géneros (Chávez, Litz, Monroy, Moon and Vovides, 1998; Stevenson, 1990). No obstante, debido a los saqueos y colectas masivas en las poblaciones, todas las especies están ahora incluídas en el Apéndice I o II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES, 2017). *Cycas revoluta* Thunb., conocida comúnmente como palma de Sagú, es la más antigua de las cícadas vivas (Jones, 1993) y es empleada como fuente alimenticia, medicinal, ceremonial y principalmente ornamental, la especie simboliza la importancia económica de las cícadas (Mandal, Migliolo, Das, Mandal, Franco and Hazra, 2012; Duke, 2000; Brenner, Stevenson & Twigg, 2003; Mourya, Prakash, Swami, Singh and Malthur, 2011; Teixeira da Silva, Woondenberg and Songjun, 2014). Las cícadas se han considerado inestimables para el estudio y comprensión de la evolución de las plantas superiores (Norstog, 1987), son las únicas gimnospermas que establecen simbiosis con cianobacterias fijadoras de nitrógeno y poseen gametos masculinos flagelados (Vessey, Pawlowski and Bergman, 2005), además han desarrollado un excelente mecanismo de adaptación ante la escasez de agua y un amplio rango de adaptabilidad (-11 a 42°C, en el caso de *C. revoluta*); por lo que son material genético invaluable que con ayuda de la ingeniería genética podrían emplearse en el incremento de la resistencia y adaptabilidad de cultivos alimenticios, ornamentales e industriales combatiendo así el déficit de producción debido al calentamiento global y escasez de agua. Sin embargo, debido a la destrucción de su hábitat; interrupción del ciclo de vida de los polinizadores, lento crecimiento y

fertilización, asincronía en la madurez sexual, reproducción poco exitosa y en algunos casos (*Encephalartos natalensis*, *Cycas rumphii*, por ejemplo), inmadurez de los embriones después del desprendimiento de la semilla (Vovides, Pérez-Farrera, Gonzáles-Astorga, González, Gregory, Chemnick, Iglesias, Octavio-Aguilar, Avedaño and Bárcenas, 2003; Suinyuy, Donalson and Johnson, 2009; Woondenberg, Berjak and Pammenter, 2010); la propagación sexual se convierte en un verdadero reto y la clonal tradicional por su parte, es una alternativa que implica costos elevados, mano de obra para su mantenimiento y amplias extensiones, por lo que Teixeira da Silva et al. (2014) señalaron que existe una necesidad apremiante de desarrollar protocolos biotecnológicos efectivos para la producción en masa de cícadas y abastecer así, la demanda del mercado ornamental, contribuir a los métodos de conservación y prevenir la extinción.

1.1. Antecedentes

Las estrategias de Cultivo de Tejidos Vegetales fungen como alternativas útiles en la conservación de material genético relevante. Por ello, investigadores diversos de distinta índole han desarrollado experimentos asociados a cultivo *in vitro* de cícadas; sin embargo, en los últimos 70 años son pocos los reportes en los que se haya logrado la regeneración total. Las respuestas organogénicas son aún menos frecuentes en *Stangeria eriopus*, *Zamia furfurácea*, *Z. pumila*, *Encephalartos dyerianus*, *E. natalensis*, *Dioon edule* y *Cycas revoluta* (Litz et al., 1995a). En esta última, se ha buscado la regeneración de plantas a partir de ZE (Motoashi, 2008); hojas, nervadura central, epicotilos (Pan, Neeraj, Srivastava, Kishore and Sarethy, 2013; Rinaldi and Leva, 1995); endospermo (Ling, Thing, Gansau & Hussein, 2008) y megagametofitos (De Luca, Moretti and Sabato, 1979; La Rue, 1954; Ling et al., 2008; Webb, Nevarez & de Jesús, 1984).

1.2. Justificación

Las mejores respuestas mediante ZE; y aunque Litz et al. (1995a) señalaron que el potencial morfogénico de los tejidos de cícadas se han reconocido

durante muchos años, el uso de explantes haploides o aquellos que no requieren de una fecundación, permite optimizar de manera significativa los recursos genéticos. El empleo de megagametofitos como fuente de explante en *C. revoluta* ha generado apogamia en cultivos de dos años; se han reportado yemas y raíces; es decir, respuestas organogénicas que, según Ashmore (1997), tienen uso limitado para la conservación de los recursos genéticos debido a la inestabilidad genética inherente a este tipo de plantas. Asimismo; se ha señalado el crecimiento limitado de callos en los que se describió la diferenciación de masas compactas y esféricas; no obstante, no se estableció si eran embriones haploides mal desarrollados o meristemas adventicios (La Rue, 1954; De Luca et al., 1979). Por tal razón, el empleo de técnicas histológicas es sustancial en la comprensión de las respuestas y procesos celulares desencadenados en cultivo *in vitro*. El desarrollo de EPE a partir de cultivos embriogénicos de cícadas en general, sigue siendo ineficiente, ya que no responden a los estímulos estándar inductores de latencia, los cultivos no pueden ser sincronizados y por ende, ciertos eventos de desarrollo, son difíciles de identificar (Litz et al., 1995a).

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Establecer las condiciones *in vitro* que permitan promover las principales respuestas morfogénicas asociadas a la obtención de esm de *Cycas revoluta* Thunb., que permitan establecer un protocolo alternativo a la conservación y estudios futuros de dicha especie.

1.3.2. Específicos.

- Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento y coadyuvantes en las etapas que conforman el proceso de ES mediante callos cultivados *in vitro*.

- Identificar el medio, las condiciones, tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento que permitan la obtención de embriones somáticos.
- Describir fenotípicamente el callo que logró las mejores respuestas en el proceso de ES.
- Evaluar histológicamente el proceso de callogénesis y ES de *C. revoluta* a partir de megagametofitos, como fuente de explante.

1.4. Hipótesis

- La combinación y concentración adecuada BA, 2,4-D, kin, picloram, ABA, AG₃ y ANA, promoverán respuestas embriogénicas *in vitro* satisfactorias de *C. revoluta*.
- Los experimentos establecidos lograrán desarrollar características propias, así como callos potencialmente embriogénicos.
- El análisis histológico permitirá comprender la serie de procesos ocurridos en cada etapa del desarrollo embriogénico.

1.5. Meta

Elaborar un protocolo eficiente para la regeneración *in vitro* de *C. revoluta*., a partir de megagametofitos y explicar su proceso embriogénico a través de estudios de tipo histológico, logrando un minúsculo aporte a la conservación, rescate y preservación de la especie.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del género *Cycas*.

2.1.2. Importancia etnobotánica de la especie.

C. revoluta., conocida vulgarmente como “Palma de Sagú”, es nativa del sur de China y Japón (Stevenson, 1990). Debido a su antigüedad, longevidad, rusticidad y belleza es muy utilizada como planta de ornato, y aunque en la actualidad se cultiva en viveros para satisfacer la demanda del mercado ornamental, las poblaciones silvestres han disminuido a tal grado que se encuentra en el Apéndice II del CITES (2017). Es probablemente el miembro más estudiado de la familia Cycadaceae y el más antiguo de los que viven, referente a este grupo (Jones, 1993). La especie simboliza la importancia económica de las cícadas (Teixeira da Silva et al., 2014); además, por su valor nutricional es utilizada en el medio oriente como fuente alimenticia (Beaton, 1982; Brenner et al., 2003), medicinal (Kowalska, Itzhak and Puett, 1995; Mandal et al., 2012; Moawad, Hetta, Zjawiony, Jacob, Hifnawy and Ferreira, 2013) y ceremonial (Beck, 1992; Whiting, 1963; Melagrejo, 2017).

2.1.3. Características distintivas de *Cycas*.

2.1.3.1. Dioicismo. Las cícadas son plantas extraordinarias ya que presentan los sexos masculino y femenino separados, condición conocida como dioicismo. Esto es raro para el reino vegetal ya que solo se da en aproximadamente el 6% de todas las plantas del planeta (Renner and Ricklef, 1995).

2.1.3.2. Morfología.

a) Raíz. Las raíces en *Cycas*, son de dos tipos: normales y coraloides. Las normales, son positivamente geo trópicas con crecimiento profundo en el suelo, sin pelos radicales. Su función es fijación, absorción de agua y nutrientes. Las raíces coraloides surgen a partir de las normales, son apogeo trópicas y crecen en busca de luz, establecen simbiosis con bacterias y algas, se dividen dicotómicamente para formar grandes racimos de estructuras verdosas o

parduscas que tienen apariencia de coral (Dhote, 2017). La detección y prueba de la forma de entrada de las cianobacterias a la raíz coraloide no es fácil; de hecho, se ha sugerido que pueden penetrar a través de roturas en las capas dérmicas o través de lenticelas (Schneider, 1894; Spratt, 1915; Chaudhuri and Akhtar, 1931); sin embargo, la raíz desarrolla anatómicamente una zona algal, que consiste en células grandes, radialmente alargadas y de pared delgada, que poseen grandes espacios intercelulares ocupados por algas. *Anabaena cycadae*, *Nostoc punctiforme*, *Oscillatoria*, *Azotobacter*, *Pseudomonas radicícola* e incluso algunos hongos, han sido reportados en la zona algal del género *Cycas* (Bowyer and Skerman, 1968; Chaudhuri and Akhtar, 1931; Dhote, 2017).

b) Tallo. El tallo de *Cycas*, se asemeja internamente al de una planta dicotiledónea. Es grueso, leñoso y generalmente no ramificado. Es tuberoso cuando es joven, pero columnar, erecto y fuerte a la madurez, se distingue porque la corteza y la médula son excepcionalmente grandes. Aunque el cambium vascular secundario se produce en los tallos de muchos géneros, la cantidad de tejidos vasculares secundarios producidos es relativamente pequeña y el xilema, es atravesado por numerosos rayos parenquimatosos amplios (Gifford and Foster, 1989). La epidermis es la capa más externa que consiste en células de paredes gruesas dispuestas de forma compacta. La corteza es grande y consiste en células parenquimatosas de pared delgada, rellenas densamente con granos de almidón. Contiene numerosos canales de mucilago y cada uno está revestido con muchas células epiteliales o secretoras radialmente alargadas. La endodermis y el periciclo no están claramente demarcados. Numerosos haces vasculares permanecen dispuestos en un anillo. Cada haz vascular es conjunta, colateral, y abierta. El xilema consiste en traqueidas y parénquima de xilema (Dhote, 2017).

c) Hojas. El género consta de dos tipos de hojas: verdes (pinnas) y escamosas o catáfilas; cada pinna es atravesada por una sola prominente vena media y las venas laterales están ausentes, cada pabellón se vasculariza mediante un único

haz que se extiende a través de la región de la vena central. Aunque las venas laterales están ausentes, una lámina de los llamados tejidos de transfusión accesorios se extiende desde cada lado de la vena central hasta los márgenes del pabellón (Brashier, 1968). Las hojas escamosas son secas color marrón, algo triangulares, con un extremo apuntado, están presentes en el ápice del tallo y permanecen cubiertas con tricomas (Dhote, 2017).

d) Estructuras reproductivas. 1) Estróbilo: es el cono macho, una estructura grande, cónica u ovoide, compacta, solitaria y poco acosada, que generalmente es terminal en su posición. Varias microsporofilas unidas perpendicularmente están dispuestas alrededor del eje del cono en espirales muy ajustadas. Todas las microsporofilas en un cono macho son fértiles excepto algunas en sus partes basal y apical (Dhote, 2017). 2) Cono hembra: *Cycas* es el único género dentro de las Cycadaceas en que se producen las megasporofilas, al igual que las hojas del follaje, en una corona relativamente floja que rodea el ápice del brote de la yema terminal; éstas, conservan muchas de las características de la estructura de la hoja de la cual evolucionaron (Chamberlain, 1935). Se trata de un cuerpo plano que consiste en una porción de hoja superior disecada o pinada, una porción que lleva el óvulo medio y un pecíolo proximal (Dehgan and Dehgan, 1988). El número de óvulos varía entre 2-12 en diferentes especies. Los óvulos son verdes cuando son jóvenes, pero a la madurez son carnosos y naranjas brillantes o de color rojo estructuras (Dhote, 2017).

2.1.3.3. Polinización. Las características superficiales de los gametofitos proporcionan información sobre las relaciones dentro del orden Cycadales y pueden estar relacionadas con el modo de polinización (Dehgan and Dehgan, 1988). En *Cycas* y *Ginkgo*, no se ha observado formación de polen; sin embargo, las megasporofilas producen espermatozoides altamente móviles y flagelados. La polinización de *C. revoluta* es tanto anemófila (restringido en hembras a 2 metros o menos de machos) como entomófila a través de la acción de gorgojos que han co-evolucionado con este tipo de plantas, los nitidulidos

son huéspedes polinizadores específicos de esta cícada (Kono and Tobe, 2007; Norstog and Fawcett, 1989).

2.1.3.4. Fecundación, embriogenia y desarrollo de semillas. Según Litz et al. (1995a), la fecundación puede ocurrir de 3-4 meses después de la polinización. No obstante, Chamberlain (1935) señaló que el intervalo entre la polinización y la fecundación varía de 4-6 meses, y que el desarrollo del ZE puede requerir de uno a año y medio después de la fecundación.

El megagametófito, al igual que en otras gimnospermas, es haploide, y es inicialmente rico en carbohidratos. Proporciona alimento para los ZE en desarrollo. Después de la fertilización del gameto femenino, el núcleo cigótico experimenta varias divisiones nucleares libres. La célula de óvulo fecundada puede ser bastante inmensa. Cuando se produce la celularización del megagametófito, se produce una diferenciación del proembrión en dos regiones distintas: y una región apical que consiste en células pequeñas, cada una con un núcleo prominente y una región densamente citoplásmica y subapical que consiste en una zona de transición o amortiguación junto con una región de células altamente vacuoladas (Chamberlain, 1935). La región anterior se desarrolla como el embrión; mientras que esta última región se convierte en el suspensor. El suspensor es una estructura masiva, cuya función es empujar mecánicamente el gran embrión en desarrollo hacia el megagametófito rico en nutrientes (Litz et al., 1995a). La poliembrionía simple, es el resultado de la fertilización independiente de varios huevos de un único gametófito, se produce en la mayoría de las cícadas (Chamberlain, 1935); aunque la poliembrionía de escisión es rara o inexistente, Saxton (1910) informó que el suspensor en una preparación histológica del embrión temprano de *Encephalartos* era ramificado, y que cada rama tenía un embrión igualmente desarrollado; tiempo después Litz, Moon and Chávez (1995b) generaron poliembrionía en cultivos embriogénicos de *Ceratozamia hildae*.

2.1.3.5. Propagación. Según Robinson (2010), hay tres tipos de propagación en cícadas; el primero y más común es por semilla, el segundo es por división (que es la eliminación de ramificaciones y esquejes); y el tercero, es el implemento de técnicas de cultivo de tejidos, utilizada con poca frecuencia. La mejoría en los métodos de propagación ha sido un tema prioritario, y se han propuesto varias estrategias, incluyendo la producción de semillas mejoradas por polinización manual, métodos de aceleración en germinación de semillas y poda en raíces para incrementar la tasa de crecimiento. Las técnicas de cultivo *in vitro* son investigadas como alternativas de propagación vegetativa (Dehgan, 1999).

2.1.4. Principales contrariedades de permanencia. Palm & Cycad Societies of Australia (PACSOA, 2017) señaló que cuando los polinizadores están ausentes, la polinización del viento es sólo accidental y relativamente ineficaz. Aunque el período total de polinización se extiende aproximadamente 2 meses, los óvulos de cada hembra son receptivos sólo por 2 semanas, en otras palabras, la duración de la polinización no está necesariamente sincronizada entre los individuos (Kono and Tobe, 2007). En general, las cícadas son de lento crecimiento y requieren de 3 a 10 años para alcanzar la madurez reproductiva (Chamberlain, 1935; Dyer, 1965). Inclusive, Norstog and Nicholls (1997) señalaron que pueden tardar hasta 15 años en alcanzar su madurez sexual, por lo tanto el número de ejemplares en poblaciones naturales aumentan a un ritmo relativamente lento. Chamberlain (1912), ha reportado que los embriones de algunas cícadas como *C. mexicana* no están completamente maduros en el momento en que se liberan las semillas. Muchas especies de cícadas existen en la naturaleza en poblaciones de menos de un centenar de individuos Litz et al. (1995a).

2.2. Morfogénesis *in vitro*.

El marco teórico y la experimentación dentro de la biotecnología vegetal, derivan del concepto de totipotencialidad celular, abordado por Schleiden

(1838) y Schwann (1839) quienes reconocen a la célula como la unidad primaria de todos los organismos vivos (Dhillon and Gosal, 2013; Vasil, 2008). El carácter totipotente de las células, permite que cualquier célula diferenciada que conserve su núcleo tenga la capacidad de regenerar una nueva planta por vía organogénica o ES (Reynolds, 1997).

La morfogénesis se define como la formación o la génesis de órganos y comprende el crecimiento y la diferenciación celular. En células o tejidos cultivados *in vitro* el proceso morfogenético puede inducirse ya que, las células vegetales son capaces bajo determinados estímulos de desdiferenciarse y diferenciarse de nuevo (Pierik and Sagasta, 1990). La respuesta morfogenética puede manifestarse siguiendo dos rutas alternativas: la organogénesis y la embriogénesis. En la organogénesis se produce la formación de tallos, raíces u otras estructuras y en la embriogénesis se forman embriones que al germinar dan lugar a una planta. En ambos casos, el proceso se genera a partir de células somáticas. Si la respuesta primaria al estímulo morfogenético es la formación de callo antes de diferenciarse meristemos o embriones se habla de organogénesis o embriogénesis indirecta (Davey and Antony, 2010; Gisbert, Fita and Diez, 2008).

2.2.1. Embriogénesis somática

La ES asexual o adventicia, consiste en el desarrollo *in vitro* de embriones a partir del cultivo de células que no son el producto de una fusión gamética (Martínez-Ruiz, Azpiroz-Rivero, Rodríguez de la O, Cetina-Alcalá y Gutierrez-Espinoza, 2004). En este proceso las células somáticas adquieren competencia embriogénica bajo condiciones específicas. En estas células se producen cambios morfológicos, fisiológicos, moleculares y bioquímicos que finalmente conducen a la formación del embriones somáticos (Quiroz-Figueroa, Rojas-Herrera, Galaz-Avalos and Loyola-Vargas, 2006). Se conocen dos tipos de ES, la directa (ESD) y la indirecta (ESI). La ESD se caracteriza por la inducción de embriones somáticos directamente de células sin la proliferación de callos, mientras que en la ESI, los embriones somáticos se desarrollan a partir de

callos embriogénicos (Jiménez and Bangerth, 2001; Molina, Aponte, Cortina and Moreno, 2002; Quiroz-Figueroa et al., 2006). Existen dos tipos de ESI, una conocida como de baja frecuencia (ESBF) y otra señalada como de alta frecuencia (ESAF). En la primera, el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos por callo. Estos embriones aparecen entre las 12 y las 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos, y evolucionan completamente hasta las etapas avanzadas de desarrollo.

La ES en cícadas es relativamente baja, el desarrollo de embriones somáticos a partir de cultivos embriogénicos sigue siendo ineficiente, ya que no responde a estímulos estándar inductores de latencia. Debido a ello, los cultivos no pueden ser sincronizados y ciertos eventos de desarrollo, como la etapa nuclear libre y la etapa temprana de poliembrionía de escisión, son difíciles de identificar (Litz et al., 1995a). Las especies que se han podido regenerar *in vitro* mediante ES son *C. hildade*, *C. mexicana*, *E. cycadifolius*, *E. diyerianus*, *E. nataliensis*, *Z. fischeri*, *Z. furfuraceae*, y *Z. pumila* (a partir de EZ); *C. euryphyllidia*, *C. hildae*, y *C. mexicana* (a partir de hojas de plantas maduras) (Chávez, Litz and Norstog, 1992a; Chávez, Litz and Norstog, 1992c; Chávez et al., 1998; Jager and van Staden, 1996a; Litz et al., 1995a; Norstog and Rhamstine, 1967). Rinaldi and Leva (1995) afirmaron la obtención de masas pro- embriogénicas a partir de callos derivados de EZ; no obstante, no se presentó ninguna evidencia clara de estas estructuras.

En la ES se pueden distinguir cuatro etapas: inducción, proliferación, maduración y germinación (Chitra and Narmathabai, 2011; Yang and Zhang, 2007). Durante la fase de inducción, las células somáticas diferenciadas adquieren la competencia embriogénica y proliferan como células embriogénicas. En cambio, en proliferación, maduración y regeneración, las células embriogénicas muestran su competencia embriogénica y se diferencian para formar embriones somáticos (Jiménez, 2001).

a) Inducción. Las células embriogénicas son aquellas que han completado su transición de un estado somático a uno en el que pueden producir embriones

somáticos, reprogramando el ciclo celular con la ayuda de estímulos endógenos (De Jong, Schmidt and de Vries 1993); por ello, generalmente la etapa de inducción está condicionada por la presencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, fundamentalmente auxinas y citoquininas, pero se puede desencadenar, si el explante es inmaduro, en ausencia de los mismos, tanto en angiospermas (Fernández, 1997) como en gimnospermas (Lelu et al., 1999). En la mayoría de las especies la ES se obtiene a partir de ZE inmaduros, lo que es sobre todo típico en coníferas (Klimaszewska and Cyr, 2002). Por ello, la indagación experimental se enfatiza en la obtención de embriones somáticos a partir de tejidos no embrionarios con la finalidad de optimizar los recursos genéticos naturales.

Se ha sugerido que en la ESD, las células competentes pro-embriogénicas ya están presentes y la expresión solo depende de las condiciones favorables, mientras que en la ESI es necesaria una importante reprogramación celular para la desdiferenciación y capacidad de adquirir el estado embrionario (Williams and Maheswaran, 1986).

La iniciación de la vía embriogénica está restringida a la respuesta de ciertas células que pueden activar los genes implicados en la regeneración de células embriogénicas (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Los factores físicos y químicos que determinan esta vía, son un paso clave en la inducción de la embriogénesis somática. Se ha propuesto que los reguladores de crecimiento en plantas y el estrés, desempeñan un papel central en la señal que conduce a la reprogramación de la expresión génica, seguido de una serie de divisiones celulares que inducen tanto al crecimiento desorganizado que produce callos como al crecimiento polarizado que conduce a la ES (De Jong et al., 1993). El medio estándar de inducción que ha sido utilizado en la mayoría de los trabajos en cíadas fue originalmente descrito por Chávez (1992a) y se compone de sales inorgánicas mayores B5 (Gamborg et al., 1968) y menores Murashige & Skoog (1962), adicionado con componentes orgánicos como asparagina, asparagina, glutamina (100, 100, 400 mg L⁻¹), 60 g L⁻¹ de sacarosa y 2 g L⁻¹ de

goma de gelano (Chávez, Litz, Moon and Norstog, 1992b). Se utiliza 2,4-D y kin, para el primero se recomienda 4.5 μ M y para el segundo la concentración depende de la especie. El periodo de inducción aproximadamente es de tres meses bajo 25°C y ausencia de luz (Litz, Moon, Benson, Stewart and Chávez, 2004).

b) Proliferación. Una vez que las células embriogénicas se han formado, continúan proliferando y forman masas pro-embriogénicas (PEM). La auxina es necesaria para la proliferación de PEM y no es inhibidora en el desarrollo de embriones somáticos (Filonova, Bozhkov, Brukhin, Daniel, Zhivotovsky and von Arnold, 2000). En muchos sistemas embriogénicos, la transferencia de los embriones a un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento aumenta su desarrollo y conversión a plantas. Uno de los factores que probablemente determine la baja tasa de conversión a plántulas se asocia con los efectos residuales de 2,4-D (Cangahuala-Inocente, Steiner, Maldonado and Guerra, 2009; Konieczny, Pilarska, Tuleja, Salaj and Ilnicki, 2010). El grado de diferenciación de los embriones, que tiene lugar en presencia de auxina, varía en las diferentes especies; sin embargo, en la mayoría de los cultivos, el potencial embriogénico disminuye con el cultivo prolongado y se pierde con el tiempo (Von Arnold, Sabala, Bozhkov, Dyachok and Filonova, 2002). En cícadras, después de tres meses de exposición a condiciones inductivas, los cultivos embriogénicos consisten en pro-embryones somáticos que representan diferentes etapas de desarrollo. Los cultivos se transfieren del medio de inducción al medio de proliferación con la misma formulación que el anterior pero sin reguladores de crecimiento (Chávez et al., 1992b). Litz et al. (2004) señalan que estos cultivos embriogénicos no son receptivos a ABA debido a su condición evolutiva en el reino vegetal.

c) Maduración. El paso más crítico en la ES, así como en la formación de semillas sintéticas, es el proceso de maduración, específicamente en la capacidad de los embriones de germinar y producir plántulas (Ara, Jaiswal and Jaiswal, 2000).

La maduración de embriones somáticos en cícadas ocurre espontánea y continuamente, y pueden desarrollarse estructuras pre-cotiledonarias y poliembriogénicas. Los primordios cotiledonarios surgen de la región meristemática y se expanden rápidamente. Se han observado patrones anómalos de desarrollo durante la maduración del embrión (Litz et al., 2004). En *C. mexicana*, una estructura parecida a un coleóptilo encierra los cotiledones y el ápice de los brotes (Chávez et al., 1992b). Pese a que *C. hildae* y *C. mexicana* son monocotiledóneas naturalmente, en maduración *in vitro* se desarrollan dos cotiledones a partir de cada región meristemática (Chávez et al., 1992b; Litz et al., 1995a; 1995b). El ápice de la raíz está inicialmente cubierto por una coleorriza, y el meristemo apical está quiescente durante la ampliación del embrión (Chávez et al., 1992a). Se han realizado numerosos estudios en general, para ver cuáles podrían ser los métodos más efectivos en la maduración de embriones somáticos, los tratamientos que han tenido éxito incluyen la adición de reguladores osmóticos (Ramarosandratana, Harvengt, Bouvet, Calvayrac and Paques, 2001), el uso de inhibidores de etileno (Mandal, Gupta & Chatterji, 2001), suplementos de ABA (Othmani, Bayoudh, Drira, Marrakchi and Trifi, 2009; Torres, Ze & Cantliffe, 2001), estrés por falta temporal de nutrientes (Lee, Cho & Soh, 2001) y desecación (Gorbatenko & Hakman, 2001). El ABA se ha utilizado en cultivos de tejidos para promover la maduración de los embriones somáticos y la síntesis de las reservas de almacenamiento en los embriones durante la maduración (Von Arnold et al., 2002) y se utiliza, generalmente, para inducir la quiescencia durante el cultivo de tejidos vegetales (Zimmermann, 1993; Rai, Jaiswal and Jaiswal, 2008).

d) Germinación y/o regeneración. El ABA también actúa como un factor en la germinación y latencia en embriones somáticos (Ara, Jaiswal and Jaiswal, 1999). La germinación se produce seguida por la organización del meristemo apical. El suspensor suele desecarse en ese momento y rompe con el embrión somático; los germinantes desarrollan una raíz primaria vigorosa que debe acomodarse en medio de crecimiento semisólido a 10 cm de profundidad. El carbón activado se añade al medio de germinación para excluir parcialmente la luz (Chávez et

al., 1998). La expansión de la primera hoja circinada siempre ocurre después de la germinación (Litz et al., 2004). Es imposible predecir las respuestas de crecimiento y desarrollo a largo plazo de cultivos proliferantes *in vitro* de cícadras bajo condiciones de mantenimiento; sin embargo, es evidente que estos cultivos permanecen vigorosos sin pérdida de potencial morfogénico en medio de cultivo estándar, en algunos casos durante al menos 12 años (Litz et al., 2004).

2.2.1.1. Embriones somáticos. Los embriones somáticos son estructuras bipolares que cuentan con un eje radical y otro apical, cotiledones, no poseen conexión vascular con el tejido materno y presentan bandas pro-cambiales entre los ápices. Su desarrollo es nutrido por células vecinas a través de conexiones protoplasmáticas, estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales, debido a la naturaleza bipolar del embrión, es posible la alta velocidad de multiplicación (Escalant and Teissont, 1989; Sharp, Sondahl, Caldas and Maraffa, 1980; Zimmerman, 1993).

En el caso de las dicotiledóneas, un embrión somático es morfológicamente similar a un ZE, sobre todo en su desarrollo evolutivo desde proembrión, fase globular, corazón, torpedo y fase cotiledonal o embrión maduro (Yasuda, Nakajima, Masuda and Ohwada, 2000). En los estados iniciales, el suspensor está en menor desarrollo en embriones somáticos. Otra diferencia importante es que el ZE forma un eje embrional con el meristemo apical, preparándose para la dormancia. Mientras que el embrión somático no sufre disecación ni dormancia, así la ES se dirige a formar de una célula, una planta sin interrupción (Merkle, 1990).

2.2.1.2. ES secundaria o recurrente y anomalías morfológicas. En muchas ocasiones, a partir de las células epidérmicas de los embriones somáticos maduros, surgen nuevos. A este fenómeno se le conoce como embriogénesis somática recurrente o secundaria. A veces, los embriones somáticos presentan anomalías morfológicas como la aparición de un solo cotiledón, un número extra de cotiledones, cotiledones fusionados o cotiledones

con forma de trompeta (Hiraga, Minakawa, Takahashi, Takahashi, Hajika, Harada and Ohtsubo, 2007; Korbes and Droste, 2005; Santos, Mariath, Moco and Zanettini, 2006). Estas anomalías interfieren en el posterior desarrollo del esm a planta y parece que se deben a las condiciones de cultivo, al desequilibrio de nutrientes o a los factores de crecimiento (Guevin and Kirby, 1997); y que no son una consecuencia de factores intrínsecos ya que ZE extraídos de las semillas y cultivados *in vitro* presentaban las mismas anomalías (Gray and Purohit, 1991). Las anomalías morfológicas observadas, como los embriones multicotiledonares o la forma en abanico de los cotiledones, podrían estar relacionadas con trastornos en el transporte polar de auxinas (Liu, 1993).

2.2.2. Organogénesis. En la regeneración *in vitro* es de gran importancia el desarrollo de la organogénesis, la cual hace referencia a la capacidad de las células vegetales que se encuentran en el explante para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos nuevos que constituyen una planta (Smith, 2012). La organogénesis requiere que las células susceptibles de esta reprogramación genética, sean competentes y por ende, receptivas a procesos de dediferenciación y diferenciación celular (Thorpe, 2014), permitiendo el desarrollo de meristemos, yemas y brotes adventicios hasta la obtención de una plántula completa (Mathur and Koncz, 2005). En este proceso la mitosis es esencial ya que permite la formación de un número crítico de células en división activa, que son capaces de responder a señales de desarrollo, este grupo de células son llamadas meristemoides. Son de forma isodiamétrica, citoplasma denso, vacuolas pequeñas y núcleos prominentes, y contienen varios orgánulos y grandes cantidades de almidón, las cuales se necesitan en cantidades considerables durante su diferenciación (Thorpe, 2014). Los meristemoides son similares a meristemos verdaderos, ya que éstos poseen conexiones vasculares con el callo o el tejido circundante, y si están en condiciones adecuadas puede formar yemas o raíces primarias. En la organogénesis la repuesta de los explantes depende del balance entre auxinas

y citoquininas tanto en el medio de cultivo como las que existen en forma endógena en el explante (Cardoza, 2005).

2.2.3. Factores que intervienen en los procesos morfogénicos (ES).

La adquisición de capacidad embriogénica en plantas mayores se debe a varios factores intra y extracelulares (De Jong et al., 1993). Los aspectos que más influyen en la ES en general, en orden de importancia, son: los reguladores de crecimiento, tipo de explante, genotipo, estado de desarrollo del explante, medio de cultivo y tamaño del explante (Asemota, Eke and Odewale, 2007; Badawy, Habib, El-Bana & Yosry, 2005; Gueye, Morcillo, Collin, Gargani, Overvoorde, Aberlenc-Bertossi, Tranbarger, Sane, Tregear, Borgel and Verdeil, 2009; Perera, Vidhanaarachchi, Gunathilake, Yakandawala, Hoher, Verdeil and Weerakoon, 2009).

a) Reguladores de crecimiento. La adquisición de totipotencialidad es el paso más crítico en la ES y el factor más importante que la afecta, es la aplicación de hormonas endógenas, varias auxinas han sido utilizadas para estimular desdiferenciación y totipotencia (Cooke, Poli, Sztein and Cohen, 2002; Desamero, Rhodes, Decoteau and Bridges, 1994; Finstad, Brown and Joy, 1993; Xing, Li, Cui and Wang, 2000). Los reguladores de crecimiento pueden promover la morfogénesis aun cuando la concentración salina no sea la adecuada (Williams and Maheswaran, 1986). Las auxinas AIA, ANA, 2,4-D e IBA constituyen uno de los grupos más importantes. Estas se requieren en la mayoría de las especies vegetales para la inducción de los procesos de división celular y de iniciación de raíces (Smith, 1992). El 2,4-D es la auxina más eficiente y la más utilizada para la promoción de ES ya que: estimula una rápida división celular, una división sincronizada y una proliferación de células pro-embriogénicas (Litz et al., 1995a). Por otra parte, las citocininas como la kin, BA, ZT y 2ip, promueven la división celular, la proliferación de brotes y la morfogénesis de brotes. El ABA es una fitohormona involucrada en la abscisión y dormancia de hojas, es útil en el cultivo de embriones. Es termoestable, pero sensible a la luz (Rojas-Garcidueñas and Ramírez, 1987).

En la etapa de inducción, algunos autores han utilizado además de auxinas, citocininas como BAP, BA o TDZ en bajas concentraciones (Eke, Akomeah and Asemota, 2005; Eshraghi, Zarghami and Mirabdulbaghi, 2005; Sidky and Zaid, 2011). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el uso de citocininas en altas concentraciones podría aumentar la concentración de compuestos fenólicos y por tanto, afectar negativamente la inducción y el crecimiento de los embriones en plantas (Abohatem, Zouine and El Hadrami, 2011). Durante la etapa de proliferación se sugiere eliminar por completo los reguladores de crecimiento empleados en inducción o bien, reducir su concentración (Fki, Masmoudi, Drira and Rival, 2003; Othmani et al., 2009; Perera et al., 2009). Es importante destacar que cultivos sucesivos con altas concentraciones de auxinas en proliferación, pueden provocar en la etapa de maduración, una inhibición en el desarrollo de los embriones (Viñas y Jiménez, 2011). Mientras que en algunas especies se ha sugerido un medio de maduración sin reguladores de crecimiento (Komamine, Kawahara, Matsumoto, Sunabori, Toya, Fujiwara, Tsukahara, Smith, Ito, Fukuda, Nomura and Fujimura, 1992; Von Arnold et al., 2002), en otras se sugiere utilizarlos (Viñas y Jiménez, 2011). Sin embargo, no existe ningún regulador de crecimiento utilizado con mayor frecuencia, aunque el ABA ha mostrado ser efectivo en algunas especies como *Cocos nucifera* L., *Phoenix dactylifera* L., y *Phoenix canariensis* Chabaud (Fernando and Gamage, 2000; Perera, Hoher, Verdeil, Doulbeau, Yakandawala and Weerakoon, 2007; Zouine, El Bellaj, Meddich, Verdeil and El Hadrami, 2005). Se ha demostrado que la inclusión de AG₃ tiene un efecto positivo en la formación y germinación de embriones somáticos (Montero, Sáenz, Córdova, Quiroz, Verdeil and Oropeza, 2010; Perera et al., 2009).

b) Tipo de explante. Uno de los aspectos fundamentales en la consecución de respuestas morfogénicas es la influencia del tipo, tamaño y componente genético del explante, sobre el que a menudo no se incide suficientemente en las técnicas de cultivo *in vitro*. Sin embargo se ha comprobado en coníferas en particular que, existe una influencia importante del componente aditivo de la

varianza genética sobre la inducción de ES (Park, Pond and Bonga, 1993; 1994), lo que permitiría efectuar una mejora genética sobre este carácter.

c) Genotipo. El genotipo, tipo de tejido y estado de desarrollo pueden ser factores determinantes en la habilidad de respuesta comparativa a las auxinas o citocininas empleadas (Merkle, 1990).

d) Otros. El medio de cultivo influencia de manera significativa los procesos morfogénicos mediante tipo de constituyentes orgánicos e inorgánicos así como el tipo de medio (sólido, semisólido o suspensiones celulares). Las condiciones de crecimiento: la calidad, intensidad y duración de la luz, rango de temperatura, la densidad celular, concentraciones de oxígeno e intercambio gaseoso son factores importantes, que afectan la ES (Kobayashi, Higashi, Saitou and Kamada, 1999; Kvaalen and Ernstsén, 1993). Kikuchi, Satoh, Nakamura and Fujii (1995) describieron que las cerradas uniones intracelulares son esenciales para los procesos morfogénicos como la embriogénesis y organogénesis.

2.3. Importancia de análisis histológicos en ES

El conocimiento sobre las diferencias entre células o agrupaciones embriogénicas y no embriogénicas, pueden ayudar a dilucidar el mecanismo involucrado en la determinación del tipo celular. En consecuencia, el éxito del establecimiento de líneas celulares competentes para generar plántulas en varias especies depende de la capacidad de reconocer el tipo celular apropiado. Aunque en muchos casos es posible distinguir las células embriogénicas de las que no lo son únicamente con características físicas, este hecho por sí solo no proporciona información completa acerca de los mecanismos implicados en la ocurrencia de ES (Quiroz-Figueroa et al., 2006).

2.3.1. Características de las células embriogénicas

En la mayoría de los sistemas embriogénicos descritos, las células embriogénicas muestran características similares a las células meristemáticas.

Inicialmente los embriones son estructuras bipolares que al principio están unidos débilmente al explante o material genético (Benelli, Fabbri, Grassi, Lambardi and Rugini, 2001). Tal polaridad no es evidente en la formación de los órganos, que se mantienen unidos a los tejidos de origen (Dixon and Gonzales, 1985). Las células embriogénicas, a partir de las cuales se originan los embriones, se caracterizan por ser de pequeño tamaño, por poseer un citoplasma denso, grandes núcleos y nucléolos prominentes, vacuolas pequeñas, muchos ribosomas y altas concentraciones de ARN, proteínas y abundantes granos de almidón (Halperin and Jensen, 1967; Dutta-Gupta and Conger, 1999). Estas células además, suelen disponerse en la periferia de las masas pro-embriogénicas (Bozhkov, Filonova and von Arnold, 2002). Su pared celular es gruesa, dicho engrosamiento proporciona un relativo aislamiento que garantiza la expresión de su totipotencia, de tal forma que dentro de esas paredes se realizan divisiones por segmentación interna. Se forman, así, grupos discretos de células, de dos a ocho, separados del resto por una pared gruesa. Las divisiones continuadas en dichos grupos celulares originan estructuras alargadas con una organización bipolar: las EPE, que posteriormente se desarrollarán hasta la formación de embriones.

Como muchos de los pro-embryones iniciados degeneran o interrumpen su desarrollo, su número suele ser mayor del de los embriones somáticos formados a partir de ellos (Fernandez, Michaux-Ferreire and Coumans, 1999; Yu, Chen, Lu and Lin, 2000).

Existen estudios en los que se ha demostrado que los embriones globulares poseían unas células centrales relativamente vacuoladas, mientras que en el exterior las células mostraron una alta actividad mitótica con frecuentes divisiones periclinales. También se observó una diferenciación vascular en algunos casos de estos embriones globulares (Capelo, Silva, Brito and Santos, 2010; Conde, Loureiro and Santos, 2004; Pinto, Valentim, Costa, Castro and Santos, 2002). Junto a las células embriogénicas, existen otras alargadas, vacuoladas (en la mayor parte de su volumen) y carentes de potencial

embriogénico que, aunque no participen directamente en el proceso embriogénico, parece ser que lo sinergizan (Chasan, 1992), es decir, su presencia es necesaria para el proceso de ES.

Entre estos dos tipos de células (vacuoladas y embriogénicas), existe una continuidad citoplasmática a través de plasmodesmos (Sasaki, Shimomura, Kamada and Harada, 1994; Samaj, Baluska, Bobak and Volkmann, 1999). Posteriormente, durante el desarrollo de los embriones somáticos, esta conexión plasmodésmica se pierde (Kiyosue, Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, Higashi, Satoh, Kamada and Harada, 1992), lo que indica un aislamiento con el tejido que rodea a las células embriogénicas (Fransz and Schel, 1991). La muerte celular programada ha estado involucrada en varios procesos morfogénicos (Pennell and Lamb, 1997), incluyendo la ES; se puede desempeñar un papel en la degradación de aquellas células que forman el suspensor o, a la inversa, en la correcta formación del patrón del embrión somático a partir de masas pro-embriogénicas (Filonova et al., 2000).

III. ARTÍCULO 1

EVALUACIÓN DE LAS RESPUESTAS EMBRIOGÉNICAS EN *Cycas revoluta* Thunb., A PARTIR DE CULTIVO DE CALLOS OBTENIDOS *IN VITRO*

EVALUATION OF THE EMBRYOGENIC RESPONSES IN *Cycas revoluta* Thunb., FROM CALLUS CULTIVATED *IN VITRO*

RESUMEN

El desarrollo de protocolos biotecnológicos basados en embriogénesis somática como alternativa a los métodos convencionales de propagación, mediante el uso de tejidos ajenos a la fusión gamética es imprescindible para la conservación de especies fósiles como las cícadas. Con el objetivo de establecer las condiciones *in vitro* que promuevan las principales respuestas morfogénicas asociadas a la obtención de embriones somáticos de *C. revoluta*; callos amorfos derivados de megagametofitos fueron subcultivados en cuatro modalidades de MS, y bajo el efecto de tres combinaciones de BA, 2,4-D, kin, picloram (según la modalidad) y un testigo, se estimularon procesos celulares direccionados a la obtención de callos potencialmente embriogénicos, mediante la evaluación de niveles de diferenciación celular, oxidación, consistencia y coloración; ganancia de peso y desarrollo de estructuras proembrionarias. Posteriormente, dichos callos fueron subcultivados en MS diagnosticando el efecto de ABA en 0, 0.38, 1.13, 3.78 y 5.67 μM sobre la producción y maduración de embriones somáticos. La independencia del embrión, la coloración rosácea y el desarrollo apical, fueron los principales indicativos de la madurez embrionaria. Se evaluó el efecto de BA, kin, 2,4-D, AG₃ y ANA sobre el desarrollo y germinación de embriones somáticos maduros. 1.36 μM 2,4-D + 4.44 μM BA originaron callos con un nivel de DC (2), coloración cremosa (2) y consistencia compacta, que demostraron ser potencialmente embriogénicos a los 170 dds, capaces de producir embriones en medio carente de reguladores de crecimiento, la maduración óptima se suscitó no antes de los 125 dds. 1.35 μM 2,4-D + 4.44 μM BA estimularon un 90% respuestas asociadas a la germinación. La adición de carbón activado al medio aunado a una intensidad lumínica mayor, estimuló una embriogénesis somática recurrente evidente a los 33 dds en embriones somáticos de 220 días de edad en etapa germinativa.

Palabras clave: *C. revoluta*, cícadas, respuestas embriogénicas, reguladores de crecimiento.

ABSTRACT

The development of biotechnological protocols based on somatic embryogenesis as an alternative to conventional methods of propagation, through the use of non-gamic fusion tissues is essential for the conservation of fossil species as cycads. In order to establish the *in vitro* conditions that promote the main morphogenic responses associated with obtaining somatic embryos from *Cycas revoluta* Thunb; amorphous callus derived from megagametophytes were subcultured of MS modalities, and under the effect of three combinations of BA, 2,4-D, kin, picloram (depending on the modality) and a control, cellular processes were stimulated the obtaining of potentially embryogenic calluses, through the evaluation of cell differentiation levels, oxidation, consistency and coloration; weight gain and development of proembryonic structure. Subsequently, said calluses were subcultured in MS diagnosing the effect of ABA at 0, 0.38, 1.13, 3.78 and 5.67 μM on the production and maturation of somatic embryos. Embryo independence, rosacea color and apical development were the main indicators of embryonic maturity. The effect of BA, kin, 2,4-D, GA₃ and NAA, was evaluated on the development and germination of mature somatic embryos. 1.36 μM 2,4-D + 4.44 μM BA originated callus with a DC level (2), creamy coloration (2) and compact consistency, which proved to be potentially embryogenic at 170 dds, capable of producing embryos in medium lacking regulators of growth, its full maturity occurred no earlier than 125 days. 1.35 μM 2,4-D + 4.44 μM BA stimulated 90% responses associated with germination. The addition of activated charcoal in the medium combined with a higher light intensity stimulated an evident recurrent somatic embryogenesis at 33 dds in somatic embryos of 220 days of age on the germinative stage.

Keywords: *C. revoluta*, cycads, embryogenic responses, growth regulators.

INTRODUCCIÓN

Las cícadas son un grupo de plantas dioicas ancestrales que aparecieron en el pérmico y evolucionaron a partir de las progimnospermas de esporas libres, precediendo a los Gingkoales y Gnetales, lograron desarrollar mecanismos de adaptación y sobrevivencia, por lo que se han denominado “fósiles vivos”. (Litz et al., 1995; Crane and Upchurch, 1987; Gilbert, 1984). Biológicamente son muy interesantes dado que representan una etapa importante en la evolución de las fanerógamas y son consideradas basales en el árbol evolutivo de las plantas con semilla (Vovides, 2000). Su belleza y rareza, les ha generado una gran demanda, por lo que se han convertido en blanco perfecto de coleccionistas extremos y personas dedicadas al mercado negro de especies exóticas, provocando que en la actualidad todas las especies del orden Cycadales estén incluidas en el Apéndice I o II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES, 2017). *C. revoluta* es la más antigua de las cícadas vivas y está incluida en el apéndice II del CITES (2017). La especie simboliza la importancia económica del orden (Teixeira et al., 2014); y además de ornamental, se le han atribuido propiedades alimenticias y medicinales con efectos antibacteriales y deletéreos claros contra el cáncer epidermoide y de colon (Brenner et al., 2003; Duke, 2000; Mandal et al., 2012; Moawad et al., 2013). No obstante, debido a su lento crecimiento, dioicismo, desarrollo, y contrariedades en la semilla, la propagación se ha direccionado al empleo de retoños o brotes en la parte basal de las plantas progenitoras (Duke, 2000) limitando la variabilidad genética de manera significativa. Por ello, ha surgido una necesidad evidente e impostergable en el empleo de herramientas biotecnológicas que permitan una propagación eficaz de la especie para satisfacer la demanda, contribuir a la conservación y evitar la extinción. La ES, consiste en el desarrollo *in vitro* de embriones a partir del cultivo de células que no son producto de una fusión gamética (Martínez-Ruiz et al., 2004). En los últimos 70 años son pocos los reportes de cultivo *in vitro* en este tipo de plantas. La ES en cícadas es relativamente baja y las mejores respuestas se han obtenido a partir de ZE (Litz

et al., 2004). Litz et al. (1995) señalaron que el potencial morfogénico de los tejidos en cícadras se ha reconocido durante muchos años y que el uso de explantes haploides o aquellos que no requieren de una fecundación, permite optimizar de manera significativa los recursos genéticos, puesto que existen especies tales como *Encephalartos woodii* Sander., de las cuales solo se tienen ejemplares macho y es imposible la propagación sexual. Las investigaciones en *C. revoluta* han buscado la regeneración a partir de ZE (Motoashi, 2008); hojas, nervadura central y epicótilos (Pan et al., 2013; Rinaldi and Leva, 1995); endospermo (Ling et al., 2008) y megagametofitos (La Rue, 1954; De Luca and Sabato, 1980; Webb et al., 1984; Ling et al., 2008); sin embargo, el empleo de megagametofitos como fuente de explante ha generado respuestas organogénicas (yemas y raíces), que según Ashmore (1997) tienen uso limitado para la conservación de los recursos genéticos debido a la inestabilidad genética inherente a este tipo de plantas. El desarrollo de EPE a partir de cultivos embriogénicos en cícadras, sigue siendo ineficiente ya que los cultivos no pueden ser sincronizados y por ende, ciertos eventos de desarrollo, son difíciles de identificar (Litz et al., 1995). Los problemas de oxidación son frecuentes y las respuestas lentas, debido a la naturaleza de este tipo de plantas; Litz et al., (2004) han señalado que los cultivos embriogénicos de varias especies de cícadras han crecido vigorosamente y son altamente morfogénicos tras 11 años de la inducción. Los reguladores de crecimiento pueden promover la morfogénesis aun cuando la concentración salina no sea la adecuada (Williams and Maheswaran, 1986). Sin embargo, cuando se desea desarrollar ES, el uso de reguladores depende de la etapa del proceso (inducción, proliferación, maduración o germinación). Mientras que en cícadras se ha sugerido el uso de 2,4-D en la inducción, los cultivos embriogénicos deben subcultivarse en la misma formulación del medio basal pero carente de reguladores de crecimiento (Chávez et al., 1992). Litz et al., (2004) señalaron que estos cultivos embriogénicos no son receptivos a ABA debido a su condición evolutiva en el reino vegetal. Sin embargo, es indispensable recordar que son muchos los factores ajenos a los reguladores de crecimiento, que

influyen en las respuestas embriogénicas, como la especie y tipo de explante. Por ello, el objetivo de la presente investigación fue establecer las condiciones *in vitro* que permitan promover las principales respuestas morfogénicas asociadas a la obtención de embriones somáticos de *Cycas revoluta* Thunb., que posibiliten establecer un protocolo alternativo a la conservación y estudios futuros en dicha especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo, México. Se emplearon callos amorfos de tres meses de derivados de megagametofitos de *C. revoluta* a partir de un medio primario conformado por los macroelementos del medio B5 (Gamborg, 1968) y los microelementos del medio MS (1962) suplementado con arginina, asparagina y glutamina (100, 100 y 400 mg L⁻¹, respectivamente), sacarosa al 6% y 6 g L⁻¹ de gellam-gum. Los callos fueron obtenidos bajo el efecto de dos combinaciones de auxina-citocina (cuadro 1).

Cuadro 1. Tipos y concentraciones de auxina-citocina aplicadas a megagametofitos de *Cycas revoluta* para inducción del callo.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (μM)				
	2,4-D	Picloram	Kin	BA	TDZ
1	9.05	-	13.93	-	-
2	-	27.75	-	2.13	2.22

El proceso inducido de ES en la presente investigación, se evaluó mediante el establecimiento de experimentos en cada una de las etapas que comprenden la ES.

Etapa de proliferación. Diferenciación celular, cuantificación de estructuras globulares o proembrionarias e incremento de biomasa

Los callos amorfos obtenidos se sometieron a organización y DC empleando el medio MS (1962) en cuatro modalidades distintas.

Modalidad 1. MS (1962) con la fuente de nitratos al 50%, adicionado con myo-inositol, tiamina, piridoxina, ácido fólico, biotina, manitol, L-cisteína, PVP (100, 0.40, 0.5, 0.5, 0.5, 170, 60 y 70 mg L⁻¹, respectivamente) y sacarosa al 4%.

Modalidad 2. MS (1962) al 100%, adicionado con tiamina, myo-inositol, glutamina, arginina, asparagina (0.40, 100, 400, 100 y 100 mg L⁻¹, respectivamente) y sacarosa al 6%.

Modalidad 3. MS (1962) al 50%, adicionado con myo-inositol, tiamina, piridoxina, ácido fólico, biotina, manitol, PVP (100, 0.40, 0.50, 0.50, 0.50, 170 y 70 mg L⁻¹) y sacarosa al 4%.

Modalidad 4. MS (1962), reduciendo la fuente de nitratos al 50%, adicionado con myo-inositol, tiamina, piridoxina, ácido fólico, biotina, manitol, PVP (100, 0.40, 0.50, 0.50, 0.50, 170 y 70 mg L⁻¹) y sacarosa al 4%.

Los medios se ajustaron a un pH de 5.7±0.1, se ensayó el efecto de tres combinaciones distintas de reguladores de crecimiento y un testigo (cuadro 2).

Cuadro 2. Tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento aplicados a callos amorfos de *Cycas revoluta* en etapa de proliferación.

Modalidad	Tratamiento	Reguladores de crecimiento empleados (μM)			
		BA	2,4-D	Kin	Picloram
1	0	-	-	-	-
	1	1.33	0.45	-	-
	2	4.44	1.36	-	-
	3	13.32	4.52	-	-
2	0	-	-	-	-
	1	-	0.45	2.32	-
	2	-	2.26	4.65	-
	3	-	6.79	13.94	-
3 y 4	0	-	-	-	-
	1	-	-	0.46	4.14
	2	-	-	2.32	4.14
	3	-	-	4.65	4.14

Variables evaluadas

Para determinar el tipo de callo embriogénico modelo para un proceso exitoso de ES, se evaluaron las siguientes variables.

1. Niveles de diferenciación celular (DC), siendo: 0, sin diferenciación (callo amorfo); 1, diferenciación mínima; 2, agregados celulares (apariencia nodular); y 3, presencia de estructuras globulares o proembrionarias (EPE).
2. Coloración del callo, basada en la escala de Pantone. Los colores empleados fueron:

(1) Blanco	(5) 374 (crema verdoso)
 (2) P155 (crema claro)	 (6) 399 (verde militar)
 (3) 466 (crema rosáceo)	 (7) 164 (café)
 (4) 141 (crema amarillento)	 (8) Grisáceo/Negro

3. Consistencia: friable o compacta.
4. Niveles de oxidación (NO), siendo: 0, una oxidación menor al 25%; 1, del 25 al 75%; y 3, mayor al 75% de la masa callosa.
5. Cuantificación de estructuras globulares o proembrionarias (CE).
6. Incremento de biomasa (IB).

La cuantificación de pro-embryones, identificación de los niveles de DC, oxidación y coloración de la masa callosa fueron diagnosticadas cada diez días a través de un microscopio estereoscópico Carl Zeiss Stemi DV4 con una lente (8x/21), evaluando el comportamiento después de 80 dds. Para obtener el IB, los callos fueron pesados mensualmente a través de una balanza analítica dentro de una campana de flujo laminar por tres meses. Cada modalidad se manejó como un experimento distinto, con cuatro tratamientos (cuadro 2) y 10 repeticiones por tratamiento. Cada unidad experimental estuvo constituida por un frasco tipo Gerber con 20 ml de medio de cultivo.

Etapas de maduración. Obtención y maduración de embriones

Los callos con un nivel de DC 2-3 se subcultivaron en un medio basal MS (1962) con una reducción del 75 y 25% la fuente de nitratos (NO_3) y amonio (NH_4), respectivamente. El medio se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1 y se adicionó glicerol (30 g L^{-1}), glutamina, arginina, asparagina, L-cisteína, PVP (400, 100, 100, 60 y 70 mg L^{-1}) y sacarosa al 1%. Se ensayó el efecto de ABA en concentraciones de 0, 0.38, 1.13, 3.78 y $5.67 \mu\text{M}$. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar, con 10 repeticiones por tratamiento. Cada unidad experimental se constituyó de un frasco tipo Gerber con 20 ml de medio de cultivo.

Variables a evaluar

La variable a evaluar fue la cuantificación de embriones somáticos maduros cada diez días a través de un microscopio estereoscópico Carl Zeiss Stemi DV4. En esta etapa, los cultivos fueron establecidos bajo un fotoperiodo de 16 horas luz (26°C) y 8 horas oscuridad (24°C).

Etapas de Germinación. Respuestas asociadas al desarrollo y germinación de embriones somáticos

Los embriones somáticos maduros fueron subcultivados en un medio basal MS (1962) con un pH de 5.7 ± 0.1 , adicionado con myo-inositol, tiamina, piridoxina, ácido fólico, biotina, PVP, manitol ($100, 0.40, 0.50, 0.50, 0.50, 70, 170 \text{ mg L}^{-1}$), sacarosa al 4% y 7 mg L^{-1} de agar. Se evaluó el porcentaje de embriones con respuestas asociadas al desarrollo y germinación, bajo el efecto conjunto de auxinas, citocininas y giberelinas (cuadro 3). Los cultivos fueron establecidos bajo las mismas condiciones físicas que en la etapa anterior.

Cuadro 3. Tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento empleados en la germinación de embriones somáticos de *Cycas revoluta*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (μM)				
	2,4-D	BA	Kin	ANA	AG ₃
0	-	-	-	-	-
1	-	-	4.65	1.61	1.44
2	-	-	13.93	5.37	2.88
3	1.33	0.45	-	-	-
4	4.44	1.35	-	-	-
5	13.32	4.53	-	-	-

Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en la morfogénesis *in vitro* de los callos, se realizó un análisis de varianza para las variables CE e IB de la etapa de proliferación; y número de embriones maduros, en la etapa siguiente; para las primeras, se utilizó un diseño completamente al azar y se empleó la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$ para la comparación de medias mediante SAS (Statistical Analysis System, 2002). El modelo estadístico empleado fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media general.

T_{ij} = Efecto de los reguladores de crecimiento

ε_{ij} = Error experimental.

Para las variables: niveles de DC, oxidación, coloración y consistencia, de la etapa de proliferación, se realizaron cuadros contingencia y se utilizó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson (X^2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pese a que el medio basal empleado en todos los casos fue MS (1962), los callos amorfos subcultivados en etapa de proliferación tuvieron respuestas

contrastantes según la concentración de sales y principalmente, el tipo y concentración de reguladores de crecimiento, ya que como mencionaron Williams and Maheswaran (1986), éstos últimos pueden promover la morfogénesis aun cuando la concentración salina no sea la adecuada.

Cuantificación de estructuras globulares o proembrionarias e IB

Modalidad 1. La reducción de nitratos al 50% en el medio MS (1962) no estimuló la formación de EPE antes de los 80 dds; sin embargo, generó un IB mayor en comparación con el efecto conjunto de BA + 2,4-D. Destacando que en la dosificación empleada, la fuente de citocinina fue mayor que la de auxina, se discierne que a mayor concentración de BA las masas callosas limitaron su crecimiento en masa (IB) para comenzar a originar procesos de organización y DC, tal como lo señalaron Litz et al. (1995). Con un $\alpha=0.05$, se demostró que existen diferencias estadísticamente significativas en el número de EPE originadas bajo el efecto de BA + 2,4-D (cuadro 4); sin embargo, la variabilidad suscitada en los tratamientos, señala el origen de una posible ESAF que, como la describió Fieire (2003), las EPE se mantuvieron agrupadas en mayor número pero pocos callos.

Cuadro 4. Efecto de cuatro niveles de BA+2,4-D sobre la cantidad de callo y número de estructuras proembrionarias de *Cycas revoluta* a los 80 dds.

Concentración BA+2,4-D (μ M)	Incremento de biomasa (mg)	Número de estructuras diferenciadas
0 + 0	88.44 a [■]	0.00 b [■]
1.33 + 0.45	86.82 a	0.00 b
4.44 + 1.36	72.26 a	2.30 a
13.32 + 4.52	61.79 a	0.8 ab

■Valores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$

La combinación de 4.44 +1.36 μ M (BA + 2,4-D), tuvo un efecto positivo mayor en la generación de estructuras diferenciadas (2.30 en promedio), que perduraron a los 80 dds. En la figura 1, se esquematiza el comportamiento de los callos referente al número de EPE en el periodo más evidente de su desarrollo.

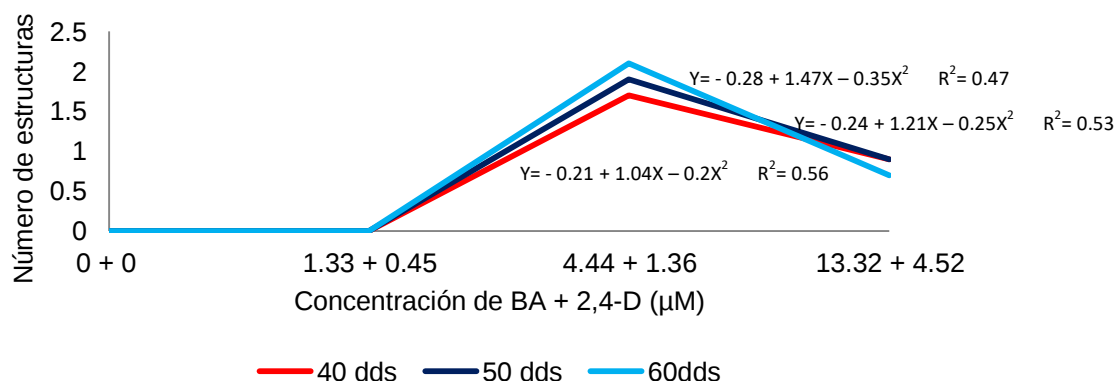


Figura 1. Comparación esquemática del desarrollo de EPE (40-60 dds) de *Cycas revoluta*, bajo el efecto de BA + 2,4-D.

Modalidad 2. El medio basal MS (1962) aunado al efecto de kin + 2,4-D generó el mayor número de EPE en comparación con los demás experimentos establecidos en la etapa de proliferación. Existen diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$) en el IB acrecentando a concentraciones superiores de kin+2,4-D; sin embargo, en comparación con los resultados obtenidos en la modalidad 1, el tratamiento que estimuló mayor IB, también generó un número de EPE superior (cuadro 5); lo que pudiera explicarse a través de un posible y cuantioso efecto residual de 2,4-D de la etapa inductiva, ya que como mencionaron Cangahuala et al. (2007) y Konieczny et al. (2010) dicho efecto es uno de los factores que probablemente determine la baja tasa de ES. La comparación de medias evidenció un mayor grado de variabilidad por tratamiento, indicando de manera precisa una ESAF.

Cuadro 5. Efecto de cuatro niveles de kin + 2,4-D sobre la cantidad de callo y número de estructuras proembrionarias de *Cycas revoluta* a los 80 dds.

Concentración KIN+2,4-D (μM)	Incremento de biomasa (mg)	Número de estructuras diferenciadas
0 + 0	44.00 b [■]	0.00 a [■]
2.32 + 0.45	73.74 b	2.10 a
4.65 + 2.26	143.53 ab	2.70 a
13.94 + 6.79	236.96 a	10.00 a

■ Valores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$

El número de EPE tuvo un incremento secuencial de acuerdo a la concentración de los reguladores de crecimiento empleados, evidente a partir de los 40 dds (figura 2).

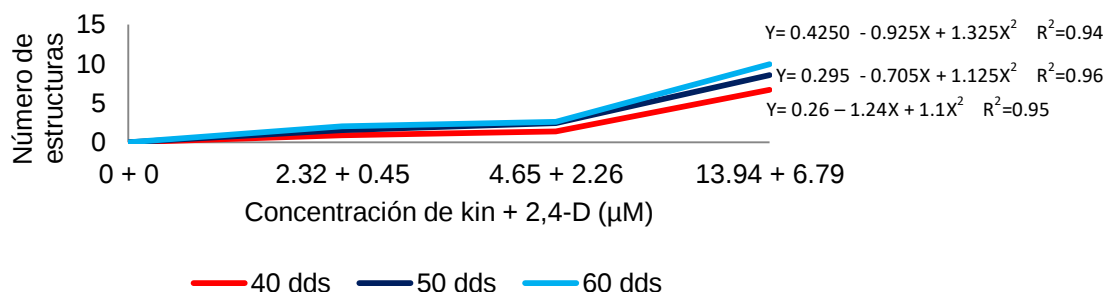


Figura 2. Comparación esquemática del desarrollo de EPE (40-60 dds) de *Cycas revoluta*, bajo el efecto de kin + 2,4-D.

Modalidad 3. El medio MS (1962) al 50%, permitió el desarrollo promedio de 1.30 EPE a los 80 dds en ausencia de reguladores de crecimiento. La combinación de 2.32 + 4.14 µM (kin + picloram) estimuló el desarrollo promedio de 5.5 estructuras diferenciadas (de las cuales 25.45% correspondieron a estructuras no proembrionarias de aspecto organogénico). Se suscitó un estímulo de alta división celular bajo el efecto de 0.46 + 4.14 µM (kin + picloram) que se reflejó en un IB numéricamente mayor, por la alta concentración de auxinas en comparación con la fuente de citocininas (cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de cuatro niveles de kin + picloram (sales al 50%) sobre la cantidad de callo y número promedio de estructuras proembrionarias de *Cycas revoluta* a los 80 dds.

Concentración de kin + picloram (µM)	Incremento de biomasa (mg)	Número de estructuras diferenciadas
0 + 0	109.9 a*	1.30 a*
0.46 + 4.14	580.9 a	1.70 a
2.32 + 4.14	390.8 a	5.50 a
4.65 + 4.14	321.6 a	3.50 a

*Valores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey con una $P \leq 0.05$

La producción de estructuras diferenciadas bajo el efecto de 2.32 + 4.14 μ M (kin + picloram) fue superior a partir de los 40 dds (figura 3).

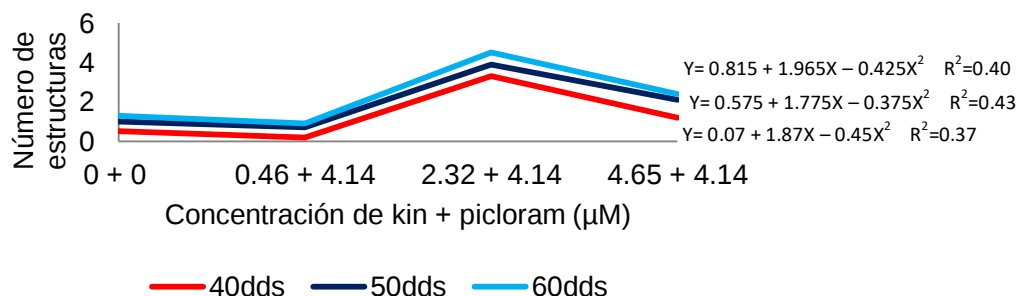


Figura 3. Comparación esquemática del desarrollo de EPE (40-60 dds) de *Cycas revoluta*, bajo el efecto de kin + picloram (sales inorgánicas al 50%).

Modalidad 4. El medio MS (1962) con la fuente de nitratos al 50% sin reguladores de crecimiento permitió el desarrollo promedio de 1.10 EPE. Las combinaciones empleadas de kin + picloram desarrollaron respuestas estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$) en IB y número de EPE a los 80 dds (cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de niveles de kin + picloram (fuente de nitratos al 50%) sobre la cantidad de callo y número de estructuras proembrionarias de *Cycas revoluta* a los 80 dds.

Concentración de kin + picloram (μ M)	Incremento de biomasa (mg)	Número de estructuras proembrionarias
0 + 0	136.2 b ^a	1.10 b
0.46 + 4.14	803.8 ab	5.50 a
2.32 + 4.14	925.6 a	2.80 ab
4.65 + 4.14	659.3 ab	1.90 b

^aValores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey con una $P \leq 0.05$

La figura 4 muestra la producción ascendente de EPE bajo el efecto de las dosis empleadas de kin + picloram a partir de los 40 dds.

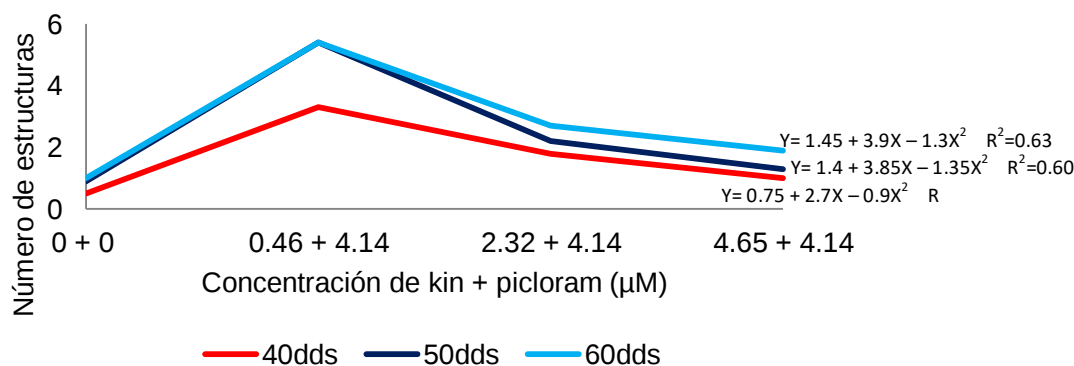


Figura 4. Comparación esquemática del desarrollo de EPE (40-60) dds de *Cycas revoluta*, bajo el efecto de kin + picloram (fuente de nitratos al 50%).

Características fenotípicas del callo

La aplicación de BA+2,4-D en el medio MS (1962) con la fuente de nitratos al 50%, estimuló el desarrollo de callos con un nivel de DC (2) en un 50%; caracterizado por una apariencia nodular y la carencia de EPE. Sin embargo, existen diferencias estadísticamente significativas con un $\alpha=0.05$ entre el nivel de oxidación y el tipo de consistencia y coloración suscitados a partir de las concentraciones de reguladores de crecimiento empleadas y testigo (cuadro 8). Es importante tener en cuenta que el uso de citocininas en altas concentraciones posibilita la concentración de compuestos fenólicos (Abohaterm et al., 2011). Lo anterior explica el efecto de $13.32\mu\text{M}$ de BA reflejado en niveles de oxidación (3). El efecto de kin + 2,4-D en el medio MS (1962) se caracterizó por el desarrollo de callos con un nivel de DC (2); sin embargo, a diferencia de la modalidad 1, ésta expresó una friabilidad evidente en un 72.5% de los callos y una oxidación nula en un 47.5%. No obstante, existieron diferencias estadísticamente significativas con un $\alpha=0.05$ en la coloración observada entre tratamientos, incluido el testigo (cuadro 8). El medio basal MS (1962) con la reducción de sales al 50%, bajo el efecto de kin + picloram produjo callos con estructuras diferenciadas en un 45% y compactidad en un 70%; no obstante, existe una diferencia estadísticamente significativa con un $\alpha=0.05$ en el nivel de oxidación entre tratamientos, incluido el testigo (cuadro 8). La aplicación conjunta de kin + picloram al medio MS (1962) con una reducción del 50% en la fuente de nitratos, produjo callos compactos en un 72.5%. Existen

diferencias estadísticamente significativas $\alpha=0.05$ en el nivel de DC, NO y coloración expresada entre tratamientos incluido el testigo (cuadro 8).

Cuadro 8. Significancia obtenida mediante la prueba de χ^2 de Pearson en la evaluación del contraste estadísticamente significativo entre tratamientos por modalidad en etapa proliferativa de callos de *Cycas revoluta* a los 80 dds.

Modalidad de MS (1962)	Estadísticos	Variables			
		Niveles de diferenciación celular	Niveles de oxidación	Coloración	Consistencia
1	P-valor	0.13	0.01*	0.00*	0.01*
	χ^2	2.51	2.26	0.02	0.09
2	P-valor	0.71	0.17	0.01*	1.00
	χ^2	10.80	2.86	0.84	-
3	P-valor	0.18	0.03*	0.20	0.95
	χ^2	2.90	1.25	5.38	8.00
4	P-valor	0.03*	0.04*	0.01*	0.48
	χ^2	1.27	3.13	4.81	2.27

* $P \leq 0.05$ = Diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

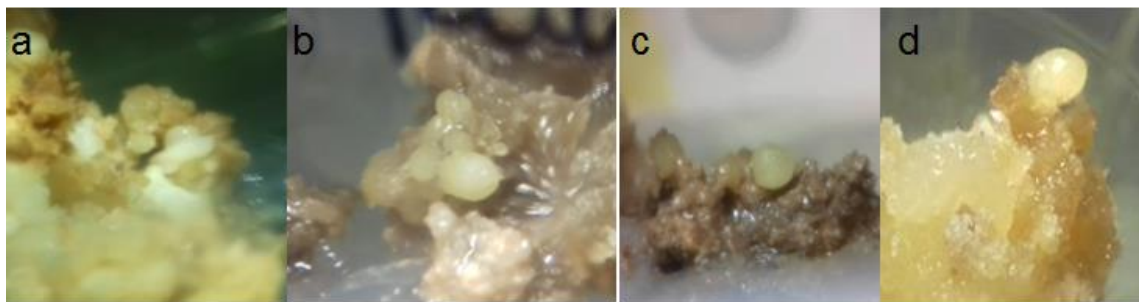


Figura 5. Estructuras proembrionarias de *Cycas revoluta* de 70 días de edad en las modalidades de MS (1962) empleadas en la etapa de proliferación. a) $4.44 + 1.36 \mu\text{M}$ (BA + 2,4-D; nitratos al 50%); b) $13.94 + 6.79 \mu\text{M}$ (kin + 2,4-D; sales al 100%); c) $2.32 + 4.14 \mu\text{M}$ (kin + picloram; sales al 50%); y d) $2.32 + 4.14 \mu\text{M}$ (kin + picloram; nitratos 50%).

Obtención y maduración de embriones somáticos

La combinación $4.44\mu\text{M}$ BA + $1.36\mu\text{M}$ 2,4-D con una reducción salina del 50% en el medio MS (1962), generó callos potencialmente embriogénicos a los 170 dds, caracterizados por nivel de DC (2), coloración (2) y consistencia compacta

(figura 6), los cuales expresaron respuestas satisfactorias al estímulo del medio MS (1962) carente de reguladores de crecimiento, bajo condiciones lumínicas. Aunque dichos callos, no incluían fenotípicamente EPE, la organización celular dentro de la masa callosa fue evidente al manifestar estructuras embrionarias a partir de los 10 dds y adoptar una coloración rosácea. La generación y expulsión de éstas, fue progresiva dentro de los primeros 40 días (cuadro 9); no obstante, su maduración fue evidente a partir 80 dds, y se distinguió principalmente por la independencia al tejido calloso y organización de meristemo apical; la poliembrionía (figura 6), el desarrollo de estructuras pre-cotiledonales y cotiledonales se suscitó en algunos embriones somáticos (figura 8). La poliembrionía, fue reportada por Litz et al. (1995) en cultivos embriogénicos de *C. hildae* derivados de hojas jóvenes. EPE de 80, 60, y 100 dds generadas en los medios distintos de la etapa de proliferación fueron subcultivadas en maduración; sin embargo, no se obtuvieron respuestas satisfactorias debido a la incapacidad de adaptación de tales estructuras a las nuevas condiciones *in vitro*; dicha incapacidad pudo originarse por la concentración elevada de auxinas en algunos tratamientos de la etapa proliferativa, que probablemente inhibió el desarrollo posterior como lo expresaron Viñas y Jiménez (2011). Asimismo, callos con nivel DC (2) con edad menor a 100 días, fueron subcultivados en el mismo medio y no mostraron progreso, lo que indica que, la maduración del tejido calloso en cada una de las etapas de ES, es imprescindible en la obtención de embriones somáticos, como lo indicaron Ruiz, Rivero, Alcalá y Espinosa (2004).

La aplicación de ABA en el medio no inhibió el desarrollo de embriones; sin embargo, se demostró que a mayor dosis, menor fue el número de embriones somáticos desarrollados (cuadro 9); al respecto, von Arnold et al. (2002) mencionaron que el ABA es capaz promover la síntesis de las reservas de almacenamiento en los embriones durante la maduración; no obstante, Litz et al. (2004) señalaron que cultivos embriogénicos de cícadras no son receptivos a ABA debido a su condición evolutiva en el reino vegetal.

Cuadro 9. Maduración de embriones somáticos de *Cycas revoluta* expresados en el medio de maduración bajo cinco concentraciones de ABA.

Dosis de ABA (μM)	Días después del subcultivo (dds)			
	10	20	30	40
0	1.70	2.60	3.00	3.00
0.38	1.00	1.30	1.90	2.20
1.13	1.00	1.20	1.70	1.90
3.78	0.60	0.90	1.20	1.40
5.67	0.60	0.80	0.90	0.90

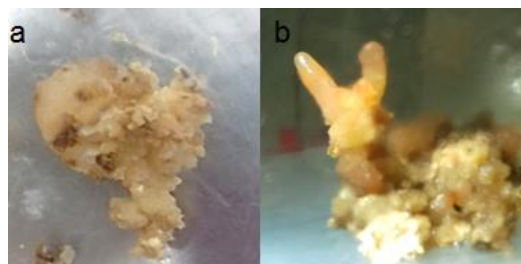


Figura 6. a) Callo potencialmente embriogénico de *Cycas revoluta* derivado de la combinación de $4.44 \mu\text{M}$ BA + $1.36 \mu\text{M}$ 2,4-D; b) Poliembriónía observada en medio carente de reguladores de crecimiento.

La observación del desarrollo gradual de los embriones somáticos obtenidos de *C. revoluta*, permitió dilucidar que su desarrollo morfológico es similar al que expresa un ZE, desde el desarrollo de pro-embriones (siendo aquellos internos los que mostraron progreso) de tipo globular y torpedo, hasta la fase pre y cotiledonal (figura 7).

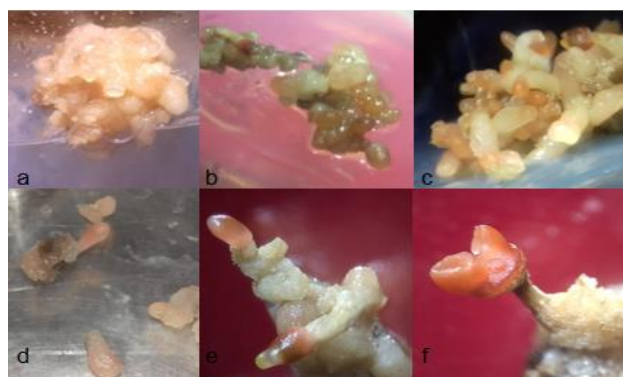


Figura 7. Respuestas embriogénicas satisfactorias de callos de *Cycas revoluta* al medio de maduración carente de reguladores de crecimiento; a) coloración rosácea adquirida y pro-embriones internos de aspecto externo nodular (10 dds); b) expulsión de estructuras embrionarias globulares inmaduras (30 dds); c) Independencia a la masa callosa madre (70 dds); d) alargamiento de embriones somáticos con el suspensor evidente (70 dds); d) presencia de estructuras pre-cotiledonales (70 dds); y e) cotiledonales (110 dds).

Germinación de embriones somáticos

Estructuras embrionarias de 129 días de edad, expresaron respuestas positivas asociadas al desarrollo y germinación en un 90% bajo el efecto conjunto de $4.44 + 1.35 \mu\text{M}$ (BA + 2,4-D). La germinación en cícadas es un proceso naturalmente lento; y en cultivo de tejidos, también; sin embargo, la figura 8, expresa el desarrollo embrional a los 10, 40 y 220 dds, demostrando respuestas favorables a corto plazo en comparación a los ZE, los cuales desarrollan de 1 a 1.5 años bajo condiciones *in situ*. La comparativa del porcentaje de germinación de embriones somáticos bajo el efecto conjunto de kin, ANA, AG₃, BA y 2,4-D (según el caso) a los 40 y 210 dds, se muestra en la figura 9, donde evidentemente el medio carente de reguladores de crecimiento no tuvo efectos positivos en el desarrollo embrional; en contraste, la combinación $4.44 + 1.35 \mu\text{M}$ (BA + 2,4-D), misma que se empleó en la obtención de callos potencialmente embriogénicos, estimuló respuestas asociadas a germinación satisfactorias hasta en un 90% desde los 10 dds.

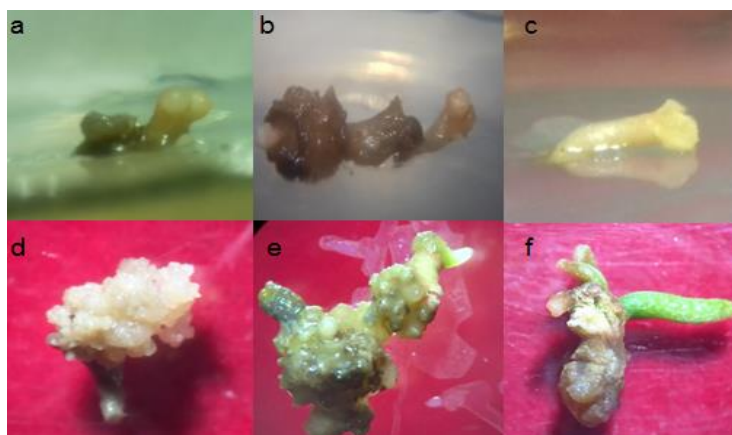


Figura 8. Respuestas de embriones somáticos de *Cycas revoluta* asociadas al desarrollo y germinación bajo el efecto de $4.44 + 1.35 \mu\text{M}$ (BA + 2,4-D). a-b) crecimiento meristemático bipolar evidente a partir de los 10 (a) y 40 dds (b); crecimiento meristemático apical y radical a los 10 (a) y 220 dds (b); e) expresión coleoptilar de un embrión de 27 dds; f) desarrollo de estructuras precarias a foliolos, actividad fotosintética evidente a los 70 dds (f).

Las respuestas asociadas al desarrollo y germinación se produjeron en aquellos embriones que mostraron una organización meristemática apical en la etapa anterior; lo que indica que la maduración embrionaria es indispensable en el progreso del tejido en su proceso de conversión a planta. El desarrollo de estructuras que pudieran ser previas al desarrollo foliar y la actividad fotosintética evidente (figura 8) coincide con lo señalado por Litz et al. (2004), quienes mencionaron que la expansión de la primera hoja circinada siempre ocurre después de la germinación.

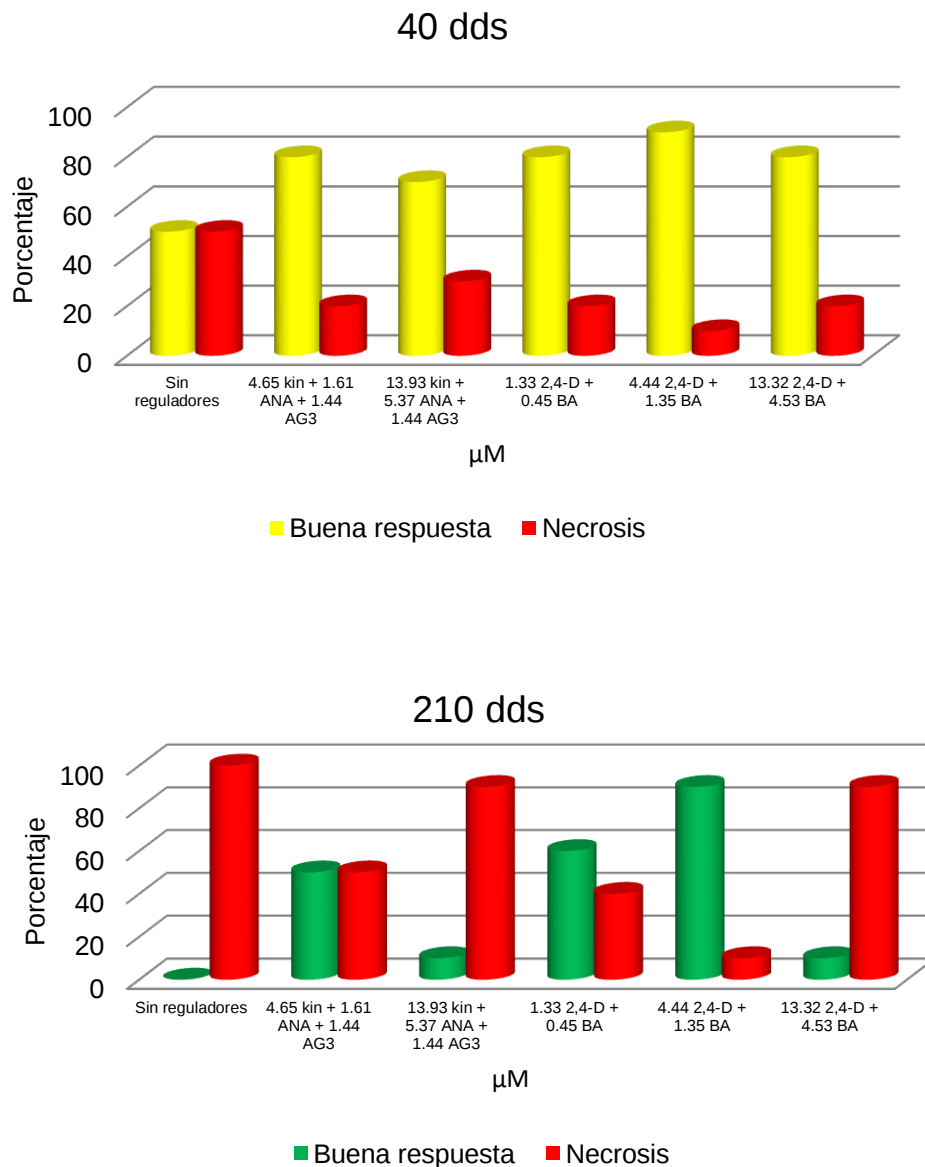


Figura 9. Porcentaje de respuestas asociadas a la germinación de embriones somáticos de *Cycas revoluta* a los 40 y 210 dds.

Estructuras embrionarias de 220 dds, mostraron una oxidación irrefutable en el ápice radical (figura 9); por lo que fueron subcultivados en un medio con la misma formulación, adicionando 100 mg L^{-1} de carbón activado (como lo sugirieron Chávez et al., 1998), y empleando BA + 2,4-D y una intensidad lumínica mayor. La producción de estructuras embrionarias a derivadas de la zona de crecimiento meristemático apical de embriones somáticos maduros a partir de los 30 dds fue incuestionable (figura 10), siendo en promedio 8.7 y 12.1 embriones somáticos bajo el efecto de $1.33 + 0.45$ y $4.44 + 1.35$ (μM) BA + 2,4-D, respectivamente. Lo anterior, indicó indiscutiblemente la presencia de una embriogénesis somática recurrente (ESR), ya que como señalaron Hiraga et al. (2007), en muchas ocasiones, a partir de los embriones somáticos maduros, se pueden formar nuevos embriones derivados de células epidérmicas. Sin embargo, el 2.48% presentaron anomalías en su morfología (forma de abanico), que como señalaron Liu et al. (1993), este tipo de condiciones podrían relacionarse con el transporte polar de auxinas.

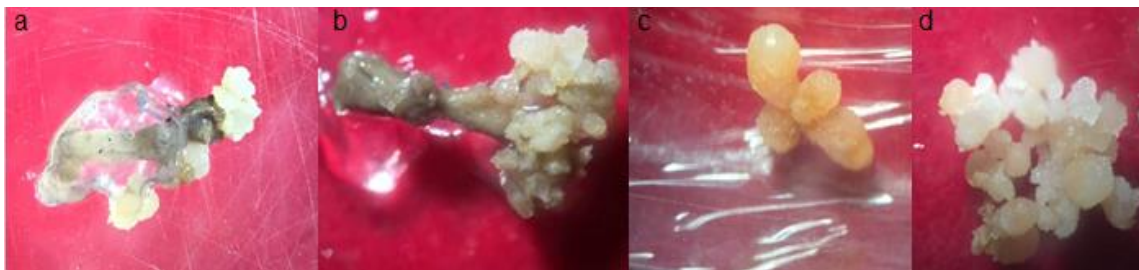


Figura 10. a-b) Oxidación evidente del ápice radical de embriones somáticos de *Cycas revoluta* a los 220 dds; c-d) estructuras globulares embrionarias generadas a partir de ESR.

CONCLUSIONES

La combinación de $4.44 + 1.35 \mu\text{M}$ BA + 2,4-D en un medio basal MS (1962) con la reducción del 50% en la fuente de nitratos, estimulan la formación de callos potencialmente embriogénicos a los 170 días de cultivo, que se caracterizan por una coloración cremosa, consistencia compacta y apariencia nodular.

El medio basal MS (1962) con la reducción de KNO₃ y NH₄NO₃ en 75 y 25%, respectivamente estimuló la producción de embriones somáticos a partir de los 30 días; sin embargo, la maduración se suscita no antes de los 100 días después de subcultivo.

La combinación de 4.44 + 1.35 µM BA+2,4-D estimularon respuestas asociadas a la germinación de embriones somáticos.

La maduración del tejido en cada una de las etapas de embrigénesis somática en cícadas, es sustancial para obtener embriones somáticos con un buen potencial regenerativo.

La aplicación de carbón activado bajo un estrés nutricional previo, estimuló embriogénesis somática recurrente en embriones somáticos de más de 220 días después del subcultivo.

AGRADECIMIENTOS

La primera autora agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca 736230/595557 durante el trayecto de formación académica en el programa “Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola”.

LITERATURA CITADA

Ashmore, S.E. (1997). *Statue report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetics resources*. Rome, Italy: International Plant Genetics Resources Institute.

Brenner, E.D., Stevenson, D.W., and Twigg, R.W. (2003). Cycads: evolutionary innovations and the role of plant derived neurotoxins. *Trends in Plant Science*, 8(9), 446-452. Recuperado de https://ac.els-cdn.com/S1360138503001900/1-s2.0-S1360138503001900-main.pdf?_tid=f046e5b8-dc78-11e7-9717-00000aacb360&acdnat=1512779944_b30349af0afa51caa7148621744b1bb9.

Cangahuala-Inocente, G.C., Steiner, N., Maldonado, S.B., and Guerra, M.P. (2009). Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acacia sellowiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(3), 217-224.

- Chávez, V. M., Litz, R.E., Moon, P.A., and Norstog, K. (1992). Somatic embryogenesis from leaf callus of a mature gymnosperm *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Cycadales). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 28(2), 59–63. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F02823019.pdf>.
- Chávez, V.M., Litz, R.E., and Marquez, J. (1995). Histology of somatic embryogenesis of the cycad *Ceratozamia mexicana* var. *Robusta* (Miq.) Dyer. *Plant Science*, 108(2), 191-200. Recuperado de https://ac.els-cdn.com/016894529504132E/1-s2.0-016894529504132E-main.pdf?_tid=05933e8e-dc7f-11e7-bc29-00000aabb0f6b&acdnat=1512782557_6dd4bc5e646a2a4f029f1e3a02b61799.
- Chávez, V.M., Litz, R.E., Monroy, M., Moon, P.A., and Vovides, A.M. (1998). Regeneration of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature phase trees. *Plant Cell Reports*, 17(8), 612-616. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs002990050452.pdf>.
- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES). (2017). Consultado el 23-06-2017 en <https://cites.org/eng/app/appendices.php>.
- Crane, P.R., and Upchurch, G.R.M. (1987). *Drewria potomacensis* gen. et sp. nov., an early Cretaceous member of the Gnetales from the Potomac Group of Virginia. *American Journal of Botany*, 74(11), 1722–1736. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/2444143.pdf>.
- De Luca, P., and Sabato, S. (1980). Regeneration of coralloid roots on cycad megagametophytes. *Plant Science Letters*, 18(1), 27-31. Doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(80\)90017-6](https://doi.org/10.1016/0304-4211(80)90017-6).
- Duke, J. A. (2000). *Handbook of nuts: Herbal Reference Library*. Recuperado de https://books.google.com.mx/books?id=Va3ED4zwXGIC&pg=PA133&lpg=PA133&dq=Handbook+of+nuts:+Herbal+Reference+Library.+Cycas+source=bl&ots=jF8885sl_K&sig=ITCjK6MwboQO69bBmYYLn-Jh3lQ&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwimis-X6PvXAhUH7oMKHVe2B3EQ6AEIMDAB#v=onepage&q=Handbook%20of%20nuts%3A%20Herbal%20Reference%20Library.%20Cycas&f=false.
- Freire, S.M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Bioteología Vegetal*, 3(4), 195 – 209.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. (1968). Plant cell cultures, I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158.

- Gilbert, S. (1984). *Cycads: statues, trade, exploitation and protection 1977-1982*. Washington, USA: TRAFFIC (USA).
- Hiraga, S., Minakawa, H., Takahashi, K., Takahashi, R., Hajika, M., Harada, K., and Ohtsubo, N. (2007). Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of *Japanese soybean* cultivars. *Plant Biotechnology*, 24(4), 435-440. Doi: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.435>.
- Konieczny, R., Pilarska, M., Tuleja, M., Salaj, T., and Ilnicki, T. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryos of *Trifolium nigrescens* (Viv.). *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 100, 123-130. Doi: 10.1007/s11240-009-9625-8.
- La Rue, C.D. (1954). Studies on growth and regeneration in gametophytes and sporophytes of gymnosperms. *Brookhaven Symposia in Biology*, 6, 187-208.
- Ling, P.K.A., Thing, Y.S., Gansau, J.A., and Hussein, S. (2008). Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revoluta*. *African Journal Biotechnology*, 7(23), 4279-4284. Recuperado de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59564/47855>.
- Litz, R. E., Chávez, V.M., and Moon, P.A. (1995). *Somatic embryogenesis in the Cycadales*. Doi: 10.1007/978-94-011-0960-4_1.
- Litz, R.E., Moon, P.A., Benson, E.M., Stewart, J., and Chávez, V.M. (2004). A Biotechnology Strategy for Medium- and Long-Term Conservation of Cycads. *The Botanical Review*, 70(1), 39-46. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/27571173.pdf>.
- Litz, R.E., Moon, P.A., and Chávez, V.M. (2005). Somatic embryogenesis and regeneration of endangered cycad species. *Acta Horticulturae*, 692, 75-79. Doi: 10.17660/ActaHortic.2005.692.8.
- Liu, M. (1993). Factors affecting induction, somatic embryogenesis and plant regeneration of callus from cultured immature inflorescences of sugarcane. *Journal of Plant Physiology*, 141(6), 714-720. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81580-4](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81580-4).
- Martínez-Ruíz, R., Azpiroz-Rivero, H.S., Rodríguez de la O, J.L., Cetina-Alcalá, V.M., y Gutierrez-Espinoza, M.A. (2014). Embriogénesis somática de *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden y *Eucalyptus urophylla* s. t. blake. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 10(2), 83-92.
- Mandal, S.M., Migliolo, L., Das, S., Mandal, M., Franco, O.L., and Hazra, T.K. (2012). Identification and Characterization of a Bactericida Proapoptotic Peptide From *Cycas revoluta* Seeds with DNA Binding Properties. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(1), 184–193. Doi: 10.1002/jcb.23343.

- Moawad, A., Hetta, M., Zjawiony, J.K., Jacob, M.J., Hifnawy, M., and Ferreira, D. (2013). Phytochemical Investigation of *Cycas circinalis* and *Cycas revoluta* Leaflets: Moderately Active Antibacterial Biflavonoids. *Planta Medica*, 76(8): 796–802. Doi: 10.1055/s-0029-1240743.
- Motohashi, T., Toda, M., and Kondo, K. (2008). Adventitious embryo formation derived from zygotic embryos in *Cycas revoluta*. *Plant Biotechnology*, 25(6), 589-591. Doi: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.25.589>.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497. Recuperado de http://priede.bf.lu.lv/grozis/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Skoog1962.pdf.
- Pan, S., Neeraj, A., Srivastava, K.S., Kishore, P., and Sarethy, I.P. (2013). Effects of growth regulators on in vitro response and multiple shoot induction in some endangered medicinal plants. *OA Biotechnology*, 2(1), 3. Recuperado de <http://www.oapublishinglondon.com/article/428>.
- Rinaldi, L.M.R., and Leva, A.R. (1995). *In vitro* organogénesis from diploid tissues of *Cycas revoluta* Thunb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43(1), 37-41. Doi: DOI: 10.1007/BF00042669.
- Ruiz, R., Rivero, H., Alcalá V., y Espinosa, M. (2004). Embriogénesis somática de *Eucalyptus grandis* Hill Ex maiden y *Eucalyptus urophylla* ST Blake. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 10(2), 8392.
- Teixeira da Silva, J. A., Woondenberg, W. R., and Songjun, Z. (2014). Cycads in vitro. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 24(2), 287-301. Doi: <http://dx.doi.org/10.3329/ptcb.v24i2.23562>.
- Viñas, M., y Jiménez, V.M. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 8(2), 229-242. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77621587023>.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., and Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233-249. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1015673200621.pdf>.
- Vovives, A. P. (2000). México: segundo lugar mundial en diversidad de cícadas. CONABIO. *Biodiversitas*, 31, 6-10. Recuperado de <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv31art2.pdf>.

- Webb, D.T., Nevarez, M., and De Jesús, S. (1984). Further *in vitro* studies of light-induced root nodulation in the Cycadales. *Environmental and Experimental Botany*, 24(1), 37-44. Doi: [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(84\)90058-3](https://doi.org/10.1016/0098-8472(84)90058-3).
- Williams, E.G., and Maheswaran, G. (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals Botany*, 57(4), 443–46. Doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087127>

IV. ARTÍCULO II

ANÁLISIS HISTOLÓGICO EN EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Cycas revoluta* Thunb., A PARTIR DE CALLOS CULTIVADOS *IN VITRO*

HISTOLOGICAL ANALYSIS IN THE PROCESS OF SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *Cycas revoluta* Thunb., FROM CALLUS CULTIVATED *IN VITRO*

RESUMEN

Callos amorfos de 3 meses de cultivo, derivados de megagametofitos de *C. revoluta*, fueron sometidos a embriogénesis somática. Se emplearon cuatro modalidades distintas del medio MS, y bajo el efecto de tres combinaciones de BA, 2,4-D, kin, picloram (según la modalidad) y un testigo, se estimuló la organización y diferenciación celular en etapa proliferativa. Posteriormente, se diagnosticó el efecto de ABA en 0, 0.38, 1.13, 3.78 y 5.67 μM en el desarrollo y maduración de embriones somáticos; y BA, kin, 2,4-D, AG₃ y ANA sobre las respuestas asociadas a germinación. Los callos con las mejores respuestas, se fijaron en FAA y fueron deshidratados en una serie de alcoholes graduales mediante un histokinette marca Leica TP 1020. Los cortes se realizaron en un micrótopo de rotación American Optical 820 con un grosor de 12-16 μm , posteriormente fueron teñidos con safranina y verde rápido, se montaron con resina sintética y se dejaron secar en un horno a 45°C por 15 días. Las muestras fueron observadas y fotografiadas a través de un Microscopio Carl Zeiss, y analizadas con el software Zen lite 2012. El estudio permitió señalar que cultivos establecidos bajo el efecto de 4.44 + 1.36 μM (BA + 2,4-D); así como 4.65 + 4.14 μM (kin + picloram), generaron a los 170 y 345 días, respectivamente; una organización celular evidente caracterizada por la agrupación de células con citoplasma denso y núcleos prominentes, capaces de responder a los estímulos posteriores generando en etapa de maduración, estructuras embrionarias globulares caracterizadas por la presencia de células epidérmicas con división periclinal evidente. La combinación de 4.44 + 1.35 μM (BA + 2,4-D) permitió respuestas asociadas al desarrollo y germinación de embriones somáticos, que se caracterizaron por la diferenciación celular enfatizada al desarrollo meristemático apical y radical de los embriones.

Palabras clave: histología, *C. revoluta*, respuestas embriogénicas, reguladores de crecimiento, procesos celulares.

ABSTRACT

Amorphous callus of 3 months of culture, derived from megagametofitos of *C. revoluta*, were submitted to somatic embryogenesis. Four different modalities of the medium MS were used, and under the effect of three combinations of BA, 2,4-D, kin, picloram (depending on the modality) and a control, cell organization and differentiation in the proliferative stage were stimulated. Subsequently, the effect of ABA was diagnosed at 0, 0.38, 1.13, 3.78 and 5.67 μM in the development and maturation of somatic embryos; and BA, kin, 2,4-D, GA₃ and NAA in the responses associated with the germination. The calluses with the best responses were fixed in FA and were dehydrated in a series of gradual alcohols, means of a histokinette brand Leica TP 1020. The cuts were made in an American Optical 820 rotation microtome with a thickness of 12-16 μm , it's subsequently were dyed with safranin and fast green, mounted with synthetic resin and allowed to dry in an oven at 45 ° C for 15 days. The samples were observed and photographed through a Carl Zeiss Microscope, and analyzed with the software Zen lite 2012. The study allowed to indicate that cultures established under the effect of 4.44 + 1.36 μM (BA + 2,4-D); as well as 4.65 + 4.14 μM (kin + picloram), generated at 170 and 345 days, respectively; an evident cellular organization characterized by the grouping of cells with dense cytoplasm and prominent nuclei, capable of responding to subsequent stimuli generating, in the maturation stage, globular embryonic structures characterized the presence of epidermal cells with evident periclinal division. The combination of 4.44 + 1.35 μM (BA + 2, 4-D) allowed responses associated with the development and germination of somatyc embyos, which were characterized by the cellular differentiation emphasized to the apical and radical meristematic development of the embryos.

Keywords: histology, *C. revoluta*, embryogenic responses, growth regulators, cellular processes.

INTRODUCCIÓN

Las cícadas son un grupo de plantas dioicas y ancestrales que aparecieron en el pérmico, florecieron durante el mesozoico y alcanzaron su máxima distribución durante el Jurásico (Gilbert, 1984). Evolucionaron a partir de las progimnospermas de esporas libres y precedieron a los Gingkoales y Gnetales (Litz et al., 1995; Crane and Upchurch, 1987). Gilbert (1984) las ha denominado “fósiles vivientes”, y algunos autores señalan que la permanencia de este tipo de plantas, sería como tener dinosaurios vivos. *Cycas revoluta* Thunb., conocida comúnmente como palma de Sagú, es la más antigua de las cícadas vivas (Jones, 1993), la especie simboliza la importancia económica del orden (Teixeira et al., 2014); no obstante, por su naturaleza, presenta algunas contrariedades de permanencia tales como: lento crecimiento, dioicismo, asincronía en la madurez sexual, cortos periodos de receptividad por parte de la hembra y largos periodos entre la polinización y fecundación; y en el desarrollo del ZE, entre otras cosas (Chamberlain, 1935; Kono and Tobe, 2007; Litz et al., 1995). Por ello, las técnicas de propagación se limitan al empleo de ramificaciones y esquejes (Robinson, 2010). Las técnicas de cultivo de tejidos en la propagación de tal especie, y de las cícadas en general, se utiliza en una frecuencia relativamente baja. El desarrollo de protocolos biotecnológicos basados en ES como alternativa a los métodos convencionales de propagación, mediante el uso de tejidos ajenos a la fusión gamética es imprescindible para la conservación de especies fósiles como las cícadas; las indagaciones en cultivo *in vitro* con este tipo de plantas han sido pocos en los últimos años y se ha buscado la regeneración a partir de ZE (Motoashi, 2008); hojas, vena central y epicotilos (Pan et al., 2013; Rinaldi and Leva, 1995); endospermo (Ling et al., 2008) y megagametofitos (La Rue, 1954; De Luca and Sabato, 1980; Webb et al., 1984; Ling et al., 2008); sin embargo, el empleo de megagametofitos como fuente de explante ha generado respuestas organogénicas (yemas y raíces), que según Ashmore (1997) tienen uso limitado para la conservación de los recursos genéticos debido a la inestabilidad genética inherente a este tipo de plantas. Rinaldi and Leva (1995), afirmaron la presencia de masas

embriogénicas en callos derivados de ZE; sin embargo, no se presentaron evidencia de dichas estructuras. Cabrera, Chávez, Sandoval, Litz and Cruz (2008) señalaron la presencia de elementos de conducción similares a traqueidas en callos de tres meses de edad, derivados de megagametofitos de *Dioon merolae*; no obstante, la diferenciación morfogénica después de seis meses de cultivo, no tuvo éxito. Zuñiga (2007) reportó estructuras poco organizadas en callos derivados de ZE y megagametofitos de *Zamia skinneri* Warszewicz; pero expresó que no fue posible determinar si dichas estructuras respondían a un proceso de organogénesis o embriogénesis somática. En muchos casos, cuando se induce la formación de callo para su posterior diferenciación a plántulas, esto no ocurre y no se sabe si el proceso se inició y no pudo continuar o si nunca ocurrió (Valverde, Arias y Thorpe, 1992). Por lo anterior, es notoria la necesidad de desarrollar análisis histológicos para la evidencia y comprensión de los procesos celulares que se suscitan a partir de la ES, que ayuden al establecimiento de mejores estrategias en la propagación *in vitro* de cícadas. El objetivo de la presente indagación fue analizar histológicamente el proceso de callogénesis y ES de *C. revoluta* a partir de megagametofitos, como fuente de explante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Callos amorfos de 3 meses de cultivo, derivados de megagametofitos de *C. revoluta*, fueron sometidos a ES utilizando un medio basal MS (1962), en cada una de las etapas de se emplearon distintos tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento (cuadro 10).

Cuadro 10. Tipo y concentraciones de reguladores de crecimiento empleados en el proceso de ES de *Cycas revoluta* en cada una de sus etapas.

Medio MS	Tratamiento	Reguladores de crecimiento empleados (μM)							Etapa
		BA	2,4-D	kin	Picloram	ABA	ANA	AG ₃	
Nitratos 50%	0	-	-	-	-	-	-	-	Proliferación
	1	1.33	0.45	-	-	-	-	-	
	2	4.44	1.36	-	-	-	-	-	
	3	13.32	4.52	-	-	-	-	-	
Sales 100%	0	-	-	-	-	-	-	-	
	1	-	0.45	2.32	-	-	-	-	
	2	-	2.26	4.65	-	-	-	-	
	3	-	6.79	13.94	-	-	-	-	
Sales al 50%, Nitratos al 50%	0	-	-	-	-	-	-	-	
	1	-	-	0.46	4.14	-	-	-	
	2	-	-	2.32	4.14	-	-	-	
	3	-	-	4.65	4.14	-	-	-	
Reducción del 75 y 25% la fuente de nitratos (NO ₃) y amonio (NH ₄),	0	-	-	-	-	-	-	-	Madura- ción
	1	-	-	-	-	0.38	-	-	
	2	-	-	-	-	1.13	-	-	
	3	-	-	-	-	3.78	-	-	
	4	-	-	-	-	5.67	-	-	
Sales 100%	0	-	-	-	-	-	-	-	Germinación
	1	-	-	4.65	-	-	1.61	1.44	
	2	-	-	13.93	-	-	5.37	2.88	
	3	1.33	0.45	-	-	-	-	-	
	4	4.44	1.36	-	-	-	-	-	
	5	13.32	4.53	-	-	-	-	-	

Para comprender la serie de procesos ocurridos en cada etapa del desarrollo embriogénico, se seleccionaron callos que fenotípicamente mostraban respuestas positivas en cada etapa del proceso de ES. Las muestras fueron fijadas en FAA y deshidratadas en una serie de alcoholes graduales mediante un Histokinér Leica TP 1020 de 12 estaciones, para posteriormente ser incluidas en parafina sólida. Los cortes (12-16 μm , según el tejido) se realizaron en un micrótopo de rotación American Optical 820, para después ser

seleccionados y adheridos a portaobjetos. Las secciones obtenidas fueron teñidas con safranina y verde rápido. El proceso de tinción tuvo una duración de 84 minutos, luego se montaron permanentemente con resina sintética y se dejaron secar en un horno a 45°C por 15 días. Las muestras fueron observadas a través de un Microscopio Carl Zeis, modelo Axio Scope A1, con cámara digital AxioCam ICc 5 y analizadas con el software Zen lite 2012.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis histológicos permitieron analizar los procesos celulares morfogénicos ocurridos en cada una de las etapas de ES a partir de callos amorfos derivados de megagametofitos de *C. revoluta*. El estudio permitió definir qué reguladores de crecimiento y condiciones empleadas estimularon la organización y diferenciación celular, así como la maduración y germinación de estructuras embrionarias.

Proliferación

a) Respuestas organogénicas

Los análisis histológicos demuestran que la organización celular tuvo respuestas organogénicas y embriogénicas. Algunas estructuras de tipo organogénico se generaron a partir de la combinación de 4.44 + 1.36 μM (BA + 2,4-D), y en mayor frecuencia con 2.32 + 4.14 μM (kin + picloram). Para las primeras, fue posible deducir el desarrollo de raíces coraloideas a los 170 dds, las cuales se caracterizaron por el desarrollo de células meristemáticas con crecimiento apical en dirección opuesta al medio de cultivo (figura 11). Las raíces coraloideas se originaron a partir de una estructura con células epidérmicas uniseriadas de cutícula delgada, células periféricas y parenquimáticas que, por su disposición radial, simuló la diferenciación de un tejido de caliptra (cal); y de endodermis (en), constituida por un cinturón de células compactas y una distribución discontinua de suberina; lo cual señaló que se trata de una raíz normal (no coraloide). Las raíces coraloideas se desarrollaron a partir de la zona apical de la raíz normal ya descrita; y

mostraron el desarrollo de células procambiales, epidérmicas y canales de tanino. La diferenciación celular fue tan evidente que se pudieron observar canales mucilaginosos (cm) en algunas estructuras, pelos radicales uninucleados (pr) e inclusive zonas concéntricas de diferenciación a tejidos conductores (zdc); asimismo, se identificaron células alargadas con espacios intercelulares cerca de la periferia del tejido, los cuales contenían estructuras unicelulares homogéneas distribuidas en cadenas lineales (cl) indicando la presencia del género cianobacteriano *Nostoc* dentro del tejido, este tipo de células conforman lo que podría ser la zona algal (zal), característica de este tipo de raíces. Asimismo, se observaron tejidos similares a megasporofilas, las cuales se singularizaron por el desarrollo de tricomas simples unicelulares (ts), epidermis y células parenquimáticas con grandes depósitos de amiloplastos y almidón (figura 11).

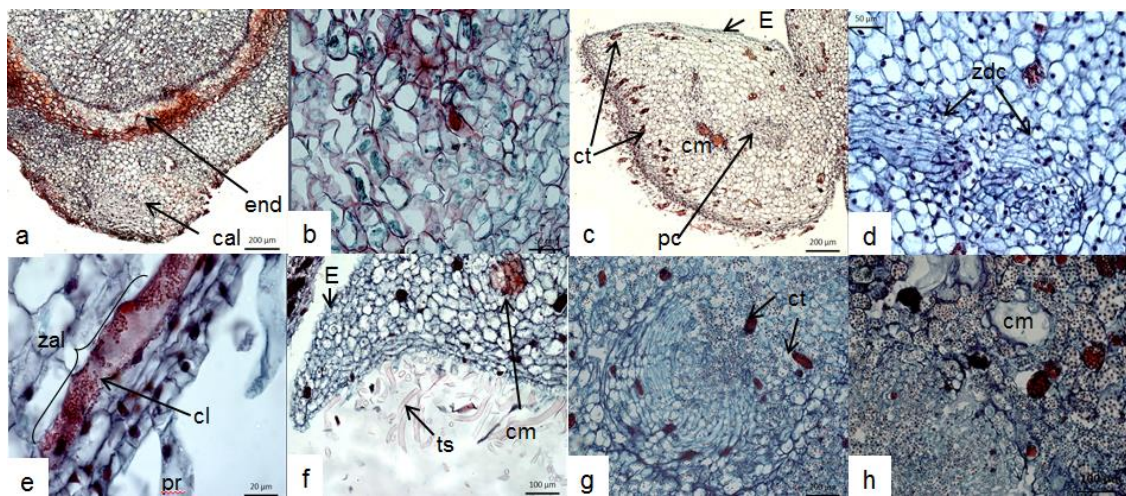


Figura 11. Tejidos diferenciados a partir de organogénesis en callos de *Cycas revoluta*; a-b) raíz normal con tejido epidérmico (E), caliptra (cal) y presencia de suberina en endodermis (en); c-e) raíz coraloide con epidermis definida (E), tejido procambial (pc), zonas de transición a tejido conductor (zdc) y zona algal (zal) con presencia de *Nostoc*; f-h) tejido similar a megasporófila con epidermis (E), tricomas simples (ts) y canales de taninos (ct) y mucilaginosos (cm) evidentes.

El desarrollo de raíces coraloideas en un tejido cultivado bajo condiciones asépticas y derivado de la dediferenciación y diferenciación a partir de megagametofitos, evidenció el hecho de que las cianobacterias *Nostoc*, son

capaces de albergarse intracelularmente, como lo menciona Nathanielsz & Staff (1975) y en la presente investigación posiblemente estimuló en el tejido calloso la diferenciación celular con tendencia a la formación de raíces coraloides para poder sobrevivir en un tejido ajeno a su hábitat.

La combinación de $2.32 + 4.14 \mu\text{M}$ (kin + picloram) estimuló a los 40 días, un excelente desarrollo de traqueidas helicoidales de hasta $290.245 \mu\text{m}$ de longitud; el desarrollo de estructuras con aspecto de embudo, que se caracterizaron por la presencia de células parenquimáticas en la parte basal y crecimiento meristemático apical de aspecto globular (mag) donde existía una correlación alta entre tamaño celular y nuclear (figura 12).

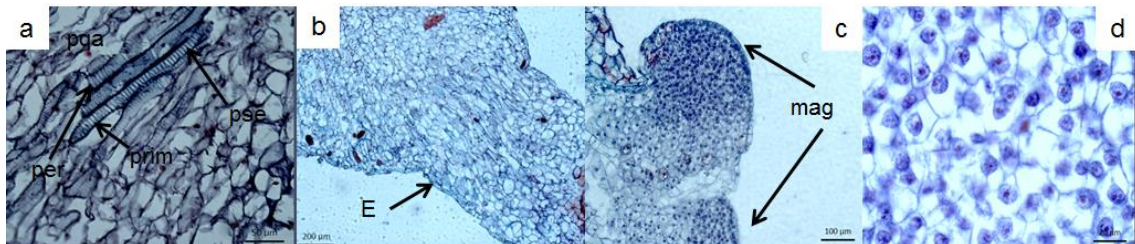


Figura 12. Respuestas organogénicas en callos de *Cycas revoluta* a partir de kin + picloram con una reducción salina del 50%. a) desarrollo de traqueidas helicoidales, en las que se identifica el parénquima axial (pqa), la placa de perforación (per), pared secundaria (pse), y pared primaria (prim); b-d) estructura en forma de embudo que muestra células parenquimáticas con grandes vacuolas y organización celular en el ápice en etapa de citocinesis.

Cabrera et al. (2008) reportaron la presencia de elementos de conducción similares a traqueidas en callos de *Dioon merolae*; sin embargo, la diferenciación del tejido no es clara; asimismo, las estructuras son relativamente pequeñas en comparación con las desarrolladas en este trabajo.

b) Respuestas embriogénicas

La formación de estructuras proembrionarias diferenciadas de tipo globular fueron visualizadas microscópicamente en los callos sometidos al menos a una combinación por medio establecido. Sin embargo, no todas tuvieron la capacidad de progresar en las etapas subsiguientes. La observación del tejido permite deducir que, la organización y maduración celular estimulada por los

reguladores de crecimiento, es la responsable del progreso del tejido en las etapas posteriores. El efecto conjunto de $6.79 + 13.94 \mu\text{M}$ (2,4-D + kin) generó estructuras globulares a partir de los 10 dds; sin embargo, éstas se caracterizaron por una friabilidad extrema, que hacía que las estructuras se batieran al contacto; y según la histología, tales condiciones se suscitaron por la carencia de tejido epidérmico en las EPE (figura 13-a), por lo que al contacto, las células se disgregaban haciendo que el tejido se batiera o simplemente se separara, lo que demuestra que aunque el medio le otorgó nutrientes a la masa callosa y los reguladores estimularon diferenciación celular, ni la combinación, ni la concentración, ni el tiempo de incubación fueron suficientes para el desarrollo de tejidos potencialmente embriogénicos. La combinación de $4.65 + 4.14 \mu\text{M}$ (kin+picloram) con la reducción salina al 50% permitió a los 40 días, el desarrollo de pequeñas estructuras globulares de aproximadamente ($305.200 \mu\text{m}^2$) con tejido epidérmico en formación, algunas células de citoplasma denso con núcleos interfásicos y otras vacuoladas no nucleadas que parecían formar una región suspensoria, se observaron zonas de acumulación celular de aproximadamente ($76.000 \mu\text{m}^2$) (figura 13-b). Cultivos de 80 días desarrollaron zonas concéntricas de mayor tamaño ($\sim 245.600 \mu\text{m}^2$) que mostraban células con núcleos profásicos y un desarrollo más evidente en el tejido epidérmico (figura 13-c); sin embargo aún estaban dentro de la masa callosa y su observación microscópica superficial aún no era posible; no obstante el callo tenía un aspecto nodular.

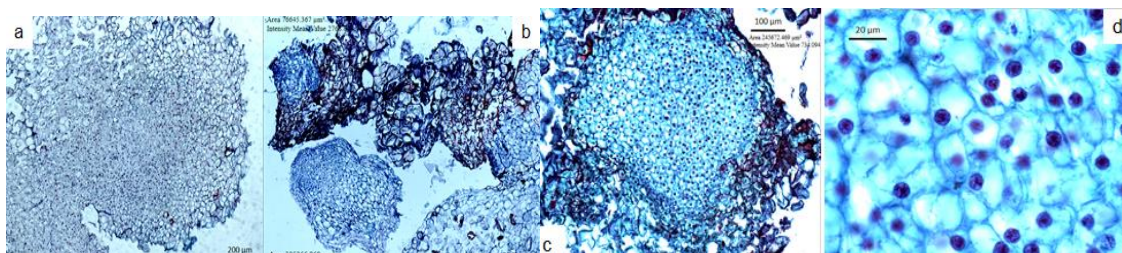


Figura 13. Respuestas embriogénicas en callos de *Cycas revoluta* generadas a partir de: a) $6.79 + 13.94 \mu\text{M}$ (2,4-D + kin), estructura pro-embriónica carente de tejido epidérmico; b-d) $4.65 + 4.14 \mu\text{M}$ (kin + picloram) reducción de sales al 50%, estructuras pro-embriónicas con tejido epidérmico en formación y células con núcleos profásicos.

A los 354 días de subcultivo, los callos mostraron agrupaciones celulares ($\sim 255.000 \mu\text{m}^2$) con tejido epidérmico más desarrollado y aunque aún dependían significativamente del tejido calloso, el análisis histológico demuestra su tendencia a la independencia (figura 14).

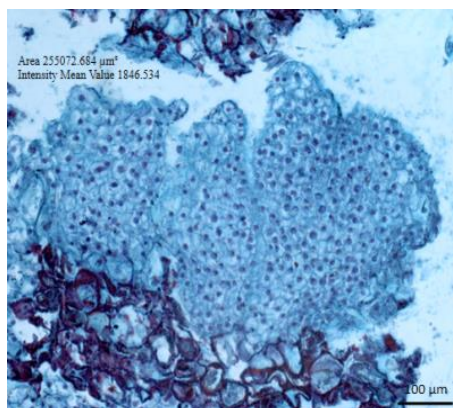
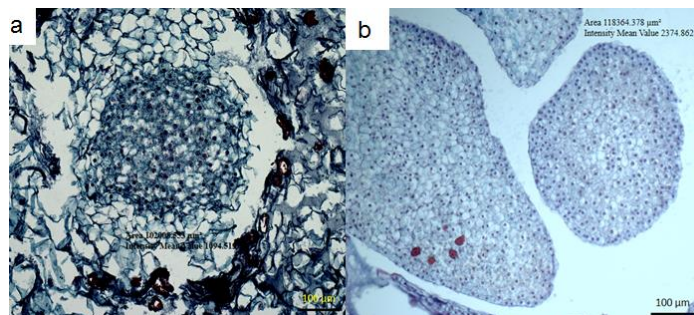


Figura 14. Tejido calloso de *Cycas revoluta* con tendencia a la independencia.

El efecto conjunto de $4.44 + 1.36 \mu\text{M}$ (BA + 2,4-D), produjo callos compactos de aspecto nodular, que expresaron un nivel de diferenciación aceptable y demostraron ser progresivos en etapas posteriores. Cultivos de 85 días manifestaron la presencia de zonas concéntricas ($\sim 102.000 \mu\text{m}^2$) caracterizadas por células pequeñas ricas en almidón, citoplasma denso, pared delgada y núcleo prominente en actividad mitótica, ubicadas mayormente cerca de la periferia de la masa callosa total, como lo reportó Bozhkov et al. (2002). Asimismo, se identificaron células parenquimáticas no nucleadas con grandes vacuolas que unían de alguna manera la estructura pro-embrionaria con la masa callosa, éstas últimas probablemente fungían como células suspensorias o con función de anclaje (figura 15-a). Cultivos de 170 días expresaron zonas concéntricas de mayor tamaño ($\sim 780.812 \mu\text{m}^2$) y algunas EPE de tamaño relativamente pequeño ($\sim 118.300 \mu\text{m}^2$) caracterizadas por células nucleadas de citoplasma denso, pared delgada, almidón, y células epidérmicas (figura 15-b).

Figura 15. Respuestas embriogénicas de callos de *Cycas revoluta* a partir de $4.44 + 1.36 \mu\text{M}$ (BA + 2,4-D) a los: a) 85 días, donde se observa la agrupación de células pequeñas y nucleadas con citoplasma denso, las cuales se distinguen de las células parenquimáticas a simple vista; b) pequeñas estructuras globulares proembrionarias con tejido epidérmico y depósitos de almidón evidente en callos de 170 dds.



A pesar de los pocos estudios de tipo histológico reportados para procesos de regeneración *in vitro* en cícadas, se logró discernir un excelente efecto a partir de BA + 2,4-D en la organización y diferenciación celular, y a diferencia de lo reportado por Zúñiga (2007), se pudieron diferenciar respuestas embriogénicas de organogénicas. Asimismo, se declaró que en cultivos *in vitro* de *C. revoluta*, un tamaño celular pequeño con núcleo relativamente grande, citoplasma denso y grandes concentraciones de almidón, son las principales características de células potencialmente embriogénicas, como lo describe Dutta-Gupta and Conger (1999) y Valverde et al. (1992) en callos de pejobaye.

Maduración

El medio empleado en esta etapa, sin la adición de reguladores de crecimiento, y presencia lumínica, permitió la expulsión de aquellas estructuras proembrionarias que se encontraban dentro de la masa callosa (figura 16). Los callos provenientes del medio MS (1962) bajo el efecto de $4.44 + 1.36 \mu\text{M}$ (BA + 2,4-D) con 170 días de cultivo, fueron capaces de generar embriones somáticos caracterizadas por una coloración rosácea e independencia a la masa callosa inicial. Las zonas concéntricas originadas en la etapa anterior fueron desarrolladas e impulsadas a la superficie callosa a través de células determinadas por su alargamiento, ausencia de núcleo y grandes vacuolas (figura 16-a, c). Los embriones somáticos derivados a partir de los procesos celulares ya mencionados, tuvieron un área de $\sim 51.911 \mu\text{m}^2$ dentro de los

primeros 20 días después del subcultivo, y a diferencia de las EPE suscitadas en proliferación, éstas carecían de almidón. Los embriones expresaron células grandes vacuoladas no nucleadas, en el centro del tejido; sin embargo, en la periferia se encontraron células nucleadas de tamaño relativamente pequeño con tendencia a la formación de tejido meristemático (división periclinal), lo que indica el inicio de la bipolaridad embrionaria (figura16-d).

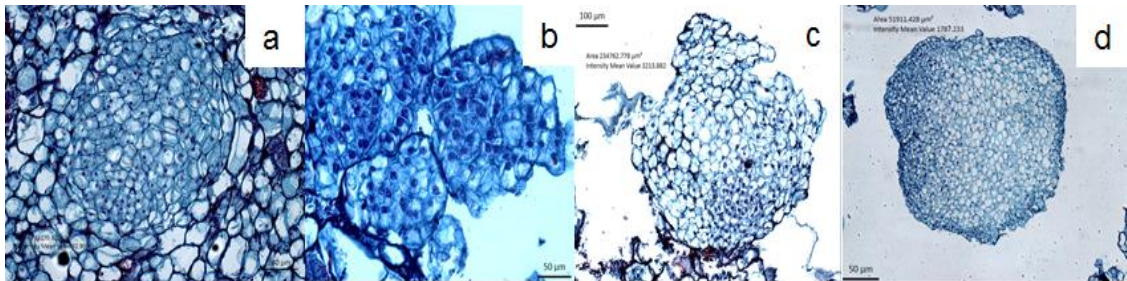


Figura 16. El medio de maduración carente de reguladores de crecimiento permitió en callos de *Cycas revoluta*: a) el desarrollo y b) la expulsión de las agrupaciones celulares internas de los callos potencialmente embriogénicos; c) estructura embrionaria globular con el tejido epidérmico en desarrollo, se encuentra aún unida al tejido calloso madre por células suspensorias; d) embrión somático globular independiente con división periclinal.

La apariencia de los embriones somáticos jóvenes obtenidos en etapa de maduración, se asemejan a lo descrito por Pinto et al. (2002), y Capelo et al. (2010), quienes señalaron que los embriones somáticos globulares de *Quercus suber* y olivo, respectivamente, poseían células centrales relativamente vacuoladas, mientras que en el exterior las células mostraron una alta actividad mitótica asociada al desarrollo polar de tal embrión.

Embriones con una longitud superior a ~5 mm (>140 días), aún en medio de maduración, adquirieron la capacidad de elongarse e inclusive enrollarse, y comenzaron a diferenciar células procambiales, tejidos de conducción, zonas meristemáticas axilares, y por supuesto, apicales. Cultivos de 150 días demostraron la presencia de tejidos similares a los de raíz normal como epidemis, caliptra y endodermis (y ausencia de pelos radicales); asimismo, se identificó el desarrollo de tricomas en zonas meristemáticas axilares de ~54.500 μm^2 , estas últimas generaron en ocasiones pequeñas estructuras globulares de

~142.000 μm^2 caracterizadas por células pequeñas, citoplasma denso, núcleo prominente y actividad mitótica notoria (figura 17).

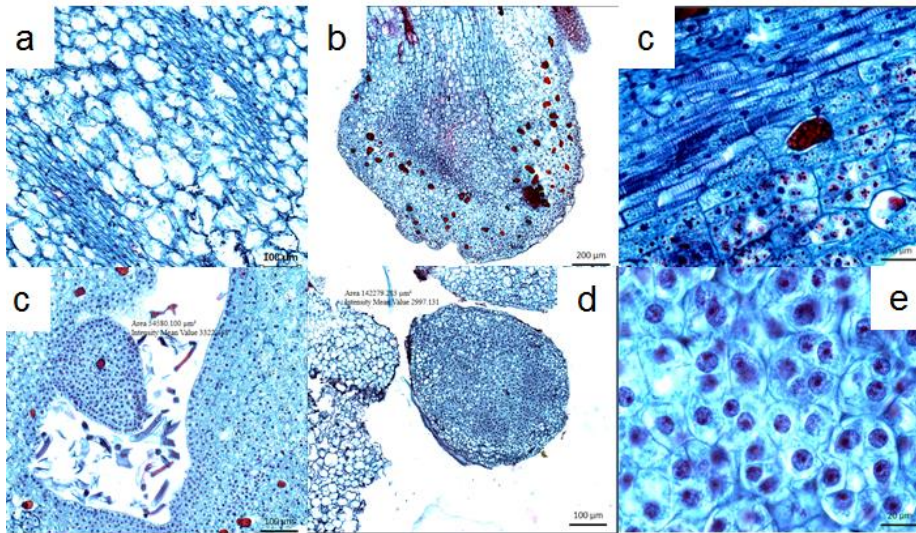


Figura 17. Estructuras embrionarias de *Cycas revoluta* de más de 130 días en medio carente de reguladores de crecimiento, expresaron: a) células procambiales; b) tejidos similares a raíces normales; c) tejidos de conducción; d) crecimiento meristemático axilar; y d-e) producción de estructuras globulares con alto nivel de almidón y actividad mitótica notoria.

Germinación

Las mejores respuestas asociadas al desarrollo y germinación de embriones somáticos, fueron obtenidas bajo el efecto de $4.44 \pm 1.35 \mu\text{M}$ (BA + 2,4-D), dicha combinación permitió un alargamiento embrional de ~5 mm (40 dds) y desencadenó una serie de procesos de diferenciación celular como la formación de traqueidas. Asimismo, indujo el desarrollo meristemático apical dividido, lo que sugiere la formación de estructuras precotiledonarias. La diferenciación celular especializada en el desarrollo meristemático apical, radical o en su defecto tejido suspensorio fue evidente en esta etapa (figura 18). Tal tejido suspensorio coincide con lo reportado por Chasan (1992), quien señaló que junto a las células embriogénicas existen otras alargadas, vacuoladas y carentes de potencial embriogénico que sinergizan el proceso embriogénico.

La carencia de almidón en el tejido y el desarrollo de zonas de crecimiento meristemático apical y radical; así como el desarrollo de células con división activa en la zona meristemática embrional coincide con lo señalado por Chávez,

Litz and Márquez (1995) en cultivos embriogénicos de *C. mexicana*. El desarrollo de tejido vascular en algunos embriones somáticos coincide con lo reportado por Conde et al. (2004) en cultivos embriogénicos de *Ulmus minor*.

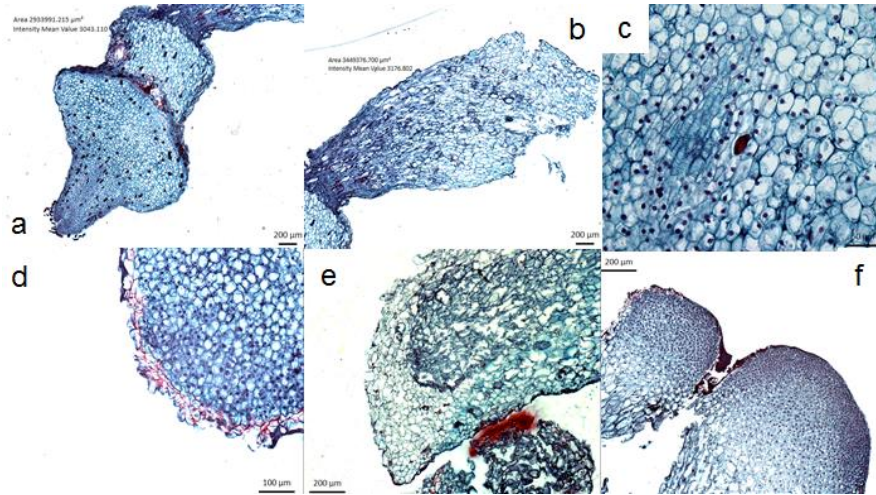


Figura 18. Respuestas asociadas al desarrollo y germinación de embriones somáticos de *Cycas revoluta* a partir de $4.44 + 1.35 \mu\text{M}$ (BA + 2,4-D); a) tejido embrionario con crecimiento meristemático apical dividido; b) tejido suspensorio de ~3mm de longitud caracterizado por células relativamente grandes, vacuoladas, carentes de nucleo; c) formación de traqueidas y canal de taninos; d) crecimiento meristemático apical; e) tejido endodérmico, células especializadas comienzan a definirse (50 dds); y f) embriones somáticos con tejido suspensor.

El desarrollo de embriones somáticos de *C. revoluta*, según los resultados obtenidos, se asemeja al desarrollo embrionario de ZE descrito por Chamberlain (1935). Los cortes histológicos realizados en cada una de las etapas de ES, demostraron que los reguladores de crecimiento empleados desencadenaron procesos celulares asociados a la obtención, maduración y germinación de embriones somáticos; y que a diferencia de Rinaldy and Leva (1995), De Luca and Sabato (1980) y De Luca et al. (1979) pudo evidenciarse anatómicamente la existencia de tales estructuras.

CONCLUSIONES

Callos amorfos de *C. revoluta* exhibieron distintos grados de organización celular en función de las sales inorgánicas, y principalmente, de los reguladores de crecimiento empleados.

Las agrupaciones celulares dentro de la masa callosa, caracterizadas por células pequeñas de citoplasma denso y núcleo prominente, son indispensables en la formación de embriones somáticos.

Embriones somáticos jóvenes de tipo globular, desarrollo en la periferia células nucleadas de tamaño relativamente pequeño con división periclinal.

El desarrollo de zonas de crecimiento meristemático apical, tejidos de conducción y células endodérmicas en la etapa de germinación, son indicativos del desarrollo celular asociado a germinación en un embrión somático.

La maduración del tejido en cada una de las etapas influye de manera significativa en las respuestas celulares óptimas del callo en su proceso de formación a plántula.

AGRADECIMIENTOS

La primera autora agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca asignada (736230/595557) durante el trayecto de formación académica en el programa “Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola”, así como al Ing. Mario Iván Venegas Ayala, técnico del Laboratorio de Histología y Citología General de Preparatoria Agrícola perteneciente a la UACH por la orientación técnica y aporte significativo a la presente investigación.

LITERATURA CITADA

- Ashmore, S.E. (1997). *Statue report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetics resources*. International Plant Genetics Resources Institute: Rome.
- Cabrera, H.S.L., Chávez, A.V.M., Sandoval, Z.E., Litz, R.E., y Cruz, S.F. (2008). Morfogénesis *in vitro* de *Dioon merolae* De Luca, Sabato & Vázquez-Torres (Zamiaceae, Cycadales) a partir de megagametofitos y embriones cigóticos. *Interciencia*, 33(12), 929-933.
- Capelo, A.M., Silva, S., Brito, G., and Santos, C. (2010). Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 103, 237-242. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11240-010-9773-x.pdf>.
- Chamberlain, C. J. (1935). Gymnosperms: Structure and Evolution. *Botanical Gazette*, 97(1), 397-484.
- Chávez, V.M., Litz, R.E., and Marquez, J. (1995). Histology of somatic embryogenesis of the cycad *Ceratozamia mexicana* var. Robusta (Miq.) Dyer. *Plant Science*, 108(2), 191-200. Recuperado de https://ac.els-cdn.com/016894529504132E/1-s2.0-016894529504132E-main.pdf?_tid=05933e8e-dc7f-11e7-bc29-00000aab0f6b&acdnat=1512782557_6dd4bc5e646a2a4f029f1e3a02b61799.
- Crane, P.R., and Upchurch, G.R.M. (1987). *Drewria potomacensis* gen. et sp. nov., an early Cretaceous member of the Gnetales from the Potomac Group of Virginia. *American Journal of Botany*, 74(11), 1722-1736. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/2444143.pdf>.
- De Luca, P., and Sabato, S. (1980). Regeneration of coralloid roots on cycad megagametophytes. *Plant Science Letters*, 18(1), 27-31. Doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(80\)90017-6](https://doi.org/10.1016/0304-4211(80)90017-6).
- Gilbert, S. (1984). *Cycads: statues, trade, exploitation and protection 1977-1982*. Washington, USA: TRAFFIC (USA).
- Jones, D. L. (1993). *Cycads of the World*. London, Inglaterra: Reed Book.
- Kono, M., and Tobe, H. (2007). Is *Cycas revoluta* (Cycadaceae) wind-or insect-pollinated?. *American Journal of Botany*, 94(5), 847-55. Doi: 10.3732/ajb.94.5.847.
- La Rue, C.D. (1954). Studies on growth and regeneration in gametophytes and sporophytes of gymnosperms. *Brookhaven Symposia in Biology*, 6, 187-208.

- Ling, P.K.A., Thing, Y.S., Gansau, J.A., and Hussein, S. (2008). Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revoluta*. *African Journal Biotechnology*, 7(23), 4279-4284. Recuperado de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59564/47855>.
- Litz, R. E., Chávez, V.M., and Moon, P.A. (1995). *Somatic embryogenesis in the Cycadales*. Doi: 10.1007/978-94-011-0960-4_1.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497. Recuperado de http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Skoog1962.pdf.
- Motohashi, T., Toda, M., and Kondo, K. (2008). Adventitious embryo formation derived from zygotic embryos in *Cycas revoluta*. *Plant Biotechnology*, 25(6), 589-591. Doi: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.25.589>.
- Pan, S., Neeraj, A., Srivastava, K.S., Kishore, P., and Sarethy, I.P. (2013). Effects of growth regulators on in vitro response and multiple shoot induction in some endangered medicinal plants. *OA Biotechnology*, 2(1), 3. Recuperado de <http://www.oapublishinglondon.com/article/428>.
- Pinto, G., Valentim, H., Costa, A., Castro, S., and Santos, C. (2002). Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. tree. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 38(6), 359-572. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/41318710.pdf>.
- Rinaldi, L.M.R., and Leva, A.R. (1995). *In vitro* organogénesis from diploid tissues of *Cycas revoluta* Thunb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43(1), 37-41. Doi: 10.1007/BF00042669.
- Robinson, M.L. (2010). *Cycads in Southern Nevada*. Recuperado de <https://www.unce.unr.edu/publications/files/ho/2010/cm1004.pdf>.
- Teixeira da Silva, J. A., Woondenberg, W. R., and Songjun, Z. (2014). Cycads in vitro. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 24(2), 287-301. Doi: <http://dx.doi.org/10.3329/ptcb.v24i2.23562>.
- Valverde, R., Arias, O., y Thorpe, T. (1992). Estudio histológico en callos de pejobaye (*Guilielma gasipaes*). *Agronomía Costarricense*, 16(2), 225-229. Recuperado de http://www.mag.go.cr/rev_agr/v16n02_225.pdf.
- Webb, D.T., Nevarez, M., and De Jesús, S. (1984). Further *in vitro* studies of light-induced root nodulation in the Cycadales. *Environmental and Experimental Botany*, 24(1), 37-44. Doi: [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(84\)90058-3](https://doi.org/10.1016/0098-8472(84)90058-3).

Zúñiga, P. T. (2007). Estudio morfogénico de *Zamia skinneri* Warszewicz, empleando megagametófitos y embriones zigóticos. *Tecnología en Marcha*, 20(2), 58-70. Recuperado de http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/44/43.

LITERATURA CITADA

- Abohatem, M., Zouine, J., and El Hadrami, I. (2011). Low concentrations of BAP and high rate of subcultures improve the establishment and multiplication of somatic embryos in date palm suspension cultures by limiting oxidative browning associated with high levels of total phenols and peroxidase activities. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 344-348. Recuperado de https://ac.els-cdn.com/S0304423811003499/1-s2.0-S0304423811003499-main.pdf?_tid=9f8c95e0-dc74-11e7-89f5-00000aach360&acdnat=1512778091_8715ccf8b49d6e40323216c4f660355f.
- Ara, H., Jaiswal, U., and Jaiswal, V.S. (2000). Synthetic seed: prospects and limitations. *Current Science*, 78(12), 1438-1444. Recuperado de <https://www.iisc.ernet.in/currsci/jun252000/REVIEW%20ARTICLE.pdf>.
- Ara, H., Jaiswal, U., and Jaiswal, V.S. (1999). Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (*Mangifera indica* L.). *Plant Cell Reports*, 19(2), 166-170. Doi: <https://doi.org/10.1007/s002990050728>.
- Ashmore, S.E. (1997). *Statue report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetics resources*. Rome, Italy: International Plant Genetics Resources Institute.
- Asemota, O., Eke, C.R., and Odewale, J.O. (2007). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. *African Journal Biotechnology*, 6(20), 2353-2357. Recuperado de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/58045/46410>.
- Badawy, E.M., Habib, A.M., El-bana, A., and Yosry, G.M. (2005). Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera*) plants by using tissue culture technique. *Arabian Journal of Biotechnology*, 8, 343-354.
- Beaton, J.M. (1982). Fire and water: aspects of Australian aboriginal management of cycads. *Archaeology in Oceania*, 17(1), 51-58. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/40386579.pdf>.
- Beck, W. (1992). Aboriginal preparation of *Cycas* seeds in Australia. *Economic Botany*, 46(2), 133-147. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/4255419.pdf>.
- Benelli C., Fabbri A., Grassi S., Lambardi M., and Rugini. E. (2001). Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*Olea europaea* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76(1), 112-119. Doi: <https://doi.org/10.1080/14620316.2001.11511336>.

- Bozhkov, P.V., Filonova, L.H., and Von Arnold, S. (2002). A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(6), 658-667.
- Brashier, C. K. (1968). Vascularization of cycad leaflets. *Phytomorphology*, 18, 35-43.
- Brenner, E.D., Stevenson, D.W., and Twigg, R.W. (2003). Cycads: evolutionary innovations and the role of plant derived neurotoxins. *Trends in Plant Science*, 8(9), 446-452. Recuperado de https://ac.els-cdn.com/S1360138503001900/1-s2.0-S1360138503001900-main.pdf?_tid=f046e5b8-dc78-11e7-9717-00000aacb360&acdnat=1512779944_b30349af0afa51caa7148621744b1bb9.
- Cabrera, H.S.L., Chávez, A.V.M., Sandoval, Z.E., Litz, R.E., y Cruz, S.F. (2008). Morfogénesis *in vitro* de *Dioon merolae* De Luca, Sabato & Vázquez-Torres (Zamiaceae, Cycadales) a partir de megagametofitos y embriones cigóticos. *Interciencia*, 33(12), 929-933.
- Capelo, A.M., Silva, S., Brito, G., and Santos, C. (2010). Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 103, 237-242. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11240-010-9773-x.pdf>.
- Cardoza, V. (2008). *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications*. Doi: 10.1002/9780470282014.ch5.
- Cangahuala-Inocente, G.C., Steiner, N., Maldonado, S.B., and Guerra, M.P. (2009). Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acacia sellowiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(3), 217-224.
- Chamberlain, C. J. (1912). Morphology of *Ceratozamia*. *Botanical Gazette*, 53(1), 1-19. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/2467364.pdf>.
- Chamberlain, C. J. (1935). Gymnosperms: Structure and Evolution. *Botanical Gazette*, 97(1), 397-484.
- Chardhuri, H. & Akhtar, A. R. (1931). The corallike roots of *Cycas revoluta*, *Cycas circinalis* and *Zamia floridiana* and the algae inhabiting them. *Journal of the Indian Botanical Society*, 10, 43-59.
- Chasan, R. (1992). Developing somatic embryos. *The Plant Cell*, 4, 367-368.
- Chávez, V. M., Litz, R.E., and Norstog, K. (1992a). Somatic embryogenesis and organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila*. *Plant Cell*

- Tissue and Organ Culture*, 30(2), 99–105. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00034302.pdf>.
- Chávez, V. M., Litz, R.E., Moon, P.A., and Norstog, K. (1992b). Somatic embryogenesis from leaf callus of a mature gymnosperm *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Cycadales). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 28(2), 59–63. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF02823019.pdf>.
- Chávez, V. M., Litz, R. E., and Norstog, K. (1992c). *In vitro* morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 30, 93–98. Doi: 10.1007/BF00034301.
- Chávez, V.M., Litz, R.E., and Marquez, J. (1995). Histology of somatic embryogenesis of the cycad *Ceratozamia mexicana* var. *Robusta* (Miq.) Dyer. *Plant Science*, 108(2), 191-200. Recuperado de https://ac.els-cdn.com/016894529504132E/1-s2.0-016894529504132E-main.pdf?_tid=05933e8e-dc7f-11e7-bc29-00000aabb0f6b&acdnat=1512782557_6dd4bc5e646a2a4f029f1e3a02b61799.
- Chávez, V.M., Litz, R.E., Monroy, M., Moon, P.A., and Vovides, A.M. (1998). Regeneration of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature phase trees. *Plant Cell Reports*, 17(8), 612-616. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs002990050452.pdf>.
- Chitra, D.B. & Narmathabai, V. (2011). Somatic embryogenesis in the medicinal legume *Desmodium* (Houtt.) Merr. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 106(3), 409-418. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11240-011-9937-3.pdf>.
- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES). (2017). Consultado el 23-06-2017 en <https://cites.org/eng/app/appendices.php>.
- Conde, P., Loureiro, J., and Santos, C. (2004). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. *Plant Cell Reports*, 22(9), 632-639. Doi: 10.1007/s00299-003-0735-1.
- Cooke, T.J., Poli, D., Sztein, A.E., and Cohen, J.D. (2002). Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Molecular Biology*, 49(3-4), 319-338. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1015242627321.pdf>.

- Crane, P.R., and Upchurch, G.R.M. (1987). *Drewria potomacensis* gen. et sp. nov., an early Cretaceous member of the Gnetales from the Potomac Group of Virginia. *American Journal of Botany*, 74(11), 1722–1736. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/2444143.pdf>.
- Davey, M.R., and Antony, P. (2010). *Plant Cell Culture: Essential Methods*. Doi: 10.1002/9780470686522.
- Dehgan, B., and Dehgan, N. B. (1988). Comparative pollen morphology and taxonomic affinities in Cycadales. *American Journal of Botany*, 75(10), 1501-1516. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/2444700.pdf>.
- Dehgan, B. (1999). Propagation and culture of cycads: A practical approach. *Acta Horticulturae*, 486, 123–131. Doi: 10.17660/ActaHortic.1999.486.16.
- De Luca, P., Moretti, A., and Sabato, S. (1979). Regeneration in megagametophytes of cycads. *Giornale Botánico Italiano* 113(3), 129-143.
- De Luca, P., and Sabato, S. (1980). Regeneration of coralloid roots on cycad megagametophytes. *Plant Science Letters*, 18(1), 27-31. Doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(80\)90017-6](https://doi.org/10.1016/0304-4211(80)90017-6).
- De Jong, A.J., Schmidt, E.D.L., and de Vries, S.C. (1993). Early events in higher plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 22, 367-377. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00014943.pdf>.
- Desamero, N.V., Rhodes, B.B., Decoteau, D. R., and Bridges, W.C. (1994). Picolinic acid-induced direct somatic embryogenesis in sweet potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37(2), 103-111. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00043603.pdf>.
- Dhillon, N.K., and Gosal, S. S. (2013). Histology of somatic embryos from maize embryo cultures. *Journal of Cell and Tissue Research*, 13(1), 3571-3576.
- Dhote, P. (2017). *Cycas: Distribution, Morphology and Reproduction Cycadales. Biology discussion*. Recuperado de <http://www.biologydiscussion.com/gymnosperm/cycas-distribution-morphology-and-reproduction-cycadales/22280>.
- Duke, J. A. (2000). *Handbook of nuts: Herbal Reference Library*. Recuperado de https://books.google.com.mx/books?id=Va3ED4zwXGIC&pg=PA133&lpg=PA133&dq=Handbook+of+nuts:+Herbal+Reference+Library.+Cycas&source=bl&ots=jF8885sl_K&sig=ITCjK6MwboQO69bBmYYLn-Jh3lQ&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwimis-X6PvXAhUH7oMKHVe2B3EQ6AEIMDAB#v=onepage&q=Handbook%20of%20nuts%3A%20Herbal%20Reference%20Library.%20Cycas&f=false.

- Dutta-Gupta, S., and Conger, B.V. (1999). Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of switchgrass. *Crop Science*, 39, 243-247. Doi: 10.2135/cropsci1999.0011183X003900010037x.
- Dyer, R.A. (1965). The cycads of southern Africa. *Borhalia*, 8, 405- 515. Doi: 10.4102/abc.v8i4.1636.
- Eke, C.R., Akomeah, P., and Asemota, O. (2005). Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'Zebia' and 'Loko' landraces. *African Journal of Biotechnology*, 4(3), 244-246. Recuperado de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.517.6449&rep=rep1&type=pdf>.
- Escalant, J.V., and Teissont, C. (1989). Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Reports*, 7(8), 665-668. Doi: 10.1007/BF00272056.
- Eshraghi, P., Zarghami, R., and Mirabdulbaghi, M. (2005). Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. *African Journal of Biotechnology*, 4(11), 1309-1312. Recuperado de http://www.academicjournals.org/article/article1380119896_Eshraghi%20et%20al.pdf.
- Fernández, G.B. (1997). *Embriogénesis somática en alcornoque (Quercus suber L.)*. (Tesis Doctoral). Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, España.
- Fernandez, S., Michaux-Ferreire, N., and Coumans, M. (1999). The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): histology and improvement by AgNO₃. *Plant Growth Regulation*, 28(3), 147-155. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1006142504577.pdf>.
- Fernando, S.C., and Gamage, C.K.A. (2000). Absciscic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Science*, 151(2), 193-198. Doi: 10.1016/S0168-9452(99)00218-6.
- Filonova, L.H., Bozhkov, P.V., Brukhin, V.B., Daniel, G., Zhivotovsky, B., and Von Arnold, S. (2000). Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science*, 113, 4399-4411. Recuperado de <http://jcs.biologists.org/content/joces/113/24/4399.full.pdf>.

- Finstad, K., Brown, D.C., and Joy, K. (1993). Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34(2), 125-132. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F00036092.pdf>.
- Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N., and Rival, A. (2003). An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., Deglet Nour. *Plant Cell Reports* 21(6), 517-524. Doi: 10.1007/s00299-002-0558-5.
- Fransz, P.F., and Schel, J.H.N. (1991). Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). *Canadian Journal of Botany*, 69(1), 26-33. Doi: <https://doi.org/10.1139/b91-005>.
- Freire, S.M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4), 195 – 209.
- Gallego, N. P. (2013). *Embriogénesis somática y regeneración de plantas de Medicago arborea* L.; valoración como forrajeras. (Tesis doctoral). Universidad de Salamanca, España.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. (1968). Plant cell cultures, I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158.
- Gifford, E.M., and Foster, A.S. (1974). *Morphology and evolution of vascular plants*. Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/137663144/Ernest-Gifford-Foster-Morphology-and-Evolution-of-Vascular-Plants-From-Bookos-org>.
- Gilbert, S. (1984). *Cycads: statues, trade, exploitation and protection 1977-1982*. Washington, USA: TRAFFIC (USA).
- Gisbert, C., Fita, A., and Diez, M.J. (2008). *Prácticas de cultivo in vitro y transformación genética de plantas*. Madrid, España: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALÈNCIA.
- Gorbatenko, O., and Hakman, I. (2001). Desiccation-tolerant somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regeneration into plantlets. *International Journal of Plant Sciences*, 162(6), 1211-1218.
- Gray, D.J., Purohit, A., and Trigiano, R.N. (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. *Critical Reviews in Plant Science*, 10(1), 33-61. Doi: <https://doi.org/10.1080/07352689109382306>.

- Gueye, B., Morcillo, F., Collin, M., Gargani, D., Overvoorde, P., Aberlenc-Bertossi, F., Tranbarger, T. J., Sane, D., Tregear, J. W., Borgel, A. & Verdeil, J.L. (2009). Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99, 35-45.
- Guevin, T. G., and Kirby, E.G. (1997). Induction of embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies fraseri* (Pursh) Poir. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 49(3), 219-222. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1005747026269.pdf>.
- Halperin W., and Jensen W.A. (1967). Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *Journal of Ultrastructure Research*, 18(3-4), 428-443. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(67\)80128-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(67)80128-X).
- Hiraga, S., Minakawa, H., Takahashi, K., Takahashi, R., Hajika, M., Harada, K., and Ohtsubo, N. (2007). Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of *Japanese soybean* cultivars. *Plant Biotechnology*, 24(4), 435-440. Doi: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.435>.
- Jager, A. K., and van Staden, J. (1996a). Somatic embryogenesis and organogenesis in *Encephalartos dyerianus* and *Encephalartos natalensis*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 45, 99-102. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00048750.pdf>.
- Jager, A. K., and van Staden, J. (1996b). Somatic embryogenesis in *Encephalartos cycadifolius*. *Plant Cell Reports*, 15(6), 437-440. Doi: 10.1007/BF00232071.
- Jiménez, V.M., and Bangerth, F. (2001). Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Plant Physiology*, 111(3), 389-395. Doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110317.x.
- Jiménez, V.M. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(2), 196-223. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-31312001000200008>.
- Jones, D. L. (1993). *Cycads of the World*. London, Inglaterra: Reed Book.
- Kikuchi, A., Satoh, S., Nakamura, N., and Fujii, T. (1995). Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non-embryogenic calli. *Plant Cell Reports*, 14(5), 279-284. Doi: 10.1007/BF00232028.

- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Higashi, K., Satoh, S., Kamada, H., and Harada, H. (1992). Isolation and characterization of cDNA that encodes ECP31, an embryogenic-cell protein from carrot. *Plant Molecular Biology*, 19(2), 239-249. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F00027345.pdf>.
- Klimaszewzka K., and Cyr D.R., (2002). Conifer somatic embryogenesis: I. Development. *Dendrobiology* 48, 31-39.
- Kobayashi, T., Higashi, K., Saitou, T., and Kamada, H. (1999). Physiological properties of inhibitory conditioning factor(s), inhibitory to somatic embryogenesis, in high-density cell cultures of carrot. *Plant Science*, 144(2), 69-75. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00062-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00062-X).
- Komamine, A., Kawahara, R., Matsumoto, M., Sunabori, S., Toya, T., Fujiwara, A., Tsukahara, M., Smith, J., Ito, M., Fukuda, H., Nomura, K., and Fujimura, T. (1992). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 28(1), 11-14. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F002632185.pdf>.
- Kono, M., and Tobe, H. (2007). Is *Cycas revoluta* (Cycadaceae) wind-or insect-pollinated?. *American Journal of Botany*, 94(5), 847-55. Doi: 10.3732/ajb.94.5.847.
- Konieczny, R., Pilarska, M., Tuleja, M., Salaj, T., and Ilnicki, T. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryos of *Trifolium nigrescens* (Viv.). *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 100, 123-130. Doi: 10.1007/s11240-009-9625-8.
- Korbes, A.P., and Droste, A. (2005). Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversión. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 40(3), 211-216. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005000300003>.
- Kowalska, M.T., Itzhak, Y., and Puett, D. (1995). Presence of aromatase inhibitors in cycads. *Journal Ethnopharmacology*, 47(3), 113-116. Recuperado de https://ac.els-cdn.com/037887419501259G/1-s2.0-037887419501259G-main.pdf?_tid=fa2db0b0-dc8d-11e7-95ae-00000aab0f02&acdnat=1512788980_a1c2833a46b163beb09fe5e6e7f6710e.
- Kvaalen, H., and Ernstsén, A. (1993). Oxygen influences benzyladenine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid levels in cultured embryogenic tissue of Norway spruce. *Plant Physiology*, 88(4), 571-576. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1993.tb01373.x.

- La Rue, C.D. (1954). Studies on growth and regeneration in gametophytes and sporophytes of gymnosperms. *Brookhaven Symposia in Biology*, 6, 187-208.
- Lee, E.K., Cho, D.Y., and Soh, W.Y. (2001). Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. *Plant Cell Reports*, 20(5), 408-415. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs002990100338.pdf>.
- Lelu, M.A., Bastien, C., Drugeault, G., Gouez, M.L., and Klimaszewska, K. (1999). Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with or without growth regulators. *Plant Physiology*, 105, 719-728. Doi: 10.1034/j.1399-3054.1999.105417.x.
- Ling, P.K.A., Thing, Y.S., Gansau, J.A., and Hussein, S. (2008). Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revoluta*. *African Journal Biotechnology*, 7(23), 4279-4284. Recuperado de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59564/47855>.
- Litz, R. E., Chávez, V.M., and Moon, P.A. (1995a). *Somatic embryogenesis in the Cycadales*. Doi: 10.1007/978-94-011-0960-4_1.
- Litz, R. E., Moon, P.A., and Chávez, V.M. (1995b). Somatic embryogenesis from leaves of mature *Ceratozamia hildae* (Gymnospermae, Cycadales). *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 40(1), 25-31. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fb00041114.pdf>.
- Litz, R.E., Moon, P.A., Benson, E.M., Stewart, J., and Chávez, V.M. (2004). A Biotechnology Strategy for Medium- and Long-Term Conservation of Cycads. *The Botanical Review*, 70(1), 39-46. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/27571173.pdf>.
- Litz, R.E., Moon, P.A., and Chávez, V.M. (2005). Somatic embryogenesis and regeneration of endangered cycad species. *Acta Horticulturae*, 692, 75-79. Doi: 10.17660/ActaHortic.2005.692.8.
- Liu, M. (1993). Factors affecting induction, somatic embryogenesis and plant regeneration of callus from cultured immature inflorescences of sugarcane. *Journal of Plant Physiology*, 141(6), 714-720. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81580-4](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81580-4).
- Mandal, A.K.A., Gupta, S.D., and Chatterji, A.K. (2001). Factors affecting somatic embryogenesis from cotyledonary explants of sunflower. *Biologia Plantarum*, 44(4), 503-507. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1013722116224.pdf>.

- Mandal, S.M., Migliolo, L., Das, S., Mandal, M., Franco, O.L., and Hazra, T.K. (2012). Identification and Characterization of a Bactericidal Proapoptotic Peptide From *Cycas revoluta* Seeds with DNA Binding Properties. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(1), 184–193. Doi: 10.1002/jcb.23343.
- Martínez-Ruíz, R., Azpiroz-Rivero, H.S., Rodríguez de la O, J.L., Cetina-Alcalá, V.M., y Gutierrez-Espinoza, M.A. (2014). Embriogénesis somática de *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden y *Eucalyptus urophylla* s. t. blake. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 10(2), 83-92.
- Mathur, J., and Koncz, C. (2005). *Callus and culture regeneration. Methods in molecular biology. Arabidopsis Protocols*. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1385%2F0896033910.pdf>.
- Melagrejo, M. J. E. (2017). *Cycas: breve historia*. Recuperado de <http://cycas.rocks/>.
- Merkle, S.A., (1990). *Maturation of yellow-poplar somatic embryos*. Woody Plant Biotechnology. New York: Plenum Press.
- Moawad, A., Hetta, M., Zjawiony, J.K., Jacob, M.J., Hifnawy, M., and Ferreira, D. (2013). Phytochemical Investigation of *Cycas circinalis* and *Cycas revoluta* Leaflets: Moderately Active Antibacterial Biflavonoids. *Planta Medica*, 76(8): 796–802. Doi: 10.1055/s-0029-1240743.
- Molina, D.M., Aponte, M.E., Cortina, H., and Moreno, G. (2002). The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71(2), 117-123. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1019965621041.pdf>.
- Montero, C.M., Sáenz, L, Córdova, I., Quiroz, A., Verdeil, J.- L., and Oropeza, C. (2010). GA₃ stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Cell Reports*, 29(9), 1049-1059. Doi: 10.1007/s00299-010-0890-0.
- Motohashi, T., Toda, M., and Kondo, K. (2008). Adventitious embryo formation derived from zygotic embryos in *Cycas revoluta*. *Plant Biotechnology*, 25(6), 589-591. Doi: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.25.589>.
- Mourya, M. K., Prakash, A., Swami, A., Singh, G. K., and Malthur, A. (2011). Leaves of *Cycas revoluta*: potent antimicrobial and antioxidant agent. *World Journal of Science and Technology*, 1(10), 11-20. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Dr_Abhishek_Mathur/publication/230635564_LEAVES_OF_CYCAS_REVOLUTA_POTENT_ANTIMICROBIAL_AND_ANTIOXIDANT_AGENT/links/09e415023d94bd2fdd000000.pdf.

- Motohashi, T., Toda, M., and Kondo, K. (2008) Adventitious embryo formation derived from zygotic embryos in *Cycas revoluta*. *Plant Biotechnology*, 25(6), 589-591. Doi: 10.5511/plantbiotechnology.25.589.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497. Recuperado de http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Skoog1962.pdf.
- Nathanielsz, C.P., and Staff, I.A. (1975). On the Occurrence of Intracellular Bluegreen Algae in Cortical Cells of the Apogeotropic Roots of *Macrozamia communis* L. Johnson. *Annals of Botany*, 39(160), 363-368. Recuperado de <http://www.jstor.org/stable/42753353>.
- Norstog, K. (1987). Cycads and the Origin of Insect Pollination. *American Scientist*, 75(3), 270-279.
- Norstog, K.J., and Fawcett, P.K.S. (1989). Insect–cycad symbiosis and its relation to the pollination of *Zamia furfuracea* (Zamiaceae) by *Rhopalotria mollis* (Curculionidae). *American Journal of Botany*, 76(9), 1380–1394. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/2444562.pdf>.
- Norstog, K.J., and Nichols, T.J. (Comstock Pub Assoc). (1997). *The biology of the cycads*. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Norstog, K., and Rhamstine, E. (1967). Isolation and culture of haploid and diploid cycad tissues. *Phytomorphology* 17: 374-381
- Othmani, A., Bayouh, C., Drira, N., Marrakchi, M., and Trifi, M. (2009). Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97(1), 71-79. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11240-009-9500-7.pdf>.
- Pan, S., Neeraj, A., Srivastava, K.S., Kishore, P., and Sarethy, I.P. (2013). Effects of growth regulators on in vitro response and multiple shoot induction in some endangered medicinal plants. *OA Biotechnology*, 2(1), 3. Recuperado de <http://www.oapublishinglondon.com/article/428>.
- Park Y.S, Pond SE., and Bonga J.M. (1993). Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(4), 427-436. Doi: 10.1007/BF00838557.

- Park Y.S, Pond S.E., and Bonga J.M. (1994). Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination and cryopreservation. *Theoretical and Applied Genetics*, 89(6), 742-750. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F00223714.pdf>.
- Pennell R.I., and Lamb, C. (1997). Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 9(7), 1157–1168. Doi: 10.1105/tpc.9.7.1157.
- Perera, P.I.P., Hoher, V., Verdeil, J.L., Doubeau, S., Yakandawala, D.M.D., and Weerakoon, L. K. (2007). Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 26(1), 21-28. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00299-006-0216-4.pdf>.
- Perera, P.I.P., Vidhanaarachchi, V.R.M., Gunathilake, T.R., Yakandawala, D.M.D., Hoher, V., Verdeil, J.L., and Weerakoon, L.K. (2009). Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99(1), 73-81. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11240-009-9577-z.pdf>.
- Pierik, R.L.M., and Sagasta, A.M. (1990). *Cultivo in vitro de plantas superiores*. Madrid, España: S.A. MUNDI-PRENSA
- Pinto, G., Valentim, H., Costa, A., Castro, S., and Santos, C. (2002). Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. tree. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 38(6), 359-572. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/41318710.pdf>.
- Quiroz-Figueroa, F.R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R.M., and Loyola-Vargas, V.M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 86, 285-301. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11240-006-9139-6.pdf>.
- Rai, M.K., Jaiswal, V.S., and Jaiswal, U. (2008). Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae*, 117(3), 302-305. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.04.011>.
- Ramarosandratana, A., Harvengt, L., Bouvet, A., Calvayrac, R., and Pâques, M. (2001). Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(1), 29-34. Doi: 10.1079/IVP2000108.

- Renner, S.S., and Ricklefs, R.E. (1995). Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany*, 82(5), 596–606. Recuperado de <https://epub.ub.uni-muenchen.de/14619/1/Renner%26RicklefsDioecyAJB1995.pdf>.
- Reynolds, T.L. (1997). Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33(1), 1-10. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A:1005748614261.pdf>.
- Rinaldi, L.M.R., and Leva, A.R. (1995). *In vitro* organogénesis from diploid tissues of *Cycas revoluta* Thunb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43(1), 37-41. Doi: DOI: 10.1007/BF00042669.
- Robinson, M.L. (2010). *Cycads in Southern Nevada*. Recuperado de <https://www.unce.unr.edu/publications/files/ho/2010/cm1004.pdf>.
- Rojas-Garcidueñas, M., y Ramírez, H. (1987). *Control hormonal del desarrollo de las plantas. Fisiología-Tecnología-Experimentación*. México: LIMUSA.
- Ruiz, R., Rivero, H., Alcalá V., y Espinosa, M. (2004). Embriogénesis somática de *Eucalyptus grandis* Hill Ex maiden y *Eucalyptus urophylla* ST Blake. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 10(2), 8392.
- Samaj, J., Baluska, F., Bobak, M., and Volkmann, D. (1999). Extracellular matrix Surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. *Plant Cell Reports*, 18(5), 369-374. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs002990050588.pdf>.
- Santos, K.G.B.D., Mariath, J.E.D.A., Moco, M.C.C., and Bodanese-Zanettini, M.H. (2006). Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.). Merr.]: Ontogeny of somatic embryos. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(1), 49-55. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132006000100006>.
- Sasaki, K., Shimomura, K., Kamada, H., and Harada, H. (1994). IAA metabolismo in embryogenic and non-embryogenic carrot cells. *Plant Cell Physiology*, 35, 1159-1164.
- Saxton, W. T. (1910). The development of the embryo of *Encephalartos*. *Botanical Gazette*, 49(1), 13-18. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/2466559.pdf>.
- Sharp, W.R., Sondahl, M.R., Caldas, L.S., and Maraffa, S.B. (1980). *Horticultural Review*. Doi: 10.1002/9781118060759.ch6.
- Schneider, A. (1894). Mutualistic simbiosis of algae and bacteria with *Cycas revoluta*. *Botanical Gazette*, 19(1), 25-32. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/2464436.pdf>.

- Schleiden, M.J. (1838). Beitrage zue Phytogenesis. *Archiv für Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medicin*, 13, 137-176.
- Schwann, T. (1839). *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum des Tiere und Pflanzen*. Berlin, Alemania: Salzwasser-Verlag Gmbh.
- Sidky, R. A., and Zaid, Z. E. (2011). Direct production of somatic embryos and plant regeneration using TDZ and CPPU of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Academic Research*, 3(2), 792-796.
- Smith, R. (2012). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. Recuperado de <https://biot202.files.wordpress.com/2015/09/plant-tissue-culture-third-edition-techniques-and-experiments-by-roberta-h-smith.pdf>.
- Spratt, E. R. (1915). The root-nodules of the Cycadaceae. *Annals of Botany*, 29(4), 619-620. Doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a089570>
- Stevenson, D.W. (1990) *Morphology and systematics of the Cycadales*. Mem. New York Botanic Gardens. 57:8-55.
- Suinyuy, S. N., Donaldson, J. S., and Johnson, S. D. (2009). Insect pollination in the African Cycad *Encephalartos friderici-guilielmi* Lehm. *South African Journal of Botany*. 75: 682-688. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.08.005>.
- Teixeira da Silva, J. A., Woondenberg, W. R., and Songjun, Z. (2014). Cycads in vitro. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 24(2), 287-301. Doi: <http://dx.doi.org/10.3329/ptcb.v24i2.23562>.
- Dixon, R.A., and Gonzales, R.A. (1985). *Plant cell culture: a practical approach*. Oxford, Inglaterra: The Practical Approach Series.
- Torres, A.C., Ze, N.M., and Cantliffe, D.J. (2001). Absciscic acid and somatic induction of synchronous somatic embryo development of sweet potato. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37(2), 262-267. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11627-001-0047-5.pdf>.
- Valverde, R., Arias, O., y Thorpe, T. (1992). Estudio histológico en callos de pejibaye (*Guilielma gasipaes*). *Agronomía Costarricense*, 16(2), 225-229. Recuperado de http://www.mag.go.cr/rev_agr/v16n02_225.pdf.
- Vasil, I.K. (2008). A Short history of plant biotechnology. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 387-394. Doi: 10.1007/s11101-007-9075-z.

- Viñas, M., y Jiménez, V.M. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 8(2), 229-242. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77621587023>.
- Vessey, J.K., Pawlowski, K., and Bergman, B. (2005). Root-based N₂-fixing symbioses: legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant and Soil*, 274(1-2), 51-78. Doi: 10.1007/s11104-005-5881-5.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., and Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233-249. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1015673200621.pdf>.
- Vovives, A. P. (2000). México: segundo lugar mundial en diversidad de cícadas. CONABIO. *Biodiversitas*, 31, 6-10. Recuperado de <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv31art2.pdf>.
- Vovides, A.P., Pérez-Farrera, M.A., Gonzáles-Astorga, J., González, D., Gregory, T., Chemnick, J., Iglesias, C., Octavio-Aguilar, P., Avedaño, S., and Bárcenas, C. (2003). An outline of our current knowledge on Mexican cycads (Zamiaceae, Cycadales). *Current Topics in Plant Biology*, 4, 159-174.
- Webb, D.T., Nevarez, M., and De Jesús, S. (1984). Further *in vitro* studies of light-induced root nodulation in the Cycadales. *Environmental and Experimental Botany*, 24(1), 37-44. Doi: [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(84\)90058-3](https://doi.org/10.1016/0098-8472(84)90058-3).
- Whiting, M.G. (1963). Toxicity of cycads. *Economic Botany*, 17(4), 270-302. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/4252455.pdf>.
- Williams, E.G., and Maheswaran, G. (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals Botany*, 57(4), 443-46. Doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087127>.
- Woodenberg, W.R., Berjak, P., and Pammenter, N.W. (2010). Development of cycad ovules and seeds. Implication of the ER in primary cellularisation of the megagametophyte in *Encephalartos natalensis* Dyer and Verdoorn. *Journal of Plant Growth Regulation*, 62, 265-278. Doi: 10.1007/s00709-013-0582-z.
- Xing, G.M., Li, S., Cui, K.R., and Wang, Y.F. (2000). Mechanisms of plant somatic embryogenesis. *Progress In Natural Science*, 10(9), 641-649.

- Yasuda, H., Nakajima, M., Masuda, H., and Ohwada. (2000). Direct formation of heart-shaped embryos from differentiated single carrot cells in culture. *Plant Science*, 152(1), 1-6. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00181-8).
- Yu, C., Chen, Z., Lu, L., and Lin, J. (2000). Somatic embryogenesis and plant regeneration from litchi protoplast isolated from embryogenic suspensions. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 61(1), 51-58. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1006446506041.pdf>.
- Zimmerman, J.L. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, 5, 1411-1423. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC160372/pdf/051411.pdf>.
- Zouine, J., El Bellaj, M., Meddich, A., Verdeil, J.L., and El Hadrami, I. (2005). Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in *Phoenix dactylifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(1), 83-92. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11240-004-6914-0.pdf>.
- Zúñiga, P. T. (2007). Estudio morfogénico de *Zamia skinneri* Warszewicz, empleando megagametófitos y embriones zigóticos. *Tecnología en Marcha*, 20(2), 58-70. Recuperado de http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/44/43.