



Boletín de la Sociedad Botánica de México

ISSN: 0366-2128

victoria.sosa@inecol.edu.mx

Sociedad Botánica de México

México

Sánchez Tinoco, María Ydelia; Engleman, E. Mark; Vovides, Andrew P.
Cronología Reproductora de Ceratozamía Mexicana (Cycadales)
Boletín de la Sociedad Botánica de México, núm. 66, 2000, pp. 15-23
Sociedad Botánica de México
Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57706602>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

CRONOLOGÍA REPRODUCTORA DE *CERATOSAMIA* MEXICANA (CYCADALES)

MARÍA YDELIA SÁNCHEZ-TINOCO¹, E. MARK ENGLEMAN² Y ANDREW P. VOVIDES³

^{1,2}Especialidad de Botánica, IRENAT, Colegio de Postgraduados. 56230 Montecillo, Texcoco, México. e-mail: ydelia@bugs.invest.uv.mx; ²e-mail: marke@colpos.colpos.mx ³Jardín Botánico F. J. Clavijero, Instituto de Ecología, Xalapa, Ver. e-mail: vovidesa@ecologia.edu.mx

Resumen. En *Ceratozamia mexicana* Brongn. el desarrollo de la semilla se cumple en 24 meses desde la iniciación de los óvulos en agosto hasta el desarrollo completo del cuerpo del embrión. Durante los tres primeros meses ocurre la megasporogénesis y la megagametofitogénesis. Al finalizar febrero el gametofito es cenocítico. La celularización del gametofito termina en mayo y comienzan otros cambios: endurecimiento del gametofito, lignificación de la capa pétreo, desaparición de tricomas y acumulación de almidón en el gametofito. La polinización probablemente ocurre entre febrero y marzo. Al inicio de septiembre, aparecen proteínas y gotas de aceite en el gametofito. La semilla se dispersa en septiembre; puede presentar arquegonios y ocasionalmente suspensores en desarrollo. La fertilización ocurre aproximadamente en el período de la dispersión fuera de la planta madre. Los suspensores crecen durante cinco meses y el cuerpo del embrión se desarrolla en cuatro meses. Previo a la presencia de un embrión, esta semilla se dedica a proveerse de nutrimentos y protegerse.

Palabras clave: Cycadales, *Ceratozamia*, semilla, reproducción.

Abstract. In *Ceratozamia mexicana* Brongn. seed development is completed in 24 months from the initiation of ovules in August until the full development of the body of the embryo. Megasporogenesis and megagametophytogenesis occur during the first three months. At the end of February the gametophyte is coenocytic. Cellularization of the gametophyte ends in May, when other changes begin: hardening of the gametophyte, lignification of the stony layer, disappearance of trichomes, and accumulation of starch in the gametophyte. Pollination probably occurs in February and March. By the beginning of September, proteins and oil droplets appear in the gametophyte. Seeds are dispersed in September, at which time arquegonia may be present and occasionally developing suspensors. Fertilization occurs approximately at the time of dispersal, separately from the mother plant. Suspensors grow during five months and the body of the embryo develops during four months. Thus, development of protection and storage of nutrients precedes the formation of the embryo.

Key words: Cycadales, *Ceratozamia*, seed, reproduction.

Las cícadas constituyen un grupo de gimnospermas primitivas filogenéticamente basales a las plantas con semilla (Crane, 1988; Loconte & Stevenson, 1990). Mundialmente son consideradas en peligro de extinción (IUCN, 1997); las especies mexicanas están protegidas (Diario Oficial, 1994).

Ceratozamia mexicana Brongn. objeto de este estudio, es endémica a México. Se encuentra amenazada de extinción debido tanto a la destrucción de su habitat (bosque mesófilo de montaña), como a la extracción ilegal para su venta como planta ornamental. Es por ello que ha sido incluida en los listados del CITES (Convención Internacional sobre el Comer-

cio de Fauna y Flora Silvestre Amenazadas) bajo el apéndice I, que prohíbe totalmente el comercio de plantas de origen silvestre; sin embargo, el CITES considera legal el comercio de plantas artificialmente propagadas, especialmente en su país de origen.

La información generada por este estudio aporta información relevante para el conocimiento general de la biología de la especie, en particular sobre su propagación por medio de semilla. Existen proyectos de propagación artificial de cícadas con vistas al manejo sustentable involucrando comunidades de campesinos (Vovides & Iglesias, 1994). Igualmente se ha intentado la propagación por cultivo de tejidos a

partir de embriogénesis somática (Chávez et al, 1998).

Las experiencias de campo y en viveros han permitido lograr algunos avances en el conocimiento práctico de la germinación de *C. mexicana*. Sin embargo, se desconocían algunos aspectos de la ontogenia del óvulo y la semilla, mismos que fueron esclarecidos mediante la investigación que aquí se presenta.

Para las angiospermas el tiempo entre la iniciación del óvulo y la maduración de la semilla puede ser de un mes o menos (Singh & Johri, 1972). En contraste, en las gimnospermas este proceso es mucho más prolongado. Según Singh (1961), Konar (1960), Dehgan y Johnson (1983), Smith (1978) y Owens et al. (1997), el ciclo reproductor de una gimnosperma se desarrolla entre uno y tres años y difiere entre las gimnospermas de zonas templadas (prolongado) y las de zonas tropicales (corto). En pocas taxa de gimnospermas ha sido posible describir el ciclo reproductor completo. En *Cephalotaxus drupacea* Sieb. et Zucc. las semillas requieren dos años desde su iniciación hasta la maduración (Singh, 1961), en *Pinus roxburghii* Sar. el ciclo reproductor se cumple en tres años (Konar, 1960), en *Biota orientalis* Endl. en un año (Singh y Oberoi, 1962) y en *Agathis australis* (Lambert) Steud. en dos años aproximadamente (Owens et al., 1997). Según Singh y Johri (1972) para *Ginkgo*, *Ephedra*, *Gnetum*, la mayoría de las Cupressaceae, algunos miembros de las Taxodiaceae y aún las cícadas, el ciclo reproductor se cumple en un año.

Para los taxa anteriormente citados, Singh y Johri (1972) describen algunos aspectos del ciclo reproductor en razón de la estacionalidad: la iniciación de los óvulos que ocurre en el otoño; la esporogénesis se presenta en el invierno; la polinización ocurre en primavera al completarse la megasporogénesis (en cícadas el gametofito puede ser cenocítico al momento de la polinización); la fertilización sucede tres a cuatro meses después de la polinización; y la maduración concluye en el siguiente otoño.

No obstante, esta información no precisa las especies estudiadas. En particular para las cícadas un gran número de eventos del ciclo reproductor no ha sido registrado con detalle, mientras que para otros eventos se presenta información fragmentada y contradictoria. Esto fundamentalmente se debe a la dificultad de seguir el desarrollo de los óvulos jóvenes en etapas críticas y de encontrar en el justo momento de dispersión las pocas semillas maduras que se producen (Quisumbing, 1925; Chamberlain, 1935 y Norstog, 1990). Adicionalmente, debe considerarse la dificultad de encontrar poblaciones silvestres en las que sea posible llevar a cabo un muestreo sistematizado, esto en razón de lo reducido de las poblaciones en tér-

minos de densidad y de área ocupada. La población natural de *Ceratozamia mexicana* estudiada aquí representa una excepción en términos de densidad, 1,722 individuos adultos por hectárea (Alejandre et al., 1990), lo cual facilitó llevar a cabo el seguimiento de los eventos más relevantes de su ciclo reproductor.

Un aspecto que resaltó al desarrollar la presente investigación, fue la necesidad de definir la entidad estudiada. Se aplicó el término "semilla" a una unidad que en términos de morfología angiospérmica tiene características de óvulo y también de semilla. Según Smith (1964) el óvulo consiste de la nucela rodeada por uno o dos tegumentos. Para Herr (1995) la presencia de un embrión denota un carácter importante para delimitar el fin de la ontogenia del óvulo, es decir, la existencia de una semilla. El concepto de semilla, según Kozłowski y Gunn (1972) y Esau (1982), incluye tres aspectos importantes: 1] presencia de un embrión, 2] nutrientes almacenados y 3] diferenciación de tegumentos en una cubierta seminal.

En este estudio se dio poca importancia a la presencia del embrión, y mucha a la protección presentada por el endurecimiento de la sarcotesta, la lignificación de la esclerotesta y el endurecimiento del gametofito. También tomamos en cuenta la acumulación de reservas y el atractivo para dispersores. Para identificar el órgano con estas características aplicamos el término "semilla".

Materiales y técnicas

Megastróbilos, óvulos y semillas fueron recolectados en la población del cerro "Coacoatzintla", localizado en el municipio del mismo nombre, a 13 km en línea recta al norte de Xalapa, Veracruz, México. Se hicieron un total de veintidós recolecciones periódicas en intervalos de cuatro a doce semanas, desde mayo de 1994 hasta septiembre de 1996 (cuadro 1). En septiembre de 1995, al ocurrir la dispersión, se recolectaron los megastróbilos en proceso de desintegración así como las semillas diseminadas. Estos materiales fueron sembrados en condiciones de jardín en la ciudad de Xalapa, Veracruz. Se hicieron doce muestreos del material sembrado.

Se fijaron megastróbilos pequeños en etapas iniciales, secciones de megastróbilos en etapas más avanzadas de su crecimiento, óvulos y semillas de diferentes plantas. Para fijarlos, algunos de ellos se seccionaron y se repartieron por mitad para fijación en FAA y en CRAF III (Sass, 1958). Se hicieron cortes por la microtecnica común (impregnando en parafina, cortando a 15 µm y tiñendo con safranina-verde fijo); también se hicieron cortes a mano y cortes con micrótomo de

Cuadro 1. Fechas de recolecta, estadios y longitudes del óvulo y semillas en secuencia ontogénica

Meses	Fecha	Caracterización del estado
0	01-SEP-94	Iniciación de óvulos. Óvulos de 0.5 a 2.0 mm. Emergencia de megatróbilos.
1	30-OCT-94	Óvulos de 3.0 a 5.0 mm. Emergencia de megatróbilos.
3	31-DIC-94	Óvulos de 8.0 a 10.0 mm. Megatróbilos con esporófilas apretadas.
5	12-FEB-95	Óvulos de 12.0 mm. Megatróbilos con esporófilas apretadas.
5	25-FEB-95	Óvulos de 12.0 mm. Megatróbilos con esporófilas apretadas.
6	25-MAR-95	Óvulos de 14.0 a 23.50 mm. Megatróbilos con esporófilas apretadas, algunas inician su separación.
8	06-MAY-95	Óvulos de 27.0 a 33.0 mm. Megatróbilos con esporófilas separadas.
9	10-JUN-95	Óvulos de 28.0 a 33.0 mm. Megatróbilos con esporófilas separadas.
10	19-JUL-95	Óvulos de 28.0 a 33.0 mm. Megatróbilos con esporófilas separadas.
12	01-SEP-95	Óvulos de 30.0 a 36.0 mm. Desarticulación de megatróbilos.
13	07-OCT-95	Desarrollo de semillas en jardín. Arquegonios.
14	10-NOV-95	Desarrollo del embrión.
15	03-DIC-95	Desarrollo del embrión.
16	02-ENE-96	Desarrollo del embrión.
18	02-MAR-96	Desarrollo del embrión.
19	20-ABR-96	Desarrollo del embrión.
20	28-MAY-96	Desarrollo del embrión.
21	09-JUN-96	Desarrollo del embrión.
22	21-JUL-96	Desarrollo del embrión.
23	06-AGO-96	Germinación.
24	09-SEP-96	Germinación.

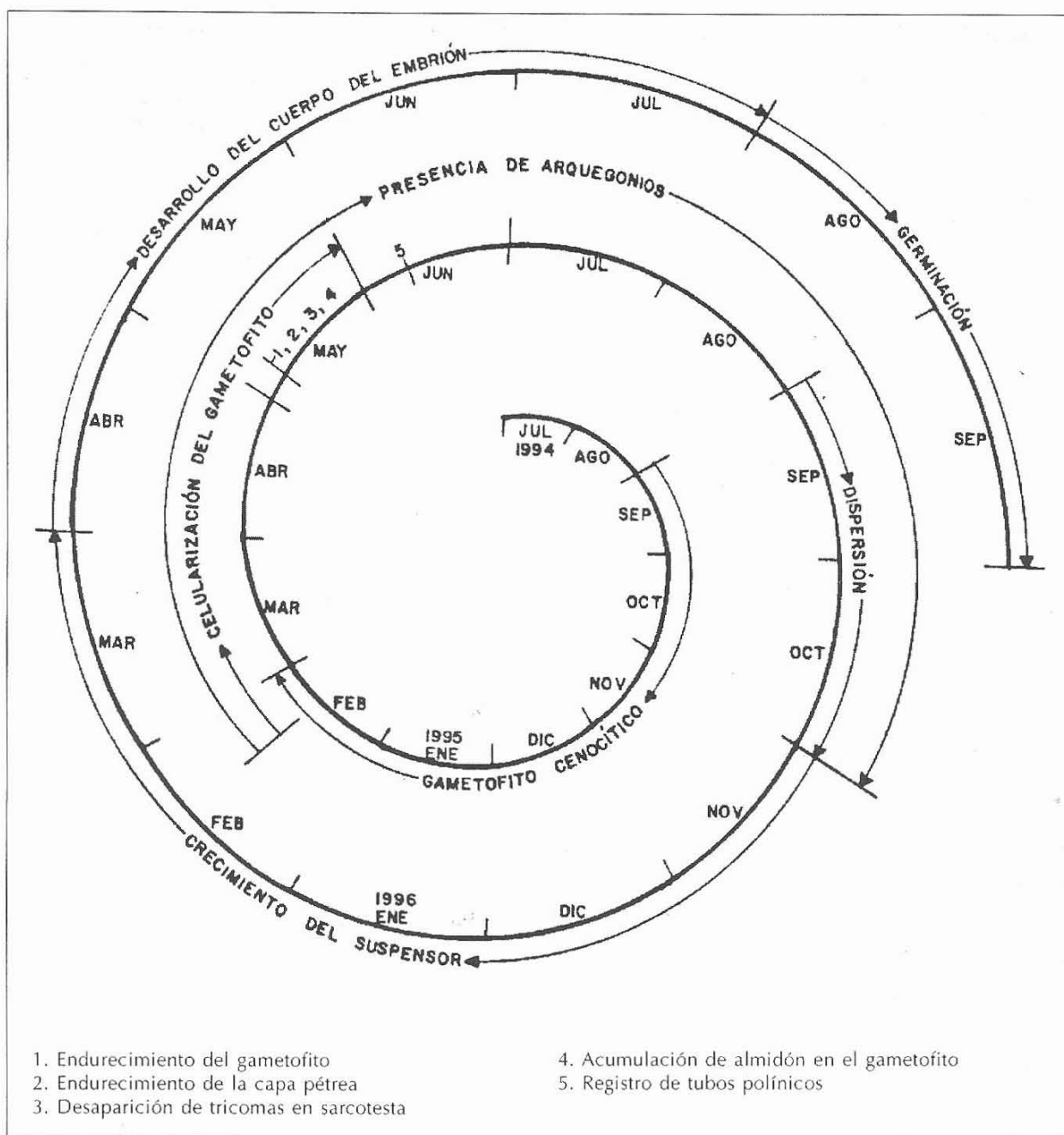


Figura 1. Cronología del desarrollo de óvulo y semilla de *Ceratozamia mexicana*: cubierta seminal, gametofito, dispersión, parte del embrión.

mano. Para detectar almidón se utilizaron cortes a mano (entre 50 μm y 100 μm) del gametofito y sarcotesta, y cortes de parafina (15 μm) de tejidos con solución IKI; para detectar lípidos se hicieron cortes a mano y cortes con micrótopo de mano (60 μm) y se utilizó rojo O de aceite; para polisacáridos se usaron

cortes a mano (entre 50 μm y 100 μm) usando el ácido peryódico seguido de reactivo de Schiff (Locquin y Langeron, 1985); para proteínas se usaron cortes a mano (entre 50 μm y 100 μm) y se tiñeron con negro azul de naftol (NAN). Se analizaron mediante microscopía fotónica, principalmente estereoscópica.

Resultados

Los eventos más relevantes de las observaciones al estereomicroscopio durante el desarrollo del óvulo y de la semilla, son: la celularización y endurecimiento del gametofito, la lignificación de la capa pétreo, la desaparición de tricomas, el registro de tubos polínicos, la diferenciación de arquegonios, el desarrollo del suspensor, el desarrollo del cuerpo del embrión, así como los cambios del tamaño.

El gametofito se presenta en forma cenocítica desde septiembre hasta febrero. En febrero, después de cinco y medio meses, se inicia la celularización y ésta dura hasta mayo (figura 1). En mayo el gametofito se endurece. El gametofito almacena proteínas, lípidos y una gran cantidad de almidón. La proteína de reserva se encuentra en grumos amorfos dentro de la vacuola. Estas proteínas aparecen hacia la etapa de dispersión de la semilla. Su aparición inicia en la periferia del gametofito. La concentración es mayor hacia las células superficiales y disminuye hacia los estratos subyacentes. Los lípidos se encuentran en forma de gotitas de aceite. Al igual que las proteínas, aparecen primero en la periferia del gametofito. Inician en las células superficiales durante el mes de junio con un tamaño de 3 μm a 6 μm , durante los meses de julio a septiembre se localizan en los cinco estratos subyacentes. En septiembre, coincidiendo con la dispersión de la semilla las gotas de grasa alcanzan su mayor tamaño (15 μm) y mayor abundancia en las células superficiales, disminuyendo en los estratos subyacentes. Van apareciendo granos de almidón en todas las células del gametofito femenino. Al principio (mayo) son pocos y pequeños; en junio se arreglan hacia la periferia de la célula al mismo tiempo que aumentan de tamaño (miden en promedio 9 μm), y durante los meses de julio a septiembre ocupan todo el lumen celular (figura 2). Los granos más pequeños se encuentran hacia las células superficiales.

La capa pétreo se lignifica y los tricomas en la sarcotesta desaparecen en mayo. La diferenciación de los arquegonios ocurre en febrero, después de cinco y medio meses, y en junio se registraron tubos polínicos. La dispersión ocurre durante los meses de septiembre y octubre (figura 3), doce meses después de la emergencia de los estróbilos, cuando la semilla presenta arquegonios y en pocos casos suspensores en sus primeras etapas de desarrollo. Dos semillas cortadas en septiembre, contenían anterozoides en el tubo polínico y en la cámara arquegonial (figura 4). El crecimiento del suspensor dura cinco meses. En principios de marzo el suspensor se aloja en una cavidad que se extiende hasta un tercio de la longitud del gametofito. El cuerpo del embrión continúa

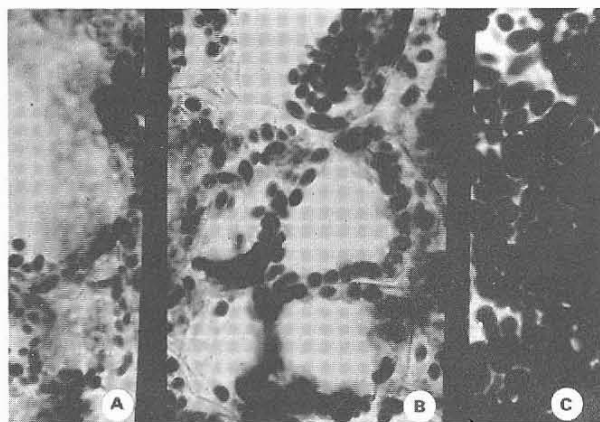


Figura 2. Cortes longitudinales de gametofito en tres etapas. Tinción con iodo. (a) Células de parénquima con pocos granos de almidón (mayo). (b) Arreglo periférico de los granos de almidón en las células de parénquima (junio). (c) Células de parénquima llenas de granos de almidón (julio a septiembre). X768.

desarrollándose durante los siguientes cuatro meses, y durante los meses de agosto y septiembre (veinticuatro meses después), ocurre la germinación.

La longitud de los óvulos cuando los megastrobilos emergen varía de 0.5 mm a 2.0 mm. En septiembre del siguiente año miden de 30.0 mm a 36.0 mm de longitud. En mayo, cuando miden de 27.0-33.0 mm, se inicia la lignificación de la escleroteca y la acumulación de almidón en las células del gametofito. Entre la emergencia del megastrobilo y fin de abril, la longitud de la semilla aumenta con una tasa relativa aproximadamente constante de 35% por mes. Luego deja de aumentar en longitud durante mayo,



Figura 3. Desarticulación del megastrobilo (septiembre).

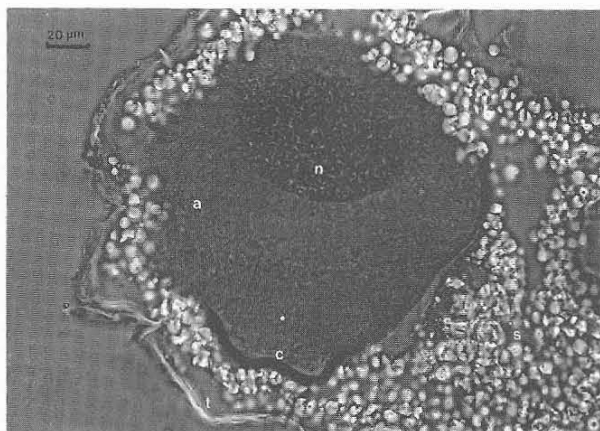


Figura 4. Corte transversal de la nucela en la región micropilar (septiembre). Tinción safranina-verde fijo. (a) anterozoide. (c) banda de cilios del anterozoide. (n) núcleo del anterozoide. (s) granos de almidón dentro del tubo polínico. (t) tubo polínico.

junio y julio antes de una expansión final de la sarcotesta. Cuando ocurre la desarticulación de los megatróbilos (figura 3) en septiembre del año posterior a la emergencia (figura 5), las semillas se separan del megatróbilo con la sarcotesta. Posteriormente, la sarcotesta se separa de la esclerotesta y, al cabo, la semilla queda con un tamaño menor, de 20.0 mm a 30.0 mm.

Así, varios cambios comienzan en mayo: endurecimiento del gametofito, lignificación de la capa pétreo, desaparición de tricomas y acumulación de almidón en el gametofito. La celularización del gametofito termina en el mismo mes (figura 1).

Discusión

El concepto de semilla, según Kozłowski y Gunn (1972) y Esau (1982), útil para angiospermas, resulta ambiguo en Cycadales. En *C. mexicana*, cuando ocurre el endurecimiento del gametofito, la acumulación de almidón, la diferenciación de los arquegonios y la lignificación de la esclerotesta, a esta estructura se le llama aquí "semilla", sin embargo no hay embrión. Más aún, puede suceder que ocurra la dispersión sin fecundación; así, es frecuente encontrar semillas dispersadas pero con arquegonios inmaduros o con anterozoides dentro de la cámara arquegonial. Aún y cuando se lleve a cabo la fecundación al momento de la dispersión, esta unidad llámese óvulo o semilla, tiene vida independiente y presenta atractivo alimenticio para dispersores potenciales.

A diferencia de la afirmación presentada por Singh y Johri (1972), sobre el ciclo reproductor de un año

para las cícadas, en *C. mexicana* transcurren dos años desde la iniciación hasta el desarrollo completo del cuerpo del embrión. A diferencia de la estacionalidad que manifiestan Singh y Johri (1972), aquí la iniciación de los óvulos sucede entre agosto y octubre (figura 1).

La polinización en la figura 1, se estima indirectamente, a partir de la presencia de tubos polínicos en junio y de la información obtenida en esta población por Sánchez-Rotonda *et al.* (1995) sobre los escarabajos polinizadores de *C. mexicana* y cuyos ciclos de vida se correlacionaron con la fenología reproductora de *C. mexicana*. Los sucesos que Sánchez-Rotonda *et al.* (1995) consideraron para estimar la polinización consisten en la separación de esporófilas del megatróbilo, y escarabajos en estado adulto cubiertos de polen realizando visitas nocturnas a los megatróbilos. En la presente investigación también encontramos megatróbilos con esporófilas separadas en el mes de marzo (figura 5). En la investigación de Sánchez-Rotonda *et al.* (1995) se concluyó que la polinización ocurre entre fines de febrero y junio, fechas que coinciden con la afirmación de Singh y Johri (1972).

El hecho de que, al ocurrir la dispersión en septiembre y octubre, dos semillas presentaron anterozoides y pocas semillas presentaron suspensores sugiere la posibilidad de que las semillas sean dispersadas sin ser fertilizadas. Así, transcurren aproximadamente siete meses entre el acarreo del polen (marzo) y la fertilización en *C. mexicana*; no obstante, Singh y Johri (1972) señalan un período de tres a cuatro meses para las cícadas en general.

Las semillas de *Ceratozamia* se dispersan en estado de latencia porque el embrión está inmaduro y en este estado son incapaces de germinar. Requieren aproximadamente un año de reposo en el suelo llamado por Pérez y Vovides (1997) "período de posmaduración". Esto es diferente de lo que ocurre en *Dioon californoi* De Luca & Sabato y *Dioon merolae* De Luca, Sabato & Vázquez Torres. En estas especies el desarrollo del megatróbilo es más prolongado que en *Ceratozamia mexicana*; la fertilización ocurre aproximadamente un año después de la emergencia del megatróbilo, igual que en *C. mexicana*. La semilla fertilizada está retenida en el megatróbilo por un año adicional mientras que se desarrollan los embriones, y así el embrión cubre su período de maduración dentro de una semilla todavía retenida en el megatróbilo, y este mismo depende de la planta madre. Los megatróbilos se desarticulan al finalizar el segundo año, y los embriones ya están lo suficientemente maduros para que la semilla germine durante un período relativamente corto (dos a seis semanas) (Espinosa, 1996; Nors-tog *et al.*, 1995; Pérez, 1994; Pérez y Vovides, 1997).

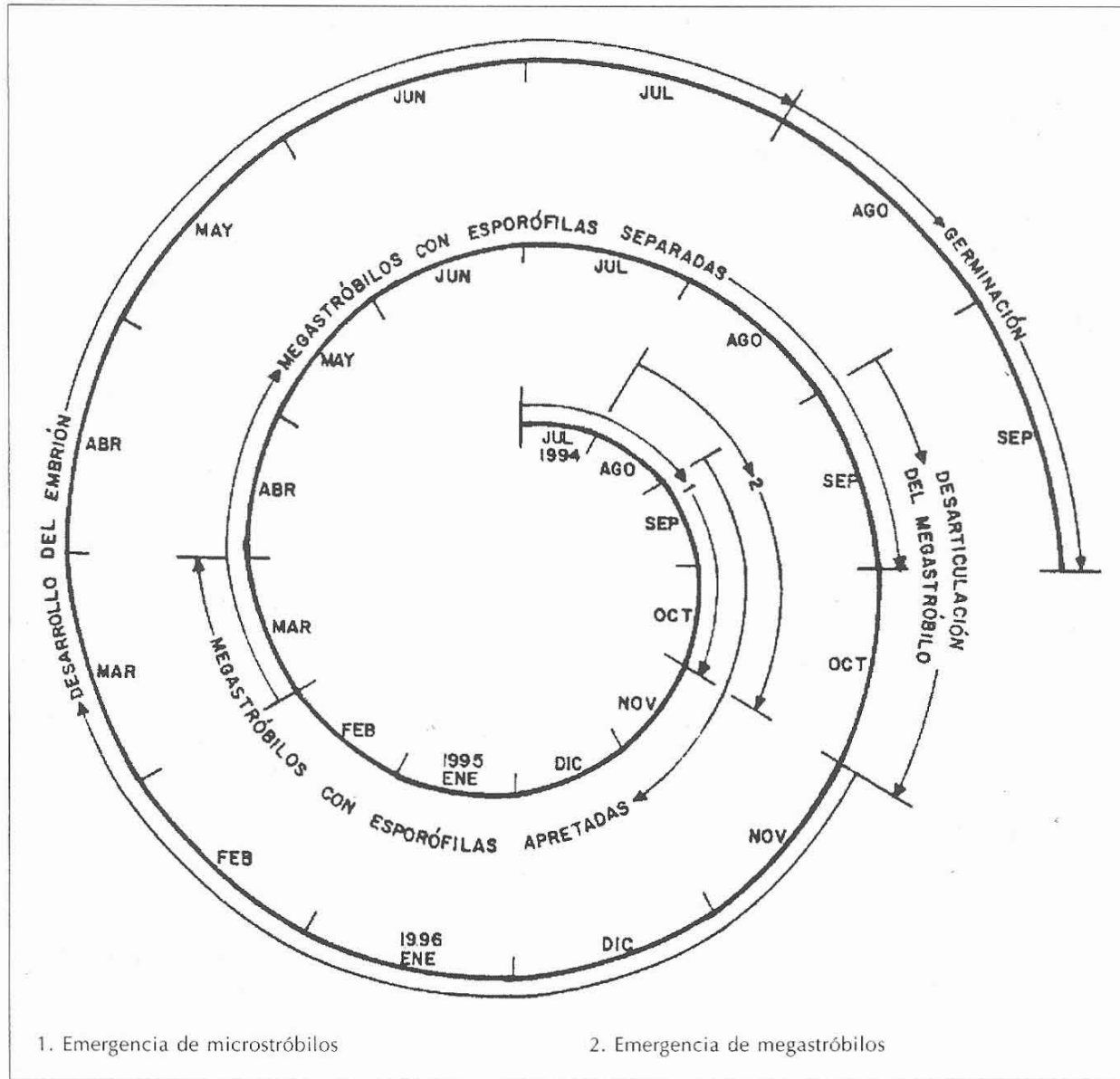


Figura 5. Cronología del desarrollo de óvulo y semilla de *Ceratozamia mexicana*: estróbilos, embrión, germinación.

En ocasiones se han observado semillas germinando en megastrobilos parcialmente desarticulados.

Según Singh y Johri (1972) y Singh (1978), la maduración de la semilla de las gimnospermas se logra cuando el embrión se ha desarrollado completamente y con ello se inicia el endurecimiento de la cubierta seminal y la acumulación de nutrientes. En contraste, en *C. mexicana*, la lignificación de la cubierta seminal comienza junto con la celularización del gametofito inmaduro. Esta lignificación de la esclerotesta se completa cuando la semilla presenta arquegonios, diez

meses después de la iniciación de los óvulos y diez meses antes de que el cuerpo del embrión se desarrolle (en la primavera). Simultáneamente ocurre la acumulación de almidón en el gametofito y el endurecimiento del gametofito. En relación a los nutrientes presentes, debe puntualizarse el hecho de que éstos se presentan antes de que ocurra la dispersión.

Como resultado de la presente investigación se puede establecer que a nivel estructural, en el gametofito vegetativo de *C. mexicana* sobresalen tres épocas: la etapa de núcleos libres, que ocurre entre

septiembre y febrero; la etapa de formación de paredes, que se lleva a cabo entre marzo y mayo; y la acumulación de nutrimentos (granos de almidón, proteínas y grasas), que se inicia en mayo y concluye en septiembre (figura 1). Según Singh (1978), los cambios estructurales más conspicuos que ocurren durante la maduración del gametofito femenino en la semilla de las gimnospermas están relacionados con el depósito de nutrimentos. Según Favre-Duchartre (1958), de manera general en la semilla el depósito de sustancias nutritivas coincide con el desarrollo del embrión, pero excepcionalmente en *Ginkgo biloba* L. y en las Cycadales los productos alimenticios se forman cuando las semillas carecen de embrión.

La presente investigación confirma esta última coordinación de eventos, pues en *C. mexicana*, previo a la presencia de un embrión y generalmente cuando hay arquegonios, esta semilla se dedica a protegerse y proveerse de nutrimentos. La máxima acumulación de los nutrimentos se observó antes de la dispersión. Indiscutiblemente la etapa de dispersión representa un suceso determinante en la ontogenia de la semilla de *C. mexicana*. La relación entre máxima acumulación de nutrimentos y la dispersión (septiembre) podría tener dos posibles explicaciones complementarias: una, causal, es que el aprovisionamiento de nutrimentos sucedería en el último momento, dado que la planta ha estado invirtiendo casi todos sus recursos energéticos y materiales en el desarrollo de estructuras de sostén y protección del megastrobilo con sus semillas durante el primer año; y otra, consecencial, es que la semilla debe proveerse de los nutrimentos necesarios para alimentar el embrión y la plántula, lo que le permite terminar su período de maduración en el ambiente natural, el cual, para *C. mexicana* es un entorno benigno de materia orgánica húmeda que forma la cubierta del piso del bosque mesófilo de montaña. Lo contrario sucede en las especies de *Dioon* observadas, donde el ambiente natural tiene una época de estío muy caliente y prolongada la cual desecaría rápidamente una semilla desprotegida por un período largo sobre un sustrato seco y pobre en materia orgánica. Para el caso de *Dioon* la maduración ocurre dentro del megastrobilo intacto, lo cual protege la descendencia del ambiente cálido y seco de las selvas tropicales caducifolias, en donde ocurren estas especies, durante este período crítico de maduración del embrión.

Literatura citada

- Alejandro-Rosas, J. A., M. Y. Sánchez-Tinoco & M. Vázquez-Torres. 1990. Estructura poblacional de *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae) en un bosque del centro de Veracruz. La Ciencia y el Hombre. Revista de la Universidad Veracruzana 5:93-111.
- Crane, P. R. 1988. Major clades and relationships in the "higher" gymnosperms. Pp. 218-271 in: Beck, C. B., ed. Origin and Evolution of Gymnosperms. Columbia University Press. New York.
- Chamberlain, C. J. 1935. Gymnosperms. Structure and Evolution. The University of Chicago Press. Chicago, Illinois. 484 pp.
- Chávez A., V. M., R. E. Litz., M. Monroy & A. P. Vovides. 1998. Regeneration of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature-phase trees. Plant Cell Reports 17:612-616.
- Dehgan, B. & C. R. Johnson. 1983. Improved seed germination of *Zamia floridana* (sensu lato) with H₂SO₄ and GA3. Scientia Horticulturae 19:357-361.
- Diario Oficial de la Federación. 16 de mayo de 1994. Organismo del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. Tomo CDLXXXVIII No. 10. México, D.F.
- Esau, K. 1982. Anatomía de las plantas con semilla. (Traducido del inglés). Hemisferio Sur. Buenos Aires. 512 pp.
- Espinosa, E. 1996. Observaciones fenológicas y síndrome de la polinización (*in situ*) en *Dioon califanoi* De Luca & Sabato (Zamiaceae). Tesis de licenciatura. Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Xalapa, México.
- Favre-Duchartre, M. 1958. *Ginkgo*, an oviparous plant. Phytomorphology 8:377-390.
- Herr, J. M., Jr. 1995. The origin of the ovule. Amer. J. Bot. 82:547-564.
- Kerry, S. W. & H. J. Gillett. 1997. IUCN Red List of Threatened Plants. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Cambridge, UK. 862 pp.
- Konar, R. N. 1960. The morphology and embryology of *Pinus roxburghii* Sar. with a comparison with *Pinus wallichiana* Jack. Phytomorphology 10:305-319.
- Kozłowski, T. T. & C. R. Gunn. 1972. Importance and characteristics of seeds. Pp. 1-20 in: Kozłowski, T. T., ed. Seed Biology. Vol. I. Academic Press. New York and London.
- Locquin, M. y M. Langeron. 1985. Manual de Microscopía. (Traducido del francés). Editorial Labor. Barcelona, España. 373 pp.
- Norstog, K. 1990. Studies of cycad reproduction at Fairchild Tropical Garden. In: Stevenson, D. W., ed. The Biology, Structure, and Systematics of the Cycadales. Mem. New York Bot. Gard. 57:63-81.
- Norstog, K.J., P.K.S. Fawcett, T.J. Nicholls, A.P. Vovides, & E. Espinosa. 1995. Insect pollination of cycads: evolution and ecological considerations. Pp. 265-285 in: Vorster, P. ed. Proceedings of the Third International Conference on Cycad Biology. Cycad Society of South Africa, Stellenbosch.
- Owens, J. N., G. L. Catalano & J. Aitken-Christie. 1997. The

- reproductive biology of kauri (*Agathis australis*). IV. Late embryogeny, histochemistry, cone and seed morphology. *Int. Natl. J. Plant Sci.* **158**:395-407.
- Pérez, M.A. 1994. Estudio sobre germinación en semillas de espadaña, *Dioon merolae* De Luca, Sabato & Vázq. Torres (Zamiaceae). Tesis de licenciatura, Escuela de Biología, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez.
- Pérez, M.A., & A.P. Vovides. 1997. Manual para el Cultivo y Propagación de Cícadas. INEGI-SEMARNAP. México, D.F. 39 pp.
- Quisumbing, E. 1925. Stony layer in seeds of gymnosperms. *Bot. Gaz.* **59**:121-195.
- Sánchez-Rotonda, G., M. Vázquez-Torres & M. Y. Sánchez-Tinoco. 1995. Entomofilia en una población natural de *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae). *La Ciencia y el Hombre. Revista de la Universidad Veracruzana* **20**:95-110.
- Sass, J. E. 1958. *Botanical Microtechnique*. Ed. 3. Iowa State University Press. Ames, Iowa. 228 pp.
- Singh, H. 1961. The life history and systematic position of *Cephalotaxus drupacea* Sieb. et Zucc. *Phytomorphology* **11**:153-197.
- Singh, H. 1978. Embryology of Gymnosperms. *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Band X. Teil 2. Borntraeger, Berlin. 302 pp.
- Singh, H. & B. M. Johri. 1972. Development of gymnosperm seeds. Pp. 21-75 in: Kozlowski, T. T., ed. *Seed Biology*. Vol. 1. Academic Press. New York and London.
- Singh, H. & Y. P. Oberoi. 1962. A contribution to the life history of *Biota orientalis*. *Phytomorphology* **12**:373-393.
- Smith, D. L. 1964. The evolution of the ovule. *Biol. Rev.* **39**:137-159.
- Smith, G. S. 1978. Seed scarification to speed germination of ornamental cycads (*Zamia* spp.) L. *HortScience* **13**:436-438.
- Vovides, A. P. & C. G. Iglesias. 1994. An integrated conservation strategy for the cycad *Dioon edule* Lindl. *Biodiversity and Conservation* **3**:137-141.