



# Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

# Posgrado en Ciencias Biológicas

# CARACTERIZACIÓN DE SEMILLAS DE PALMA JIPI

# (Carludovica palmata Ruiz & Pavón)

# Tesis que presenta

# DAFNE VIANELI BACAB CAAMAL

En opción al título de MAESTRO EN CIENCIAS (Ciencias Biológicas: Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2023

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C. POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



# RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Dafne Vianeli Bacab Caamal** titulado **"Caracterización de semillas de palma jipi (***Carludovica palmata* **<b>Ruiz & Pavón)**" se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, en la línea de Genética Vegetal, laboratorio 26 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de Dr. Gregorio del C. Godoy Hernández y el Dr. Tomás Augusto González Estrada, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dra. Cecilia Hernández Zepeda Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 28 de abril de 2023

# DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma:

Nombre: Dafne Vianeli Bacab Caamal

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y formaba parte del proyecto titulado Micropropagación de *Carludovica palmata* (palma jipi) bajo la dirección del Dr. Gregorio del Carmen Godoy Hernández y codirección del Dr. Tomás Augusto González Estrada.

### AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), en especial a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP) por su aceptación para la realización de mi posgrado, así como por las instalaciones y equipos otorgados para desarrollar el presente trabajo.

AI CONACYT, por la beca otorgada N° 109326.

Al Proyecto "Connecting the Mexican Bioimaging Comunity" financiado por la Chan Zuckerberg Initiative, por las becas y facilidades otorgadas para la toma de talleres presenciales y virtuales de fundamentos de microscopía óptica y electrónica, así como para el análisis y procesamiento de bioimágenes.

Al Dr. Gregorio del C. Godoy Hernández, un especial agradecimiento por la oportunidad y confianza de aceptarme dentro de su grupo de trabajo, por su apoyo, su activa participación y guía, así como por brindarme las herramientas y materiales necesarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. Tomás A. González Estrada, un especial agradecimiento por su constante orientación, su acertada asesoría, su compromiso y apoyo constante durante la realización del proyecto. Así como también por sus palabras de apoyo y motivación.

A la Dra. Ivón Ramírez Morillo, un especial agradecimiento por sus acertadas sugerencias y observaciones en cada tutoral, por su constante orientación en la parte taxonómica y botánica; por su compromiso, apoyo y paciencia para mejorar el presente trabajo. Así como también por sus palabras de aliento y motivación.

A la Dra. Miriam Ferrer Ortega, un especial agradecimiento por sus excelentes sugerencias y observaciones en cada tutoral, por su acertada y constante asesoría en la parte metodológica, histológica y de redacción; por su paciencia y compromiso para hacer de este trabajo de calidad. Así como por sus palabras de motivación.

Al Dr. Fulgencio Alatorre Cobos, un especial agradecimiento por su ayuda y por su excelente orientación en la parte de incrustación con resina e histoquímica en semillas maduras.

A la Dra. Ángela F. Kú González, un especial agradecimiento por su constante apoyo, por compartirme su conocimiento en el área de microscopía e histología; su pasión y experiencia en este campo durante las charlas y seminarios, despertó mi interés y mi entusiasmo por continuar aprendiendo más sobre histología y microscopía. Y de manera personal, agradezco su amistad y confianza brindada durante mi estancia en la UBBMP.

Al Dr. Ricardo X. Álvarez Espino, un especial agradecimiento por su apoyo y sus conocimientos compartidos sobre semillas y latencia; así como también por la corta estancia que pude estar en el GERMOLAB, todo ello me incentivo a continuar aprendiendo más sobre semillas.

Al M.C. Felipe A. Barredo Pool, un especial agradecimiento por su apoyo técnico y por sus conocimientos compartidos en la parte de germinación *in vitro* de granos de polen y la parte histoquímica de mi trabajo.

A la M.C. Elidé Avilés, un especial agradecimiento por su apoyo técnico durante la realización de este trabajo.

Al comité tutoral integrado por: Dr. Gregorio del C. Godoy Hernández, Dr. Tomás A. González Estrada, Dra. Ivón Ramírez Morillo y a la Dra. Miriam Ferrer Ortega. Por sus sugerencias y observaciones en cada tutorial y su importante participación durante el proceso de elaboración de este trabajo.

Al comité revisor integrado por Dr. Gregorio del C. Godoy Hernández, Dr. Tomás A. González Estrada, Dr. Felipe Vázquez Flota, Dra. Ivón Ramírez Morillo y a la Dra. Miriam Ferrer Ortega, por el tiempo que destinaron para la revisión de mi manuscrito, para la emisión de sus acertadas observaciones y sugerencias para mejorar este trabajo, así como también por sus palabras de aliento que me motivan a seguir preparándome en el ámbito personal y profesional.

Al Sr. Jorge Chan, por permitir realizar los muestreos y colectas dentro de su cultivo de *C. palmata* localizado en el poblado de Santa Cruz Ex Hacienda.

A mis amigos y compañeros de CICY y del laboratorio 26, en especial a la M.C. Lucía Chi Chi y la M.C. Evelyn Carrillo Bermejo por sus palabras de aliento y motivación, su apoyo constante y técnico en mi trabajo, así como por brindarme su amistad.

### DEDICATORIAS

A mi amada familia, quienes siempre han estado presentes en mi vida, riendo y festejando en los momentos más felices, pero también dándome consuelo y apoyo en los momentos más tristes. Siempre cuidándome, apoyándome y alentándome; en especial a mis hermanitos Carolina y Brayam, mi madre Elsa, mi compañero y confidente Edrik, mis tías Candelaria, Marlene e Irene; mi tío Marcos, mis abuelitos Magdaleno y Maria Juana.

**A mis amigos**, quienes siempre han estado pendientes de mi bienestar, me han escuchado, apoyado y me han sacado más de una sonrisa en los momentos más difíciles: Lucía, Leydy, Wili, Elías, Dalia y Evelyn.

A todos ellos, les agradezco por ser parte de mi vida, por su cariño y apoyo incondicional durante toda mi formación profesional, por ser mi fuerza y alentarme a seguir dando el máximo, aun cuando yo misma pensé que no podría más, por compartir momentos agradables y tristes; pero justo son esos momentos que nos hacen crecer y valorar a las personas que no nos dejan caer. Los amo infinitamente ¡Muchísimas gracias!

Solo la semilla que rompe su cáscara es capaz de atreverse a la aventura de la vida Khalil Gibran

# LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Seminario de Estudiantes de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas: "Caracterización de semillas de palma jipi (*Carludovica palmata* Ruiz & Pavón) durante su desarrollo"

Taller durante la Semana Nacional del Conocimiento Yucatán 2022: "Una palma que no es palma, fake news"

# Índice

INTRODUCCIÓN 1		
CAPÍTULO I3		
1.1. A	NTECEDENTES	
1.1.1.	CICLO DE VIDA DE LAS ANGIOSPERMAS	
1.1.2.	REPRODUCCIÓN SEXUAL EN ANGIOSPERMAS	
1.1.3.	GAMETOFITOS: GENERALIDADES E IMPORTANCIA EN ANGIOSPERMAS.5	
1.1.3.1.	Gametofito masculino, microgametofito o grano de polen5	
1.1.3.2.	Gametofito femenino, megagametofito o saco embrionario6	
1.1.4.	FASE PROGÁMICA: GENERALIDADES E IMPORTANCIA EN ANGIOSPERMAS 7	
1.1.4.1.	Doble fecundación	
1.1.5.	SEMILLA: GENERALIDADES E IMPORTANCIA EN ANGIOSPERMAS	
1.1.5.1.	Desarrollo de la semilla en monocotiledóneas9	
1.1.5.2.	Embriogénesis cigótica en monocotiledóneas11	
1.1.5.3.	Desarrollo del endospermo en monocotiledóneas13	
1.1.5.4.	Desarrollo de las capas seminales en monocotiledóneas15	
1.1.6.	LATENCIA EN SEMILLAS15	
1.1.7.	Carludovica palmata Ruiz & Pavón17	
1.1.7.1.	Generalidades17	
1.1.7.2.	Distribución geográfica, cultivo y usos19	
1.1.7.3.	Importancia y problemática de la especie en el Sureste de México	

1.1.7.4.	Antecedentes sobre su fase reproductiva21
1.1.8.	RECAPITULACIÓN DE LOS ANTECEDENTES
1.2. J	USTIFICACIÓN27
1.3. H	11PÓTESIS
1.4. C	DBJETIVOS
1.4.1.	OBJETIVO GENERAL
1.4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS
1.5. E	STRATEGIAS: METODOLÓGICA Y EXPERIMENTAL
CAPÍTU	JLO II
2.1. N	ATERIALES Y MÉTODOS
2.1.1.	SITIO DE ESTUDIO
2.1.2.	MATERIAL VEGETAL
2.1.3.	COLECTA Y FIJACIÓN DE GAMETOFITOS Y SEMILLAS
2.1.4.	TINCIÓN Y CLARIFICACIÓN
2.1.5.	CORTES HISTOLÓGICOS POR CRIOSTATO
2.1.6.	CORTES HISTOLÓGICOS POR MICROTOMO
2.1.7.	ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE GAMETOFITOS Y SEMILLAS
2.1.8.	CARACTERIZACIÓN DEL SACO EMBRIONARIO
2.1.9.	CARACTERIZACIÓN DEL GRANO DE POLEN
2.1.10.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE SEMILLAS Y EMBRIONES40
2.1.11.	CARACTERIZACIÓN DE LAS SEMILLAS ABORTADAS40
2.1.12.	CARACTERIZACIÓN DE LOS IDIOBLASTOS Y RAFIDIOS40

2.1.13. CARAC	APLICACIÓN DE ESCARIFICA( CTERIZACIÓN	CIÓN QUÍMICA	A	SEMILLAS	Y . 40	SU
CAPÍTU	JLO III				. 41	
3.1. R	RESULTADOS				. 41	
3.1.1.	CARACTERIZACIÓN DE LOS GAME	TOFITOS MADUR	0S		. 41	
3.1.1.1.	Localización espacial de los gameto	ofitos dentro de la	inflor	escencia	. 41	
3.1.1.2.	Grano de polen (gametofito mascul	no)			. 46	
3.1.1.3.	Saco embrionario (gametofito feme	nino)			. 50	
3.1.2.	LA DOBLE FECUNDACIÓN				. 55	
3.1.3.	EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA				. 56	
3.1.4.	DESARROLLO DE LA SEMILLA				. 62	
3.1.4.1.	Morfogénesis				. 62	
3.1.4.2.	Maduración				. 70	
3.1.5.	FACTORES QUE AFECTAN LA PR	oducción y ge	RMIN	ACIÓN DE SE	EMILL	.AS
WADON					.75	
3.1.5.1.	Anomalías en el megagametofito				.75	
3.1.5.2.	Ausencia de fecundación				. 75	
3.1.5.3.	Semillas abortadas				.77	
3.1.5.4.	Formación de cutícula extra				.77	
3.1.5.5.	Formación de rafidios				. 79	
3.1.6.	GERMINACION Y LATENCIA				. 84	
3.1.7.	RECAPITULACIÓN DE LOS RESULT	ADOS			. 85	

CAPÍTULO IV	87	
4.1. DISCUSIÓN GENERAL	87	
CAPÍTULO V	94	
5.1. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	94	
5.1.1. CONCLUSIONES GENERALES	94	
5.1.2. PERSPECTIVAS	95	
BIBLIOGRAFÍA	96	
ANEXO(S)		

# LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. 1. El ciclo de vida típico de la angiosperma <i>Hieracium pilosela</i> (Asteraceae)
Figura 1. 2. Esquema del desarrollo del grano de polen 6
Figura 1. 3. Esquema del desarrollo del saco embrionario7
Figura 1. 4. Modelo esquemático de la doble fecundación 8
Figura 1. 5. Esquema de la estructura en semillas9
Figura 1. 6. Representación esquemática de los procesos que tienen lugar durante el desarrollo de semillas en maíz (monocotiledónea)11
Figura 1. 7. Esquema del desarrollo embrionario en monocotiledóneas (Poaceae)13
Figura 1. 8. Tipos de endospermo14
Figura 1. 9. Caracterización de Carludovica palmata18
Figura 1. 10. Distribución de Carludovica palmata20
Figura 1. 11. Esquema del ciclo reproductivo anual sexual de una planta de <i>Carludovica palmata</i> cultivada al norte de Campeche22
Figura 1. 12. Desarrollo-maduración de la infrutescencia de Carludovica palmata23
Figura 1. 13. Porcentaje de semillas abortadas respecto a su posición en el espádice de <i>Carludovica palmata</i>
Figura 1. 14. Anatomía y morfología de una semilla de Carludovica palmata25
Figura 1. 15. Diagrama metodológico
Figura 1.16. Diagrama experimental32
Figura 2.1.Sitio de estudio
Figura 2. 2. Inflorescencias de 1 DDA, marcadas para la recolección

Figura 2. 3. Tipo de muestreo
Figura 2. 4. Diferentes estadios de desarrollo de la inflorescencia
Figura 2. 5. Estadios de desarrollo de infrutescencias y semillas de Carludovica palmata36
Figura 3. 1. Localización de los gametofitos en Carludovica palmata42
Figura 3. 2. Caracterización del androceo de Carludovica palmata42
Figura 3. 3. Caracterización del gineceo de Carludovica palmata44
Figura 3. 4. Caracterización del óvulo de Carludovica palmata45
Figura 3. 5. Caracterización del grano de polen de Carludovica palmata47
Figura 3. 6. Número de núcleos en el grano de polen de Carludovica palmata48
Figura 3. 7. Autofluorescencia en granos de polen de Carludovica palmata
Figura 3. 8. Composición del saco embrionario50
Figura 3. 9. Dimensiones en µm de óvulos y sacos embrionarios de Carludovica palmata51
Figura 3. 10. Análisis del comportamiento de la ovocélula y las sinérgidas de <i>Carludovica palmata</i>
Figura 3. 11. Análisis del comportamiento de la célula central del saco embrionario de <i>Carludovica palmata</i>
Figura 3. 12. Análisis del comportamiento de las antípodas de Carludovica palmata54
Figura 3. 13. Doble fecundación en Carludovica palmata55
Figura 3. 14. Fecundación asincrónica de la ovocélula y la célula central en <i>Carludovica palmata</i>
Figura 3. 15. Etapas caracterizadas durante la embriogénesis cigótica de <i>Carludovica palmata</i> .

Figura 3. 16. Eventos importantes durante la embriogénesis cigótica en <i>Carludovica palmata.</i>
Figura 3. 17 Diferentes morfologías encontradas en semillas de 100 DDA60
Figura 3. 18 Caracterización de embrión maduro (100 DDA) de Carludovica palmata61
Figura 3. 19. Semilla de 10 DDA (primer día de desarrollo) de Carludovica palmata63
Figura 3. 20. Eventos presentes en la semilla de 20-30 DDA de Carludovica palmata65
Figura 3. 21. Eventos presentes en la semilla de 40-60 DDA de Carludovica palmata67
Figura 3. 22. Caracterización histoquímica del endospermo nuclear en la fase de morfogénesis durante el desarrollo de la semilla de <i>Carludovica palmata</i>
Figura 3. 23.Caracterización histoquímica del transporte de macromoléculas y formación de la cutícula en la fase de morfogénesis durante el desarrollo de la semilla de <i>Carludovica palmata</i>
Figura 3. 24. Eventos presentes en la semilla de 70-80 DDA de Carludovica palmata71
Figura 3. 25. Eventos presentes en la semilla de 90-100 DDA de Carludovica palmata72
Figura 3. 26. Caracterización histoquímica del endospermo nuclear en la fase de maduración, durante el desarrollo de la semilla de <i>Carludovica palmata</i> 73
Figura 3. 27.Caracterización histoquímica del transporte de macromoléculas y formación de la cutícula en la fase de maduración, durante el desarrollo de la semilla de <i>Carludovica palmata</i>
Figura 3. 28. Anomalías presentes en los megagametofitos de Carludovica palmata76
Figura 3. 29. Caracterización de semillas abortadas a los 30 DDA en Carludovica palmata78
Figura 3. 30. Caracterización de idioblastos y rafidios en <i>Carludovica palmata</i> 80
Figura 3. 31. Caracterización histoquímica de los rafidios en Carludovica palmata81
Figura 3. 32. Presencia y localización de rafidios e idioblastos en semillas de Carludovica

palmata82
Figura 3. 33. Biomineralización de cristales en células dentro del integumento externo de los óvulos de <i>Carludovica palmata.</i>
Figura 3. 34. Efecto del H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50% en capas seminales de la semilla madura de <i>Carludovica palmata</i>
Figura 3. 35. Germinación y obtención de plántulas de Carludovica palmata

# LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. 1. Clasificación de tipos de latencia en semillas	.16
Tabla 1. 2. Clasificación taxonómica de <i>C. palmata</i>	.17
Tabla 3. 1. Comportamiento y dimensiones de las antípodas de Carludovica palmata	.54

# ABREVIATURAS

1n	Haploide
2n	Diploide
BAP	6-bencilaminopurina
CA	Célula apical
СВ	Célula basal
CC	Cámara chalazal
СМ	Cámara micropilar
DDA	Días después de la antesis
DAA	Days after anthesys
E. E	Eje ecuatorial
E. P	Eje Polar
e.g.	Exepli gratia (for example)
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
IAA	Ácido indolacético
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
MGP	Medio de Germinación Polen
MS	Murashige y Skoog
M S. N. M.	Metros sobre el nivel del mar
Ν	Norte
0	Oeste
PAS-ANN	Periodic Acid-Schiff – negro azul de naftol
P. E	Por ejemplo
PB	Buffer fosfato
PCD	Programmed Cell Death
Rep	Repetición
RAM	Meristemo apical de raíz
SAM	Meristemo apical de brote
ТА	Tercio apical
ТВ	Tercio basal
ТМ	Tercio medio

#### RESUMEN

Carludovica palmata Ruiz & Pavón (Cyclanthaceae) es una especie introducida a la península de Yucatán y de interés agro-artesanal, ya que tiene un impacto importante en la economía de familias del norte de Campeche y Sur de Yucatán. Su cultivo se realiza bajo prácticas agrícolas tradicionales como la eliminación de las estructuras florales emergentes con el fin de maximizar la cosecha de cogollos. Aunque esta especie presenta reproducción vía sexual, las prácticas empíricas, el alto porcentaje de abortos en semillas y su baja germinación han propiciado que sea propagada exclusivamente a partir de hijuelos (vía clonal); en consecuencia, el empobrecimiento de la diversidad genética en las poblaciones de C. palmata puede tener consecuencias significativas en la vulnerabilidad de los individuos frente al ataque de patógenos y enfermedades. Aunque programas de fitomejoramiento en la especie han comenzado a despertar interés; la probabilidad de encontrar dentro de las poblaciones genotipos élites, con más de un carácter deseable (p. e. mayor cosecha de cogollo por individuo, cogollo largo, fibra de calidad) se reduce en ausencia de recombinación genética; de modo que, el fitomejoramiento hoy en día es una tarea difícil, sobre todo si no se amplía la información que se tiene sobre su fase reproductiva sexual, incluyendo su germinación. Por tanto, en este estudio se incrementaron los conocimientos sobre el desarrollo de la semilla, caracterizando desde las líneas germinales maduras hasta su germinación. Se encontró que el grano de polen es pequeño, monoporado, prolado y bicelular, presenta baja viabilidad (7.43  $\pm$  0.50 %) y germinación precoz (4.66  $\pm$  0.88 %). El saco embrionario consta de ocho núcleos diferenciados en una ovocélula, dos sinérgidas, una célula central y tres antípodas. La doble fecundación asincrónica ocurre a los 9 días después de antesis (DDA), iniciando el desarrollo de la semilla que se completa hasta los 100 DDA, durante este período ocurren cambios anatómicos, morfológicos e histoquímicos (presencia y distribución de polisacáridos, proteínas y lípidos) que se dividen en: (i) morfogénesis y (ii) maduración. Simultáneamente, ocurre una endospermogénesis helobial con celularización centrípeda y una embriogénesis cigótica subdividida en: (A) ontogenia, (B) patrón y crecimiento y (C) maduración. El embrión maduro es axial, lineal y antítropo (2449.72 ± 161.5 µm ×2145.35 ± 78.0271 µm). Además, se encontraron tres factores asociados con el limitado éxito y obtención de semillas maduras: (1) anomalías en el megagametofito, (2) ausencia de fecundación y (3) abortos; mientras que, se identificaron dos sucesos implicados con los problemas de germinación: (1) presencia de cutícula e (2) idioblastos-rafidios (oxalato de calcio). Finalmente, la semilla de C. palmata presenta latencia fisiológica que se rompe por escarificación química y tiene una germinación hipógea.

#### ABSTRACT

Carludovica palmata Ruiz & Pavon is a species introduced to the Yucatan peninsula and of agroartisanal interest, as it has an important impact on the economy of families in northern Campeche and southern Yucatan. Its cultivation is carried out under traditional agricultural practices such as the elimination of the emerging floral structures in order to maximize the harvest of buds. Although this species reproduces sexually, empirical practices, the high percentage of seed abortion and its low germination have led it to be propagated exclusively from suckers (clonal); consequently, the impoverishment of genetic diversity in C. palmata populations could have significant consequences in the vulnerability of individuats to attack by pathogens and diseases. Although breeding programs for the species have begun to arouse interest, the probability of finding elite genotypes within the populations, with more than one desirable trait (e.g. greater yield of bud per individual, long bud, quality fiber) is reduced in the absence of genetic recombination; thus, breeding today is a difficult task, especially if the information we have about its sexual reproductive phase, including its germination, is not expanded. Therefore, in this study we sought to increase our knowledge about seed development, characterizing from the mature germline to germination. It was found that the pollen grain is small, monoporate, prolate and bicellular, with low viability  $(7.43 \pm 0.50 \%)$  and early germination  $(4.66 \pm 0.88 \%)$ . The embryo sac consists of eight nuclei differentiated into one eggcell, two synergids, one central cell and three antipodal cells. Asynchronous double fertilization occurs at 9 days after anthesis (DAA), initiating the development of the seed, which is completed until 100 days after anthesis (DAA). During this period, anatomical, morphological and histochemical (presence and distribution of polysaccharides, proteins and lipids) changes occur, which are divided into: (i) morphogenesis and (ii) maturation. Simultaneously, helobial endospermogenesis occurs with centripetal cellularization and zygotic embryogenesis subdivided into (A) ontogeny, (B) patterning and growth and (C) maturation. The mature embryo is axial, linear and antitropic (2449.72 ± 161.5 µm  $\times$ 2145.35 ± 78.0271 µm). In addition, three factors were found to be associated with the limited success and obtaining mature seeds: (1) megagametophyte abnormalities, (2) absence of fertilization and (3) abortions; while two events were identified to be involved with germination problems: (1) presence of cuticle and (2) idioblast-phrysidia (calcium oxalate). Finally, C. palmata shows physiological dormancy that is broken by chemical scarification and has a hypogean germination.

# INTRODUCCIÓN

*Carludovica palmata* conocida comúnmente como jipi, jipijapa o palma jipi, es una planta monocotiledónea de hábito rizomatoso que llega a formar grandes colonias; alcanza entre uno a dos metros de alto; presenta largos peciolos acanalados con hojas características, plegadas y subdivididas (Bennet *et al.*, 1992; Harling, 1958); posee inflorescencias protoginias que nacen de las axilas de las hojas. Cada inflorescencia presenta flores unisexuales pistiladas y estaminadas distribuidas en la base del espádice en una proporción 1:4. Además, numerosas semillas son albergadas por cada infrutescencia (Sajo *et al.*, 2014; Harling *et al.*, 1998). Aunque esta planta es parecida a una palmera se clasifica dentro de la familia Cyclanthaceae debido a que carece de tallo. Crece, en su mayoría en el continente Americano, en bosques tropicales húmedos y en áreas de alta luz solar (USDA & NRCS, 2021; Bacab-Caamal, 2020; Muñoz & Tuberquia, 1999; Harling *et al.*, 1998).

En México, su cultivo se practica en la Península de Yucatán, específicamente en el norte del estado de Campeche donde fue introducida en 1866 (Fadiman, 2001). De manera similar a lo que ocurre en Centroamérica, pobladores de Santa Cruz Ex Hacienda, Nunkiní y Bécal (Calkiní, Campeche), aprecian sus fibras naturales por su durabilidad, flexibilidad, color y capacidad para biodegradarse (Moo-Huchin *et al.*, 2019). Debido a estas características sus fibras son utilizadas para la fabricación artesanal de sombreros, carteras, joyería y demás objetos, representando de esta manera una actividad económica tradicional que incluye la participación de familias enteras en localidades mayas de la zona y sobre la cual se basa la economía regional (Moo-Huchin *et al.*, 2019). En años recientes, esta actividad se ha convertido en una fuente potencial de desarrollo agro-artesanal con importancia internacional. Además, la búsqueda de desarrollo, innovación y sustentabilidad para el sector agroindustrial y de materiales bio-compuestos ha despertado el interés de instituciones mexicanas y ha impulsado la investigación de *C. palmata* desde perspectivas que incluyen el análisis de sus fibras hasta su mejoramiento genético.

El ciclo de vida de *C. palmata* se compone por una sucesión de fases de crecimiento vegetativo, desde la etapa juvenil hasta la etapa adulta, momento en el que adquiere la capacidad de propagarse vía rizoma; adicionalmente la planta presenta otra estrategia reproductiva, siendo por vía sexual con la generación anual de semillas. Sin embargo, al haber un bajísimo porcentaje de germinación, su cultivo en los agroecosistemas tradicionales denominados solares se ve limitada y únicamente se realiza por el trasplante de hijuelos, que previamente han sido extraídos de la colonia y podados completamente (Bacab-Caamal, 2020; Ortega-Haas, 2016; Perea-Mercado *et* 

### INTRODUCCIÓN

*al.*, 2012). Este tipo de siembra ha permitido expandir las plantaciones, transcurriendo 18 meses desde el período de regeneración hasta la cosecha de los primeros cogollos. Sin embargo, el manejo agronómico empírico ha limitado la producción de los cultivos y ha llevado a una sobreexplotación, causando escasez de cogollo y desabasto de materia prima para los artesanos, situación que ha puesto en riesgo su potencial económico y ha condicionado su producción para satisfacer las necesidades del mercado.

No obstante, el problema más grave derivado del uso de propagación vegetativa como método de cultivo de *C. palmata* es que no implica recombinación genética, por lo que la variabilidad genética en las poblaciones probablemente sea baja; ocasionando que las poblaciones sean más susceptibles frente al ataque de plagas y patógenos causantes de enfermedades como el síndrome de amarillamiento foliar asociado a fitoplasma que se ha reportado que puede llegar a repercutir en una pérdida anual estimada del 10% de la población de esta especie (Cordova *et al.*, 2000). Además, ya que es una especie introducida, el mantenimiento y producción de los agroecosistemas tradicionales requiere de riego frecuente y condiciones específicas, que en los próximos años y debido a los efectos asociados al cambio climático (p. e. disponibilidad de agua, aumento de la temperatura, frecuencia e intensidad de fenómenos meteorológicos) podrían ser afectadas (Metcalfe *et al.*, 2020; Rodríguez-Huerta *et al.*, 2019), llevando incluso a que varios genotipos se extingan localmente.

Debido a su importancia económica, diversas instituciones gubernamentales mexicanas están interesados en iniciar programas de fitomejoramiento en *C. palmata*, pero estos proyectos son difíciles de llevar a cabo con éxito debido a dos principales limitantes: (1) El sistema de propagación clonal implementado ha ocasionado que los caracteres deseables en un individuo (p. e. calidad de fibra, resistencia a plagas, longitud de cogollo, mejor adaptabilidad a las condiciones de la región) se puedan encontrar dentro de los cultivos pero en líneas clonales diferentes; (2) mientras que el manejo agronómico tradicional (p. e. eliminación de las estructuras florales emergentes para maximizar la cosecha de cogollos) ha limitado los estudios y el entendimiento sobre su reproducción sexual y su unidad reproductiva. En consecuencia, entre los principales retos, se encuentran: el incremento de la variabilidad genética y un mejor entendimiento sobre su fase reproductiva. Por ello, el presente estudio plantea incrementar los conocimientos que se tienen sobre la semilla de *C. palmata*, estudiando y caracterizando su desarrollo desde enfogues anatómicos, morfológicos, estructurales e histoquímicos.

# **CAPÍTULO I**

# 1.1. ANTECEDENTES

### 1.1.1. CICLO DE VIDA DE LAS ANGIOSPERMAS

Las plantas con flores comprenden más de 352 000 especies; debido a la protección de sus órganos reproductores y al desarrollo de diversas estrategias versátiles han podido colonizar con éxito diversos ecosistemas (Soltis *et al.*, 2018; Hafidh *et al.*, 2016; The-Plant-List, 2013). Para asegurar su perpetuación y en respuesta al entorno, las angiospermas pueden reproducirse vía sexual y/o asexual, propagarse vegetativamente e inclusive, plantas de interés biológico son micropropagadas *in vitro* (ver figura 1.1) (Hewitt, 2020; Barrett, 2015; Tucker & Koltunow, 2009).

## 1.1.2. REPRODUCCIÓN SEXUAL EN ANGIOSPERMAS

La reproducción sexual comprende los mecanismos de intercambio de material genético que conducen a la variabilidad, mediante la segregación por meiosis, recombinación y fusión sexual (Fernandes Cardoso *et al.*, 2018). Se basa en dos principios-beneficios: (i) generar variabilidad y (ii) promover el flujo genético mediante el intercambio e incorporación de genes (Gniech Karasawa *et al.*, 2015). Este tipo de reproducción suministra una fuente de variación y selección para la evolución, más rápida que la mutación y disminuye la susceptibilidad de una población frente a perturbaciones, plagas, enfermedades y condiciones adversas (Yang & Kim, 2016; Lei, 2010), pero implica un gasto energético alto para la planta y en ausencia de polinizadores, puede ser una desventaja (Gniech Karasawa *et al.*, 2015).

Un ciclo de reproducción sexual en angiospermas se distingue por dos procesos fundamentales: meiosis y doble fertilización, además de divisiones mitóticas sucesivas, que en conjunto originan semillas; resultando en una alternancia de generaciones de gametofitos haploides y esporofitos diploides (ver figura 1.1). La generación gamética comienza con la diferenciación de las células madre megasporas y microesporas en los esporangios que culminan en la maduración del saco embrionario y el grano de polen respectivamente. Ambos son dependientes del tejido esporofítico, excepto cuando el grano de polen es transportado hacia el estigma (Gniech Karasawa *et al.*, 2015; Poethig, 2013; Lionakis Meyer, 2005). Mientras que, el esporofíto se refiere a toda la porción visible de la planta a través de su crecimiento, siendo el cigoto la primera célula de la siguiente generación (Hafidh *et al.*, 2016; Biancucci *et al.*, 2015). Simultáneamente, la planta exhibe cambios anatómicos y morfológicos que se pueden agrupan en dos fases: (1) vegetativa y (2) reproductiva, siendo el momento y la duración del "cambio de fase vegetativa"

dependiente de programas genéticos activados y modulados por estímulos ambientales y endógenos (Huijser & Schmid, 2011). La fase vegetativa inicia con la ruptura de la testa y se asocia con el crecimiento e incremento de la capacidad fotosintética, masa y complejidad estructural, subdividiéndose en juvenil y adulta. En cambio, la fase reproductiva indica madurez, presenta formación de órganos y estructuras reproductivas situadas en flores, seguida por la muerte de la planta o la reversión a la fase vegetativa adulta (Snider & Oosterhuis, 2011).



**Figura 1. 1. El ciclo de vida típico de la angiosperma** *Hieracium pilosela* (Asteraceae). Esperma (SC), célula vegetativa (VC), célula central (CC), célula huevo (EGG), célula sinérgica (SYM), meristemo apical de brote (SAM), meristemo apical de raíz (RAM) (modificado de Schmidt *et al.*, 2015).

La fase reproductiva sucede en tres etapas: (i) gametogénesis, ocurre dentro de anteras y ovarios florales (Hafidh *et al.*, 2016; Biancucci *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2015); (ii) fase progámica que comprende la polinización y doble fertilización (Snider & Oosterhuis, 2011); y finalmente (iii) el desarrollo embrionario que inicia con la formación del cigoto y finaliza con la maduración del embrión dentro de la semilla (Poethig, 2013).

### 1.1.3. GAMETOFITOS: GENERALIDADES E IMPORTANCIA EN ANGIOSPERMAS

En angiospermas, los gametofitos constituyen la generación haploide y pueden ser masculinos (grano de polen) o femeninos (saco embrionario). La gametogénesis sucede dentro de los esporangios, inicia con el desarrollo de células germinales y finaliza con la obtención de gametos maduros (Hisanaga *et al.*, 2019). La integridad de los gametofitos maduros es un paso crítico y crucial para lograr el éxito reproductivo sexual, ya que la expresión incorrecta de los genes haploides, un patrón no característico o células abortivas durante su desarrollo, pueden afectar significativamente la calidad del gametofito, impedir que ocurra la doble fecundación, e inclusive afectar el desarrollo del endospermo y el embrión (Hisanaga *et al.*, 2019; Chetor *et al.*, 2016; Ma & Sundaresan, 2010). Debido al pequeño tamaño, alta reducción celular, corta vida útil e inaccesibilidad de los gametofitos durante la gametogénesis, su comprensión sigue siendo deficiente en comparación con lo que se conoce del esporofito diploide (Ma & Sundaresan, 2010).

#### 1.1.3.1. Gametofito masculino, microgametofito o grano de polen

La función del microgametofito es producir y entregar gametos masculinos al saco embrionario (Sharma *et al.*, 2014). El grano de polen participa en dos fases dentro de la etapa reproductiva de angiospermas. La primera fase tiene que ver con desarrollo, ocurre dentro de los sacos polínicos en las anteras y consta de (i) microesporogénesis, que incluye los eventos que conducen a la diferenciación de las microesporas y (ii) microgametogénesis, que abarca los sucesos que llevan a su desarrollo y madurez (ver figura 1.2). La segunda fase está relacionada con su función y hace referencia a las interacciones que se dan en el pistilo de la flor que le recibe e incluye su hidratación y germinación. (Hafidh *et al.*, 2016; Biancucci *et al.*, 2015; Honys *et al.*, 2006). El grano de polen maduro se caracteriza por: (a) la especialización funcional de dos tipos celulares que representan la línea germinal masculina: una célula vegetativa y una célula generativa, ésta última sufre una segunda división previo o después de la polinización y da origen a dos espermas; (b) una o más aperturas y (c) una pared integrada por intina y exina. La capa de exina es característica de cada especie, brinda protección contra la desecación, ayuda a

retener los factores químicos dentro de las cámaras de la columela y facilita la comunicación con la superficie del estigma (Hafidh *et al.*, 2016; Gniech Karasawa *et al.*, 2015).



Figura 1. 2. Esquema del desarrollo del grano de polen (modificado de Honys et al., 2006).

#### 1.1.3.2. Gametofito femenino, megagametofito o saco embrionario

El megagametofito contiene la ovocélula y la célula central que al fertilizarse dan lugar al embrión y al endospermo respectivamente (Guo & Zheng, 2013; Yang *et al.*, 2010). El saco embrionario se desarrolla a partir de un megasporocito diploide, dentro del megasporangio (nucelo). El nucelo generalmente está rodeado por una (unitégmico) o dos capas (bitégmico) de tegumentos pertenecientes a un óvulo localizado dentro del ovario floral (Coen & Magnani, 2018; Lionakis Meyer, 2005). El número de óvulos, el tipo (anátropo, ortótropo o campilótropo) y la posición del ovario varían entre especies (Endress, 2011; Lionakis Meyer, 2005). La formación del saco embrionario ocurre en dos etapas: (1) megasporogénesis, que puede ser mono-, bis- o tetraspórica, comprende la formación y maduración de los productos meióticos iniciales a partir de la célula madre; mientras que (2) la megagametogénesis se inicia con divisiones mitóticas sucesivas, migración nuclear y celularización hasta la maduración del saco embrionario (ver figura 1.3) (Guo & Zheng, 2013; Yang *et al.*, 2010). La categorización dentro de los 10

tipos de gametofitos femeninos maduros existentes (*Polygonum* monospórico, *Oenothera* monospórico, *Allium* bisporico, *Adoxa* tetrasporico, *Plumbado* tetrasporico, *Penaea* tetrasporico, *Peperomia* tetraspórico, *Drusa* tetrasporico, *Frittilaria* tetrasporico y *Plumbagella* tetrasporico) depende del número de divisiones y la disposición de núcleos/células durante su desarrollo, siendo el de tipo *Polygonum*, con ocho núcleos haploides y siete células, el más común (Gniech Karasawa *et al.*, 2015; Schmid *et al.*, 2015; Drews & Koltunow, 2011; Yang *et al.*, 2010; Lionakis Meyer, 2005; Raghavan, 2003).



Figura 1. 3. Esquema del desarrollo del saco embrionario (modificado de Drews & Koltunow, 2011)

### 1.1.4. FASE PROGÁMICA: GENERALIDADES E IMPORTANCIA EN ANGIOSPERMAS

La fase progámica es una de las fases más críticas en el ciclo reproductivo sexual en angiospermas, ya que el destino de los gametos masculinos después de que el polen llega a los estigmas vincula la polinización con la fertilización del óvulo, lo que rige el éxito posterior de reproducción y la producción de semillas (Steinacher & Wagner, 2013b). Todos los procesos que la integran son secuenciados y deben estar altamente coordinados para que la fertilización tenga éxito (Zakharova *et al.*, 2022). Al ser la fase progámica extremadamente vulnerable a las condiciones ambientales predominantes, la temperatura es un parámetro que suele afectar

funciones (p. e. la receptividad del pistilo) y procesos (p. e. germinación del polen, crecimiento del tubo polínico) cruciales en esta etapa (Steinacher & Wagner, 2011a). Aunque en esencia, la fase progámica comprende principalmente los mecanismos subyacentes de la interacción del microgametofito con los tejidos derivados de esporofito femenino (germinación y elongación del tubo polínico) y con el megagametofito (doble fecundación), otros procesos como la antesis y la polinización *sensu stricto* también forman parte de esta fase (Raja *et al.*, 2019); sin embargo, para fines de este estudio únicamente se detalla más a fondo la doble fecundación.

### 1.1.4.1. Doble fecundación

El evento de doble fecundación se puede dividir en tres pasos (ver figura 1.4): (1) descarga del tubo polínico (Hamamura *et al.*, 2012; Raghavan, 2003); (2) inmovilidad de los espermas en la región límite del saco embrionario (Berger *et al.*, 2008) y por último, (3) la doble fecundación *sensu stricto*, donde la ovocélula y la célula central se fusionan con un esperma cada uno para dar lugar a un cigoto diploide y un núcleo de endospermo primario triploide respectivamente (Biancucci *et al.*, 2015; Schmid *et al.*, 2015; Lionakis Meyer, 2005).



**Figura 1. 4. Modelo esquemático de la doble fecundación.** (A) crecimiento del tubo polínico. (B) atracción por las sinérgidas. (C) doble fecundación (tomado de Berger *et al.*, 2008).

#### 1.1.5. SEMILLA: GENERALIDADES E IMPORTANCIA EN ANGIOSPERMAS

La semilla es un óvulo fertilizado y maduro; ayuda a la dispersión, colonización de nuevos hábitats y perpetuación de la especie; en angiospermas se encuentra localizada al interior de frutos (Coen & Magnani, 2018; Catusse *et al.*, 2012). Aunque las semillas suelen diferir parcial o totalmente en su morfología y anatomía, en todas las especies, se identifican: (i) un embrión con uno o dos cotiledones, (ii) nutrientes almacenados en tejidos como el endospermo o los cotiledones y (iii) una capa protectora de cubiertas seminales (ver figura 1.5); la coordinación entre estos tres elementos determina el tamaño y peso final (Su *et al.*, 2021; Baroux &

Grossniklaus, 2019; Sreenivasulu & Wobus, 2012; Sabelli, 2012; Lionakis Meyer, 2005). En monocotiledóneas, (1) el embrión tiene un único cotiledón cuyo tiempo de maduración depende de la especie; (2) las reservas energéticas son generalmente lípidos, carbohidratos y a veces proteínas; (3) la cubierta puede ser permeable, impermeable, dura, blanda, etc. y (4) tiene estructuras especializadas como el micrópilo y el hilo (Baroux & Grossniklaus, 2019; de la Cuadra, 2008; Finkelstein *et al.*, 2008). Su análisis puede ser, con base en su tolerancia a la desecación: en ortodoxas, intermedias o recalcitrantes (Han & Yang, 2015; Hamilton *et al.*, 2013; Alpert, 2005; Roberts, 1973); o de acuerdo con su nivel de madurez (Barbedo *et al.*, 2013).





#### 1.1.5.1. Desarrollo de la semilla en monocotiledóneas

El desarrollo en semillas se rige por tres tejidos, cada uno con funciones genéticas diferentes: un embrión diploide, un endospermo triploide (ambos tejidos filiales) y una cubierta seminal diploide (tejido materno) (Shin *et al.*, 2022; Lin *et al.*, 2017). Este proceso inicia inmediatamente después de la doble fecundación y culmina con la maduración de la semilla (Domínguez & Cejudo, 2014). Aunque tanto en mono- como en dicotiledóneas, hay eventos conservados (p. e. doble fecundación, muerte celular programada, mecanismo de celularización del endospermo) las etapas finales del desarrollo revelan diferencias notables entre ambos (Locascio *et al.*, 2014). Gracias al empleo de diversas técnicas de microscopía e histología complementadas con herramientas genéticas y moleculares (Doll & Ingram 2022; Wang *et al.*, 2022; Maruyama *et al.*, 2020) se ha dilucidado que, la coordinación de los tres compartimentos principales ocurre por medio de un complejo, estricto, constante intercambio de señales (p. e. translocación de sacarosa, péptidos, hormonas vegetales, estímulo mecánico) y seguimiento de vías metabólicas.

Los cambios en los patrones de expresión génica bajo condiciones ambientales características, en un tiempo y en un espacio determinado controlan la coordinación; ya que conducen a (i) la comunicación célula- célula (dinámicas celulares) (Shin *et al.*, 2022), (ii) la integración y organización de la distribución celular, (iii) la determinación del destino celular y (iv) el control progresivo a través del desarrollo exitoso de la semilla (Wang *et al.*, 2022; Figuereido *et al.*, 2016). La falla en esta comunicación puede causar alteración en el tamaño, embriones y futuras plántulas defectuosas e inclusive el aborto de la semilla (Dante *et al.*, 2014; Locascio *et al.*, 2014).

El proceso de desarrollo de la semilla en monocotiledóneas se puede dividir en dos fases principales (ver figura 1.6): (a) morfogénesis o fase celular, y (b) maduración, la duración de cada una depende de la especie. La morfogénesis, inicia con la formación del cigoto, se caracteriza por la proliferación y diferenciación celular en los tejidos filiales; en el embrión se establece el eje apical-basal integrado por un meristemo apical del brote (SAM) y un meristemo apical de la raíz (RAM); también se desarrollan los progenitores del sistema tisular: la protodermis, el meristemo fundamental y el procámbium, mientras que el endospermo experimenta proliferación nuclear y/o celular y una diferenciación celular posterior (Jo *et al.*, 2019; Locascio *et al.*, 2014). Los diferentes tipos de ciclos celulares (división celular asimétrica, mitosis acitocinética, mitosis, endorreduplicación) ocurren con frecuencia de manera secuencial pero superpuesta durante el desarrollo del embrión y el endospermo (Dante *et al.*, 2014).

Por su parte, la maduración es el proceso fisiológico que finaliza con el inicio del estado de latencia de la semilla; en esta etapa, se disminuye la síntesis de ARN y proteínas; se detiene la actividad del ciclo celular; en monocotiledóneas hay síntesis y acumulación masiva de sustancias de reservas en cuerpos proteicos (vacuolas especiales o vesículas), cuerpos lipídicos (oleosomas o esferosomas) y carbohidratos (amiloplastos) que ocasionan expansión celular tanto en el embrión como en el endospermo (Sreenivasulu & Wobus, 2012; Matilla, 2008). Asimismo, la semilla se empieza a deshidratar (en especies recalcitrantes se llega a perder cerca del 95% de su contenido de agua), aumentando el gradiente de solutos celulares, en el endospermo se forma un sistema en membrana en gel, el embrión sufre reprogramación de expresión génica y las cubiertas seminales se endurecen por enriquecimiento en sustancias céreas, cutina o lignina. En general, la semilla es inducida a un metabolismo quiescente (Jo *et al.*, 2019; Devic & Roscoe, 2016; Locascio *et al.*, 2014; Sreenivasulu & Wobus, 2012). Por lo tanto, una semilla madura posee un completo desarrollo morfológico (obtenido sobre la planta madre) y fisiológico (reajuste de equilibrio hormonal, previo a la germinación) (Wang *et al.*, 2022; Doria, 2010).

Las fitohormonas juegan un papel crucial, puesto que su presencia y cantidad, comprenden las señales que inducen/inhiben procesos particulares dentro de los cambios bioquímicos, morfológicos, estructurales y de expresión génica (Gniech-Karasawa *et al.*, 2015; Han & Yang 2015; Lionakis Meyer 2005) (ver figura 1.6): (a) la auxina, se mantiene en niveles altos y constantes desde la fertilización hasta la maduración, mientras que el patrón de (b) las citocininas y (c) los brasinoesteroides revelan mayor presencia durante las etapas de división celular y disminuyen progresivamente durante la fase de maduración; (d) las giberelinas muestran dos picos que corresponden al momento en el que el embrión se diferencia (crecimiento y expansión celular) y al final de la maduración (activación de enzimas proteolíticas); en cambio (e) el ácido abscísico muestra un patrón de acumulación complementario a las giberelinas, siendo el principal responsable de inhibir la germinación (Devic & Roscoe, 2016; Locascio *et al.*, 2014).



Figura 1. 6. Representación esquemática de los procesos que tienen lugar durante el desarrollo de semillas en maíz (monocotiledónea). Las etapas indican días después de la polinización (DAP). Se muestra la progresión del desarrollo de la semilla desde la definición del cenocito hasta la celularización del endospermo y la progresiva desaparición de la vacuola central. El proceso de maduración, además de otras modificaciones finaliza con la expansión del endospermo que ocupa la mayor parte de la semilla y la acumulación de almidón en sus células que progresivamente sufren muerte celular programada. También se muestra la tendencia esquemática de la acumulación de hormonas durante el desarrollo de la semilla (modificado de Locascio *et al.*, 2014).

### 1.1.5.2. Embriogénesis cigótica en monocotiledóneas

Durante la embriogénesis cigótica, las identidades celulares se diferencian de *novo*, comenzando por una sola célula denominada cigoto, cuya formación incluye la fusión del protoplasma

(plasmogamia) y de los núcleos (cariogamia) de la ovocélula y el esperma, propiciando recombinación (Dresselhaus & Jürgens, 2021; Bleckmann *et al.*, 2014); hasta la maduración y el establecimiento de poblaciones de células madre en los extremos opuestos del eje embrionario, reconocidos como RAM y SAM (Radoeva *et al.*, 2019; Poethig, 2013; Huijser & Schmid, 2011). A nivel morfohistológico, la embriogénesis *sensu stricto* se completa una vez fijados los elementos básicos del embrión, por lo que este proceso puede dividirse en tres fases generales: (1) la histodiferenciación que inicia con la formación del cigoto y finaliza con la formación de un proembrión (ontogenia), (2) el diseño y crecimiento del embrión, período en el que se establecen los sistemas de órganos y tejidos y finalmente (3) la maduración, que se caracteriza por la expansión celular, la acumulación de macromoléculas de almacenamiento y desecación con quiescencia metabólica (Juarez-Escobar *et al.*, 2021; Germaná & Walker, 2016).

En monocotiledóneas, la embriogénesis cigótica se ha investigado con menos detalle, siendo los estudios principalmente en miembros de la familia Poaceae como arroz y maíz, cuyos embriones muestran características específicas (ver figuras 1.6 y 1.7) (Sreenivasulu & Wobus, 2012). Sobre todo, las primeras etapas del proceso no han sido bien caracterizadas debido a que el embrión es frágil y de difícil acceso (Juárez-Escobar et al., 2021). Sin embargo, gracias a los análisis histológicos y genéticos, se ha dilucidado que previo a la fecundación, el óvulo ya contiene múltiples vacuolas periféricas y su núcleo, rodeado por retículo endoplásmico y otros orgánulos, parece centralizado; después de la fertilización no se encoje ni repolariza, sino que se ha observado el movimiento inmediato del núcleo hacia el polo apical previo a la cariogamia, este movimiento adicional determina el futuro plano asimétrico de división celular; en consecuencia, el alargamiento del cigoto no tiene lugar y su polaridad es menos pronunciada (Dresselhaus & Jürgens, 2021; Zhao et al., 2017). La división cigótica es el primer y más crítico evento de división celular durante la embriogénesis temprana. El cigoto usualmente se divide transversal y asimétricamente por mitosis, dando lugar a: (i) una célula apical (CA) generalmente pequeña y (ii) una célula hija basal (CB) más grande con la mayoría de las vacuolas, la CB se divide con menos regularidad: la formación de los linajes de CA contiene planos de división celular transversales, longitudinales e intermedios. La CA dará origen a la mayoría de los tejidos del embrión, mientras que la CB formará un suspensor y contribuirá, en muchas especies, a la formación del RAM (Dresselhaus & Jürgens, 2021). Los linajes de ambas células se incorporan a un proembrión en forma de pera, donde son difíciles de distinguir entre sí (Zhao et al., 2017; Gniech Karasawa et al., 2015). La secuencia y orientación de las divisiones celulares durante la embriogénesis a partir de futuros ejes apical-basal-radial, son la base para la clasificación de los siete tipos principales de embriones: onagrad, asterad, solanad, caryophyllad, chenopodiad, piperad y paeonia. Desafortunadamente, éstos no se pueden conectar a grupos taxonómicos específicos, en consecuencia, no hay un desarrollo embrionario típico en mono- o dicotiledóneas. Sin embargo, análisis histológicos han demostrado que los proembriones en angiospermas son muy similares en su desarrollo hasta la etapa globular (Coen & Magnani, 2018; Dante & Sabelli, 2014); pero en monocotiledóneas se ha observado que, en la región apical, las iniciales cotiledonarias y epicotilares ocupan cada una la mitad del ápice y que las primeras se dividen más rápidamente. Esta tasa de crecimiento diferencial es la responsable de la impresión de que el ápice del brote se origina en una posición lateral (Lionakis Meyer, 2005). Durante este proceso, el óvulo continúa agrandándose para adaptarse al embrión en crecimiento (Schmid et al., 2015). En general, entre los principales rasgos distintivos de este proceso en monocotiledóneas, se incluyen: (i) patrones de división y linajes celulares menos organizados y poco claros, (ii), la ausencia de un suspensor típico, (iii) un eje apical-basal doblado, (iv) un único cotiledón originado a partir de células del cuadrante terminal del proembrión, (v) una polaridad dorsal (SAM) -ventral (cotiledón) y (vi) presencia de tejidos especializados como escutelo, coleorriza (Radoeva et al., 2019; Zhao et al., 2017; Sreenivasulu & Wobus, 2012).



Figura 1. 7. Esquema del desarrollo embrionario en monocotiledóneas (Poaceae). (Modificado de Armenta-Medina *et al.*, 2021 y Dresselhaus & Jürgens, 2021)

#### 1.1.5.3. Desarrollo del endospermo en monocotiledóneas

El endospermo juega un papel clave en la nutrición del esporofito durante la embriogénesis (Dante & Sabelli, 2014; Sabelli, 2012) y en la integración de señales e intercomunicación entre los compartimientos de la semilla (Berger *et al.*,2006). Se han identificado tres patrones característicos de endospermogénesis (ver figura 1.8): (a) el más usual y mejor caracterizado es

el nuclear y consiste en una fase proliferativa temprana por mitosis acitocinética que genera un sincitio, siendo la posterior celularización consecuencia de la reorganización del citoesqueleto; (b) el celular, ocurre por procesos mitosis-citocinesis; (c) el helobial, donde la primera división incluye citocinesis y luego una de las células hijas experimenta procesos de mitosis acitocinética (Becraft & Gutierrez-Marcos, 2012; Sabelli, 2012; Tobe & Kadokawa, 2010). Los dos primeros pueden ocurrir en todas las angiospermas, mientras que el helobial solo se ha reportado para familias monocotiledóneas como Bromeliaceae (*Billbergia nutans*) (Dorval & Araujo, 2021) y Araceae (Tobe & Kadokawa, 2010).

En monocotiledóneas como el maíz, el endospermo es de tipo nuclear, persiste hasta la maduración ya que constituye un compartimiento importante para el almacenamiento de nutrientes (almidón, proteínas, lípidos y celulosa) (Becraft & Gutierrez-Marcos 2012) así como para el control de la germinación (Locascio *et al.*, 2014). Cuatro tipos de células se diferencian y caracterizan: (i) la capa de transferencia del endospermo basal, la capa de aleurona, el endospermo amiláceo y las células de la región que rodea al embrión (Liu *et al.*, 2022; Locascio *et al.*, 2014). La maduración celular en el endospermo ocurre sobre células individuales, incluso mientras se dividen activamente, ya que las células comienzan la acumulación de compuesto hasta que se llenan por completo (Becraft & Gutierrez-Marcos 2012).



Figura 1. 8. Tipos de endospermo (modificado de Tobe & Kadokawa, 2010).
#### 1.1.5.4. Desarrollo de las capas seminales en monocotiledóneas

Las capas seminales conforman la cubierta de la semilla y están integradas por varios tipos celulares, su desarrollo es a partir de tejido integumental materno, más del 50% de angiospermas son bitégmicas (testa y tegmen); el resto es monotégmica (Baroux & Grossniklaus, 2019; de la Cuadra, 2008; Finkelstein *et al.*, 2008). Su desarrollo y maduración precede a la de los tejidos filiales, su estructura y composición influyen para la quiescencia, latencia y germinación. En monocotiledóneas como la cebada, tras una fase inicial de división continúa una diferenciación del pericarpio que implica un alargamiento celular a lo largo del eje longitudinal y que coincide con la celularización del endospermo; un proceso similar ocurre en la cariópside del maíz (Sabelli, 2012). La modificación en el grosor y su composición por acumulación de polisacáridos, lignina, lípidos, etc. es en respuesta a la adaptación al ambiente y a las estrategias reproductivas. Tras la maduración, la cubierta sufre muerte celular programada y establece una barrera protectora, además de regular la entrada-salida de gases y agua (Coen & Magnani, 2018).

#### 1.1.6. LATENCIA EN SEMILLAS

La latencia es el fracaso de una semilla madura, viable e intacta para completar la germinación durante un período de tiempo concreto bajo condiciones favorables (Ali *et al.*, 2022; Bewley *et al.*, 2013; Finch-Savege & Leubner-Metzger, 2006; Baskin & Baskin, 2004). Es uno de los fenómenos menos comprendidos en el campo de la biología de la semilla, ya que puede llegar a ser compleja y deberse a diversas causas. Está determinada por la genética, mediada parcialmente por fitorreguladores como el ácido abscísico y las giberelinas e influenciada por las condiciones ambientales (p. e. luz, temperatura, cambios osmóticos, salinidad) (Sohn *et al.*, 2021; Hilhorst, 2011), la edad fisiológica de la planta madre e inclusive por la posición de la semilla. Esta propiedad en la semilla a su vez, es el resultado neto de dos fuerzas opuestas: la fuerza de empuje del embrión (crecimiento embrionario potencial) y las restricciones ejercidas por los tejidos que lo rodean.

En consecuencia, una diversa gama de mecanismos de latencia ha evolucionado, de acuerdo con la diversidad de climas y hábitats en los que operan. Existen varias clasificaciones: (i) aquella basada en los componentes que inhiben la germinación, endógeno (embrión) o exógeno (tejidos que rodean al embrión) (Hilhorst, 2011); (ii) la que toma en cuenta el momento de su aparición y toma como primaria al tipo de latencia que ocurre antes de la dispersión o secundaria, después de su dispersión (De la Cuadra, 2008). Sin embargo, el sistema de clasificación más utilizado en la actualidad es el propuesto por Baskin y Baskin (2004), ya que es integral y jerárquico debido

a que está basado en la dependencia de las características fisiológicas y morfológicas de la semilla. Los tratamientos para romper cada tipo de latencia, así como la caracterización de cada una, se resumen en la tabla 1.1.

Tabla	1. 1	1. C	Clasifi	cación	de	tipos	de	latencia	ı en	semillas	(Baskin	&	Baskin,	1998;	actualiza	ido en
2004).																

Clase	Fisiológica	Morfológica	Física	Combinada	Morfofisiológica	
Ubicación del bloqueo	Bloqueos metabólicos en el embrión + cubiertas.	Embrión subdesarrollado (tamaño) pero diferenciado.	Células empalizadas en la cubierta o en fruto.	Cubierta+ bloqueo metabólico.	Embriones subdesarrollados + bloqueo metabólico.	
Mecanismo fisiológico	Detención de crecimiento apical y meristemo de raíz.	Maduración incompleta del embrión en semilla madura.	Mayor resistencia mecánica, menor permeabilidad al agua, a los gases y a las hormonas.	Inhibición del movimiento interno/externo de agua, gases y no hay biosíntesis enzimática.	Embrión subdesarrollado y no hay crecimiento del mismo.	
Tratamientos	Estratificación en frío. Aplicación de estimulantes químicos (GA <sub>3</sub> , KNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).	Necesitan tiempo para crecer y desarrollarse.	Escarificación: Física (agua caliente). Mecánica (papel lija). Química (ácidos).	Estratificación en frío. Combinación de tratamientos.	Combinación de estratificación en frío/caliente + GA <sub>3.</sub>	
Acción	Bloqueo de inhibidores y lesión de tegumentos cercanos al RAM.	Desarrollo embrionario.	Lesión de tegumentos.	Lesión de tegumentos + bloqueo de inhibidores.	Desarrollo embrionario + bloqueo de inhibidores.	

#### 1.1.7. Carludovica palmata Ruiz & Pavón

#### 1.1.7.1. Generalidades

*Carludovica palmata* pertenece a la familia Cyclanthaceae (ver Tabla 1.2). Esta familia está constituida por 230 especies distribuidas en 12 géneros (Purseglove, 1972), de los que sólo un género (Cyclanthus) es considerado como un grupo monofilético aparte (Cyclanthoideae), mientras que el resto, al presentar un patrón morfológico similar en sus estructuras florales, se subagrupan como Carludovicoideae (Franz, 1999; Harling *et al.*, 1998,; French *et al.*, 1983; Harling, 1958). Actualmente, *C. palmata* es la especie más reconocida del género *Carludovica* (Leal, 2018; The-Plant-List, 2013; Harling, 1958), seguida de *C. dudrei* Mast, *C. rotundifolia* H. Wendl. Ex Hook. F y *C. sulcata* Hammel (Leal, 2018; The-Plant-List, 2013; Harling, 1958).

Rango	Nombre científico	Nombre común
Reino	Plantae	Plantas
Filo	Tracheophyta	Plantas vasculares
Superdivisión	Spermatophyta	Plantas de semilla
División	Magnoliophyta	Plantas con flores
Clase	Liliopsida	Monocotiledóneas
Subclase	Arecidae	
Orden	Cyclanthales <sup>+</sup> / Pandanales*	
Familia	Cyclanthaceae	
Género	Carludovica	
Especie	Carludovica palmata Ruiz &	Jipi, jipijapa, palma jipi, iraca, paja
	Pavón	toquilla (dependiendo de la región).

Tabla 1. 2. Clasificación taxonómica de C. palmata (USDA & NRCS, 2021; Bisby et al., 2010).

Con base a la clasificación de +(Dahlgreen et al., 2012; Cronquist, 1988); \* APG (Chase et al., 2016, 2009)

Esta monocotiledónea terrestre se caracteriza por ser acaulescente, poseer múltiples peciolos que nacen de un rizoma y formar colonias de varias plantas; su altura oscila entre uno a dos metros (ver figura 1.9 A) (Fadiman, 2001; Harling, 1958). Su hoja adulta consiste en un peciolo verde, cilíndrico y acanalado que conecta a una lámina foliar de hasta un metro de ancho, subdividida palmeadamente entre cuatro a cinco partidas en forma de cuña y además presenta una hástula adaxial y vaina (ver figura 1.9 B) (Ortega-Haas, 2016; Muñoz & Tuberquia, 1999; Wilder, 1978). Puesto que, las fibras de sus hojas tiernas sin abrir (cogollo) presentan cualidades idóneas para su manipulación como: longitud (30-50 cm), diámetro ( $10 - 20 \mu$ m), superficie lisa y alta tenacidad; constituyen la materia prima para la fabricación de artesanías (Medina-Vidal, 2018; Manzanero-Acevedo, 2005; Uc-Dzul, 1995) y además, les confiere un uso potencial en el sector de materiales biocompuestos (Moo-Huchin *et al.*, 2019; Kicińska-Jakubowska *et al.*, 2012; Moo-Chablé, 2011). Esta especie presenta mecanismos de reproducción sexual por proliferación

de semillas (Zambrano-Artega *et al.*, 2022; Bacab-Caamal, 2020) y de propagación vegetativa a partir de hijuelos originados en el rizoma (Ortega-Haas, 2016). Su estructura floral es de tipo espádice, envuelto por espatas que al caer dejan al descubierto estaminodios osmóforos (ver figura 1.9 C). Al madurar su infrutescencia deja expuestas bayas rojizas (ver figura 1.9 D) (Bacab-Caamal, 2020; Sajo *et al.*, 2014).



Figura 1. 9. Caracterización de *Carludovica palmata* (A) vista completa, (B) hoja, (c) inflorescencia e (D) infrutescencia madura.

#### 1.1.7.2. Distribución geográfica, cultivo y usos

La palma jipi crece en sitios abiertos (Bennet et al., 1992; Purseglove, 1972), requiere un suelo rico en humus y abundante agua, ya que tiende a deshidratarse con facilidad bajo luz directa (Staples & Herbst, 2005; Arancibia & López, 2004). Es originaria de la región comprendida entre América Central y el norte de Sudamérica, pero debido a su valor ornamental y uso como fuente de fibra, ha sido ampliamente introducida y cultivada en México, varías islas del Pacífico, (CABI, 2022) y en los continentes Asiático y Africano (USDA-ARS, 2020; PROTA, 2016) (ver figura 1.10 A). Actualmente, en el continente Americano, su distribución abarca desde el sureste de México hasta Bolivia Central (Muñoz & Tuberquia, 1999), área que se caracteriza por tener clima tropical, con un rango de altitud que va de 0 a 2000 metros sobre el nivel del mar (m s. n. m.), con temperaturas entre 22 a 26 °C y precipitación media anual menor a 300 mm (Bennet et al., 1992). En México, su cultivo radica en el estado de Campeche, donde la mayoría son de traspatio y localizados sobre suelos altamente orgánicos y profundos conocidos como luvisoles (Kan kab) y leptosoles (Txee'kel) (Moo-Huchin et al., 2019; Medina-Vidal, 2018; Ortega-Haas, 2016; Bennet et al., 1992). El mecanismo empleado para incrementar las áreas de cultivo, consecuencia de la alta demanda de sus fibras, se da mediante el trasplante de hijuelos podados y obtenidos por propagación vegetativa o por cultivo de rizomas recolectados de plantas adultas (Ortega-Haas, 2016; Fadiman, 2001).

El aprovechamiento de sus fibras para la elaboración de artesanías constituye el uso principal de *C. palmata* (CABI, 2022; Fadiman, 2001; Moo-Huchin *et al.*, 2019); sin embargo, en comunidades campesinas de Centro y Sudamérica, hay reportes que indican que los pobladores además usan sus fibras como materiales de amarre en la construcción de techos, escobas; elaboración de papel y artesanías comerciables; mientras que los cogollos y rizomas son destinados para la elaboración de platillos típicos. Asimismo, medicinalmente usan el meristemo masticado y la infusión de sus hojas para detener infecciones y hemorragias respectivamente (Harling *et al.*, 1998; Bennet *et al.*, 1992; García-Barriga, 1975).



**Figura 1. 10. Distribución de Carludovica palmata**. (A) A nivel mundial (Tomado de CABI 2022). (B) Localidades del noreste de la Península de Yucatán involucradas en su cultivo y manejo (Modificado de Bacab-Caamal 2020).

## 1.1.7.3. Importancia y problemática de la especie en el Sureste de México

Aunque su introducción a la península de Yucatán no es del todo clara (Medina-Vidal, 2018; Fadiman, 2001), las fibras de palma jipi han cobrado un papel importante dentro de la economía local de las poblaciones mayas, principalmente porque se han utilizado para el trenzado manual de sombreros, que en el mercado internacional pueden llegar a costar desde \$250.00 hasta más de \$5 000.00 (Hats, 2020). Si bien, el cultivo de *C. palmata* en la región norte de Campeche, se lleva a cabo principalmente en la comunidad de Santa Cruz Ex Hacienda, Calkiní; sus fibras son utilizadas en una porción de la zona limítrofe entre Campeche y Yucatán que comprende las localidades de Bécal, Cuch Holoch, Halachó, Santa Cruz Ex Hacienda, Concepción, Maxcanú y Tankuché, poblaciones que en conjunto forman una red agroartesanal y donde esta planta es sinónimo de potencial económico (ver figura 1.10 B) (Medina-Vidal, 2018). Adicionalmente a los sombreros, parte de la producción de cogollos se destina para el tejido de otras artesanías como abanicos, aretes, carteras, entre otros. Mientras que, el mercado para la venta de estos productos

ha incrementado a nivel internacional. En consecuencia, la demanda de cogollos en los últimos años va en aumento. Tan solo por cada sombrero, se necesitan entre 6 a 15 cogollos (Fadiman, 2001; Bennet *et al.*, 1992), pero el método de propagación empírico (vegetativo) resulta lento e ineficiente, por ello se han iniciado programas de micropropagación de esta especie con resultados preliminares alentadores.

Además, es necesario señalar que la semilla de *C. palmata* presenta problemas de germinación, aunado a las prácticas de propagación vegetativa, tienen como consecuencia el probable incremento de la homogeneidad genética en las plantaciones introducidas al norte del estado de Campeche, convirtiéndose a largo plazo en un problema; por ende, la introducción de variabilidad genética sería muy deseable para prevenir la susceptibilidad de palma jipi frente a enfermedades y plagas causadas por diversos patógenos, como el síndrome de amarillamiento foliar asociado al fitoplasma 16SrIV-D (Palma 2018; Cordova *et al.*, 2000) o la presencia de *Aspidiotus destructor* (Howard *et al.*, 2001). Asimismo, la reproducción sexual ofrece la mejor alternativa para generar la variabilidad necesaria para iniciar futuros programas de mejoramiento en la especie. Sin embargo, hasta que se disponga de un conocimiento confiable de este proceso en palma jipi, está seguirá siendo una tarea difícil. Lamentablemente, son pocos los aspectos de su fase reproductiva que han sido elucidados, sobre todo en las plantas introducidas en Campeche, puesto que la limitante constante es atribuible principalmente a las prácticas empíricas, como el corte de las inflorescencias para alargar la etapa vegetativa (producción de cogollos) (Medina-Vidal, 2018).

#### 1.1.7.4. Antecedentes sobre su fase reproductiva

La dinámica reproductiva sexual de los cultivos de *C. palmata* en el norte de Campeche inicia desde octubre y finaliza en junio del año siguiente (Bacab-Caamal, 2020), comportamiento que varía ligeramente con lo reportado en poblaciones naturales de palma jipi en Colombia (Muñoz & Tuberquia, 1999). En cada individuo, el ciclo reproductivo sexual involucra dos fases; una vegetativa y otra reproductiva (ver figura 1.11). La fase vegetativa abarca en promedio seis meses, se distingue por la ausencia de estructuras reproductivas en el esporofito visible, localizado sobre la superficie del suelo, y por la cosecha de cogollos. Dentro de la fase reproductiva, están consideradas dos etapas: la de floración y la de fructificación. La etapa de floración se caracteriza por presentar procesos de diferenciación, desarrollo y aparición de las estructuras reproductivas sexuales, específicamente la apertura secuenciada de los espádices. Al respecto, diversos autores (Bacab-Caamal, 2020; Ortega-Haas, 2016; Sajo *et al.*, 2014;

#### ANTECEDENTES

Harling *et al.*, 1998; Harling, 1958) señalan que la inflorescencia es de carácter protogineo con separación temporal de aproximadamente 30 horas, donde cada flor pistilada se encuentra rodeada por cuatro estaminadas y presenta una fenología floral corta. Sus flores son características del grupo Carludovicoideae (Bacab-Caamal, 2020; Sajo *et al.*, 2014; Harling *et al.*, 1998; Tomlinson & Wilder, 1984; Harling, 1958). Aunque cada antesis floral tiene una duración de cuatro a cinco días, la etapa de floración en la planta abarca dos meses del tiempo total de la fase reproductiva, debido a la emergencia secuenciada de hasta cuatro espádices.



Figura 1. 11. Esquema del ciclo reproductivo anual sexual de una planta de *Carludovica palmata* cultivada al norte de Campeche, e integrada por dos fases: (1) vegetativa y (2) reproductiva. La primera con duración de seis meses aproximadamente (verde). Mientras que la fase reproductiva (naranja) se integra por una etapa de floración (verde lima) y una etapa de fructificación (amarillo) (Modificado de Bacab-Caamal, 2020).

Asimismo, se ha reportado que desde el momento de la apertura floral hasta la maduración de cada infrutescencia trascurren poco más de tres meses ( $104 \pm 0.5879$  días), con base al patrón de modificación de las estructuras postflorales, los cambios de coloración en el tejido interno y externo, junto a parámetros como peso, longitud, área y volumen, la fructificación se ha podido subdividir en 11 etapas (ver figura 1.12) (Bacab-Caamal, 2020).



Figura 1. 12. Desarrollo-maduración de la infrutescencia de *Carludovica palmata*. (A) etapas. (B) cambios anatómicos internos (Tomado de Bacab-Caamal, 2020). En círculos naranjas se indica el número de etapa y en la parte inferior se indican los días después de antesis (DDA).

Cada infrutescencia de *C. palmata* está integrada por  $\approx 216 \pm 3.31$  bayas. Mientras que, el número de semillas totales por baya fluctúa entre 45 a 77 y varía respecto a su posición al espádice, con una media aproximada de  $62 \pm 1.5348$  en el tercio apical (TA), 58  $\pm 1.5346$  en el tercio medio (TM) y  $61 \pm 1.5298$  en el tercio basal (TB); sin embargo, no todas ellas son potencialmente viables, ya que muchas flotan en la superficie del agua y presentan apariencia vacía, por lo que parecen ser abortadas en algún punto durante el desarrollo. Al respecto, la proporción de abortos es relativamente alta (ver figura 1.13). Al evaluar la viabilidad de las semillas respecto a su posición, con pruebas de tetrazolio, después de seis meses de su recolecta, se demostró que la tinción intensa y total de la radícula y el cotiledón persistía, pero era muy baja ( $\approx 10\%$  TA,  $\approx 7\%$  TM y TB), sin embargo, otros embriones presentaron tinción no homogénea e intensidad variable, lo que puede significar menor vigor, pero no ausencia de viabilidad. Por lo tanto, se identificó que las semillas que provenían del TA tenían mayor potencial de viabilidad y resultaban idóneas para futuros estudios de caracterización (Bacab-Caamal, 2020).



Figura 1. 13. Porcentaje de semillas abortadas respecto a su posición en el espádice de *Carludovica palmata*. Tercio apical (TA), tercio medio (TM) y tercio basal (TB) (Modificado de Bacab-Caamal, 2020).

Cada semilla viable y típica de C. palmata es de color amarillo-crema, tiene forma ovalada a redonda, contorno oblongo, terete y está ligeramente comprimida lateralmente; sin embargo, Bacab-Caamal (2020) encontró pequeñas modificaciones morfológicas en las semillas, debido a la posición que ocupa cada una dentro del lóculo con respecto a las demás, así como a su unión placentaria. Las dimensiones de las semillas son pequeñas (longitud, grosor y masa), pero también se tienen ligeras variaciones respecto a la posición de la que se extraen dentro la infrutescencia, siendo las semillas del TB las más largas, gruesas y con mayor masa (1.79 ± 0.0381 mm de largo, 1.02 ± 0.01481 mm de ancho y 0.67 ± 0.0258 mg de masa) en contraposición con las que provienen del TA (2.02 ± 0.0276 mm de largo, 1.15 ± 0.0298 mm de ancho y 0.64 ± 0.0257 mg de masa) (Bacab-Caamal, 2020). Aunque se han realizado cortes histológicos en semillas en un punto no determinado de su desarrollo, encontrándose en ella (i) un embrión pequeño, (ii) un endospermo abundante y (iii) una compleja cubierta seminal (ver figura 1.14), aún no se tiene un conocimiento preciso de su desarrollo completo. Ahora bien, pese a que autores como Romero (2011) han reportado problemas de germinación en las semillas de C. palmata; en Colombia, se ha logrado un porcentaje de germinación in vitro de 87.9±3.03% utilizando medio semisólido MS adicionado con IAA (0.025 mg L<sup>-1</sup>), BAP (0.02 mg L<sup>-1</sup>) y GA<sub>3</sub> (0.02 mg L<sup>-1</sup>) (Zambrano-Artega et al., 2022); por otra parte, en México solo se ha reportado un porcentaje de germinación menor al 20% en semillas del TA aplicando exógenamente GA<sub>3</sub> (0.01 mg  $L^{-1}$ ) (Bacab-Caamal, 2020).



Figura 1. 14. Anatomía y morfología de una semilla de *Carludovica palmata*. Capas seminales (sem), embrión (emb), hilo (hlm), endospermo (end). 400x (Tomado de Bacab-Caamal, 2020).

Uno de los aspectos más estudiados en C. palmata ha sido la polinización. Se ha encontrado en plantas nativas de Centro y Sudamérica, que las flores presentan una morfología funcional y una fenología similar con diferentes especies de curculiónidos del orden Coleoptera, siendo los únicos polinizadores (Cortes et al., 2018; Franz, 2004; Fadiman, 2001; Franz, 1999; Seres & Ramírez, 1995; Eriksson, 1994; Gottsberger, 1990, 1991). Mientras que, en regiones de Panamá (Croat, 1978) y Colombia (Schremmer, 1982) además se han observado numerosas abejas sin aguijón (Meliponinae). En cambio, en plantas que fueron introducidas a Brasil solo fueron observadas abejas negras ladronas de polen, de la tribu Meliponini, que se comían y viajaban entre y debajo de los estaminodios movilizando el polen (Sajo et al., 2014). En la región norte de Campeche, no se encontró presencia de curculiónidos, pero sí de dos géneros de insectos pertenecientes al orden Hymenoptera, (tribu Meliponini, familia Apidae): abejas meliponas mayas sin aquijón (Melipona beecheeii) y abejas negras (Trigona amalthea). Ambas especies fueron vistas haciendo contacto directo con estigmas receptivos; por lo que se sugirió su función como polinizadores. También se observaron hormigas de dos morfoespecies (Componatus spp y Tetramorium caespitum). No obstante, aún falta responder muchas incógnitas sobre la fase reproductiva de esta especie. Por ejemplo, no hay un análisis del sistema reproductivo de C. palmata y se desconoce si a la región norte de Campeche llegaron unos pocos genotipos o solo uno. Sin embargo, se infiere que al haber principalmente una propagación clonal, el carácter protogineo durante la floración no garantizaría la presencia de xenogamia total en la especie, sino que es más probable encontrar autogamia parcial en tres posibles niveles: (a) cruzamiento dentro de la misma estructura floral, (b) entre inflorescencias pertenecientes a la misma colonia y (c) entre individuos emparentados dentro de la misma extensión de cultivo (Hu et al., 2015;

Zhang & Zhang, 2007). Por esta razón, las semillas y plántulas de la especie pueden sufrir depresión por endogamia, debido a que en éstas será más frecuente encontrar alelos recesivos deletéreos en homocigosis, lo que disminuye la germinación y supervivencia de los propágulos que se obtengan por vía sexual (Emeterio-Lara *et al.*, 2018). Debido a ello, se están sentando los primeros pasos para elucidar está importante incógnita dentro de la biología de la especie. La variabilidad genética de *C. palmata* en Santa Cruz Ex Hacienda (Chi Chi, n.d.) está siendo analizada en: (i) plantas germinadas *in vitro* a partir de semillas y (ii) plantas cultivadas en campo por propagación clonal; utilizando dos marcadores moleculares para cada caso: (1) los basados en regiones conservadas en eucariotas (SCoT) y los basados en retrotransposones (IRAP) para la identificación de polimorfismo intraespecífica; como resultados preliminares ya se han estandarizado los marcadores, siendo los SCoT, los que aparentemente muestran mayor polimorfismo.

#### 1.1.8. RECAPITULACIÓN DE LOS ANTECEDENTES

La recombinación genética que ocurre durante la reproducción sexual favorece la variabilidad genética, este proceso a su vez, favorece combinaciones que pueden tener un valor adaptativo cuando los ambientes son cambiantes. En las plantas con flores, la fase reproductiva se integra por procesos clave, como lo son (i) la gametogénesis, (ii) la doble fecundación, (iii) el desarrollo - maduración de la semilla y (iv) la germinación, que a su vez se encuentran interrelacionados: por tanto, deben cumplir características idóneas. Así, el grano de polen y el saco embrionario deben estar completamente desarrollados, diferenciados y celularizados para que, después de la polinización, cada esperma pueda fecundar a la ovocélula y a la célula central e iniciar la embriogénesis cigótica y la endospermogénesis respectivamente. Ambos procesos integran el desarrollo de la semilla y deben pasar por una morfogénesis y acumulación de compuestos para llegar a la maduración. La germinación solo ocurrirá hasta que la semilla se encuentre madura morfológica y fisiológicamente: sin embargo, si presenta algún tipo de latencia, está debe romperse mediante la aplicación de tratamientos físicos o químicos, según el caso. En monocotiledóneas, como Carludovica palmata (Cyclanthaceae), estos procesos se han estudiado poco, esta especie en particular presenta problemas de germinación, al ser una planta introducida y de importancia comercial para la región sureste de México, es importante analizar cada uno de estos procesos para entender lo que está ocurriendo con esta especie, lograr la germinación y cimentar las bases para futuros programas de fitomejoramiento.

# 1.2. JUSTIFICACIÓN

*Carludovica palmata* es una especie introducida, pero de importancia económica en la península de Yucatán. Los únicos cultivos de *C. palmata* en México se localizan en la región norte del estado de Campeche, donde los productores de fibra utilizan prácticas agrícolas empíricas y emplean exclusivamente la propagación vegetativa para incrementar sus extensiones de cultivo, lo que puede limitar la variabilidad genética de las poblaciones. En esta región se han reportado problemas de viabilidad y germinación de sus semillas; además, a nivel mundial existen pocos estudios sobre su reproducción sexual y hasta el momento, no se encontraron reportes de análisis anatómicos, embriológicos e histológicos durante el desarrollo y la maduración de sus semillas; por lo tanto, la importancia de este estudio radica en que el análisis de su unidad reproductiva ayudará a comprender mejor la reproducción sexual en esta especie y proporcionará información adicional sobre la caracterización del género y la familia, contribuyendo con conocimientos básicos útiles para futuros estudios de sistemática y evolución de plantas.

A su vez, la identificación y caracterización de tipos celulares, cambios estructurales o compuestos presentes en la semilla ayudarán a adquirir un mejor entendimiento sobre su germinación y sobre la biología de la semilla. Además, las observaciones y resultados del estudio podrían constituir el primer paso para facilitar futuros programas de fitomejoramiento de la especie, así como de conservación y de sustentabilidad de la biodiversidad. Mientras que, a largo plazo, podrían sentar las bases para que *C. palmata* tenga la oportunidad de adaptarse mejor a las condiciones medioambientales propias de la región sureste de México, haciendo más eficiente el uso de los recursos y buscando un desarrollo sustentable. Por último, se contribuirá a la generación de nuevas áreas de investigación, siendo la biología de las semillas una de las áreas más extensas y prometedoras en la investigación actual de la fisiología vegetal.

# 1.3. HIPÓTESIS

Los problemas de viabilidad y el bajo éxito germinativo de la semilla de *Carludovica palmata* están asociados a factores anatómicos, químicos y estructurales encontrados desde su línea germinal hasta el desarrollo de la semilla.

# 1.4. OBJETIVOS

## 1.4.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar mediante estudios anatómicos, morfológicos, estructurales e histoquímicos, los tejidos y los procesos de diferenciación que conducen a la formación, maduración y posterior germinación de las semillas de *Carludovica palmata*.

#### 1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar estructural y morfológicamente a los gametofitos masculinos y femeninos en estado maduro.
- Describir los procesos de fecundación y embriogénesis cigótica mediante análisis microscópico.
- Caracterizar la morfología y composición de la semilla durante el proceso de maduración.
- Caracterizar algunos factores estructurales y/o químicos relacionados con los problemas de viabilidad y de germinación en la especie.
- Establecer un protocolo para la germinación de las semillas, con base en lo encontrado en el estudio histológico.

# 1.5. ESTRATEGIAS: METODOLÓGICA Y EXPERIMENTAL

El diseño metodológico seguido en este estudio se ilustra en la figura 1.15, e inicia con la recolección de inflorescencias en etapas pistiladas y estaminadas para la caracterización del grano de polen y el saco embrionario respectivamente; así como para la localización espacial de los gametofitos. También se recolectaron infrutescencias en diferentes estadios de maduración para la identificación del evento de doble fecundación, el seguimiento de la embriogénesis cigótica, la endospermogénesis, así como su caracterización morfológica e histoquímica. El análisis de estos eventos permitió identificar factores estructurales y químicos que influyen en los problemas de viabilidad y germinación de *C. palmata*. Con base a lo encontrado durante el desarrollo de la semilla, se aplicó un tratamiento químico para romper la latencia y lograr la germinación.

La estrategia experimental aplicada se muestra en la figura 1.16. Para atender el primer objetivo, se emplearon técnicas histológicas vistas por microscopía electrónica y óptica. Para la caracterización morfológica y anatómica del microgametofito y el megagametofito se realizaron estudios por microscopía electrónica de barrido (MEB) y clarificación con metilsalicilato respectivamente; además para el grano de polen se empleó inmunotinción con DAPI (microscopía confocal), se evaluó su calidad mediante conteo por hemocitómetro y germinación in vitro. Para cumplir el segundo y tercer objetivo, se analizaron óvulos vía clarificación (microscopía de campo claro) para describir la doble fecundación y se realizaron cortes finos (criostato) así como tinciones histológicas (TBO, PAS-ANN, Sudan IV) para el seguimiento de la embriogénesis, composición celular y acumulación cualitativa de compuestos durante el desarrollo de la semilla; también se aplicó MEB para la caracterización morfológica de diferentes etapas de su maduración. El cuarto objetivo se llevó a cabo, mediante la identificación de las anomalías en el megagametofito utilizando clarificación y su relación con los problemas de viabilidad se comprobó en semillas abortadas de 30 DDA utilizando cortes finos, histología y clarificación vistos por microscopía de campo claro; los rafidios e idioblastos se caracterización por MEB, cortes finos, ultrafinos (microtomo) e histoquímica (TBO, PAS-ANN, rojo de rutenio, HCl y CH<sub>3</sub>COOH). Finalmente, para cubrir el último objetivo que consistió en romper la latencia y lograr la germinación, se aplicó tratamiento de escarificación química con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre semillas de 100 DDA.



Figura 1. 15. Diagrama metodológico.



Figura 1.16. Diagrama experimental.

# **CAPÍTULO II**

# 2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

# 2.1.1. SITIO DE ESTUDIO

El estudio se realizó en una plantación de palma jipi (*Carludovica palmata*) propiedad de Don Jorge Chan, localizada en Santa Cruz Ex Hacienda, Calkiní, Campeche correspondiente a las coordenadas 20°23'46.5" N, 90°14'15.8" O (Google, 2021), área perteneciente a la Reserva de la Biósfera "Los Petenes" (ver figura 2.1 A-B), que se caracteriza por tener un clima cálido-subhúmedo, precipitación anual de 1253 mm, altitud máxima de 10 m s. n. m. y temperatura media anual de 26.4°C (INEGI, 2017; Ortega-Haas, 2016). La selección de la plantación se realizó con base en el manejo tradicional del cultivo: policultivo de traspatio con sombra parcial y riego por inundación del terreno aplicado tres veces por semana, utilizando agua extraída de pozo (ver figuras 2.1 C-D); así como después de confirmar una adecuada disponibilidad del material vegetal. La edad de los individuos estudiados osciló entre 5 a 10 años aproximadamente.



**Figura 2.1.Sitio de estudio.** Posicionamiento geográfico (A) de Santa Cruz Ex Hacienda (Calkiní, Campeche) y (B) Plantío delimitado en rojo (Apple, 2021). (C-D) Características del cultivo.

#### 2.1.2. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal se colectó de octubre de 2020 a junio de 2021. Se tomó en consideración como día uno después de la antesis (1 DDA) cuando el botón floral perdió las espatas, los estaminodios iniciaron su elongación y los estigmas fueron receptivos (ver figuras 2.2 A-C). Un total de 100 inflorescencias de 1 DDA fueron seleccionadas al azar dentro del área de estudio, etiquetadas y monitoreadas cada semana hasta el momento de su recolección (ver sección 2.1.3); tiempo en el que cada espádice fue seccionado en tres partes iguales y donde únicamente, del tercio apical (TA), en el 66 % de las estructuras reproductivas se pudieron extraer gametofitos y semillas. El resto se perdió por diversos factores (ver figura 2.2 D).



**Figura 2. 2. Inflorescencias de 1 DDA, marcadas para la recolección** de (A) semillas y (B) gametofitos. (C) Fase pistilada donde en el círculo naranja se observa un corte histológico del área que comprende los estigmas receptivos. (D) Destino de las estructuras marcadas.

#### 2.1.3. COLECTA Y FIJACIÓN DE GAMETOFITOS Y SEMILLAS

La recolección de granos de polen y óvulos se hizo por triplicado usando tres inflorescencias distintas para cada caso. Así mismo, para el seguimiento del desarrollo de la semilla fueron usadas tres infrutescencias para cada etapa. Adicionalmente, se hicieron dos réplicas por cada estructura reproductiva muestreada (ver figura 2.3).



Figura 2. 3. Tipo de muestreo, tanto en (A) gametofitos, como en (B) semillas. Los números representan cada estructura reproductiva muestreada.

Los óvulos encontrados en cinco flores pistiladas elegidas al azar en inflorescencias de 1 a 10 DDA (ver figura 2.4) fueron extraídos con cuidado, colocados en viales de vidrio, fijados en FAA (ver anexo 1), sellados con Parafilm y almacenados a 1-4°C hasta el momento de su uso. Mientras que, para la recolección de los granos de polen, se hicieron colectas tanto *in situ* como en el laboratorio, para esté último las inflorescencias recolectadas en el 1 DDA, se mantuvieron en agua corriente y a temperatura ambiente hasta el momento de la dehiscencia de las anteras en el TA (2-3 DDA). En ambos casos, los granos de polen fueron recolectados con ayuda de una brocha. La mitad de la muestra recolectada fue fijado en FAA (ver anexo 1), almacenados a 1-4°C en viales sellados y cubiertos con bolsas herméticas para evitar cualquier efecto debido a la humedad; la otra mitad de la muestra fue sembrada inmediatamente en MGP (ver sección 2.1.9).

Por su parte, las infrutescencias de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 DDA (ver figura 2.5) fueron colectadas en campo, colocadas en recipientes con agua corriente y transportadas para su extracción inmediata en laboratorio. Por cada infrutescencia preseleccionada se eligieron entre cinco a diez bayas en desarrollo, se extrajeron las semillas de su interior y se colocaron en viales; posteriormente se fijaron con FAA (ver anexo 1), se sellaron y se almacenaron a 4°C hasta

el momento de su uso. El material colectado también fue observado bajo un microscopio estereoscópico Carl Zeiss Stemi 2000C para verificar su integridad.



Figura 2. 4. Diferentes estadios de desarrollo de la inflorescencia (A) 1, (B) 2, (C) 3, (D) 4 DDA a la infrutescencia de (E) 5, (F) 6, (G), 7, (H) 8, (I) 9 y (J) 10 DDA de *Carludovica palmata*.



**Figura 2. 5. Estadios de desarrollo de infrutescencias y semillas de Carludovica palmata**. La apertura de los frutos comienza en la región apical y se extiende hacia la región basal. El círculo superior derecho ilustra los cambios externos de las estructuras postflorales (morfología y coloración), mientras que el círculo inferior derecho ilustra los cambios internos (coloración y tamaño de las semillas) a los (A) 10, (B) 20, (C) 30, (D) 40, (E) 50, (F) 60, (G) 70, (H) 80, (I) 90 y (J) 100 DDA.

# 2.1.4. TINCIÓN Y CLARIFICACIÓN

Para la tinción y clarificación, se siguió la metodología propuesta por González-Gutiérrez *et al.* (2014) con ligeras modificaciones. Los óvulos prefijados en FAA por 24 horas, se lavaron dos veces por 20 min y se almacenaron en etanol 70% a 4°C por 2 meses.

Posteriormente, cada óvulo se tiñó con solución de hematoxilina de Mayer al 1% por 2 horas a 25°C y se trató con calor hasta alcanzar 40°C durante 30 minutos. A fin de eliminar el exceso de colorante se utilizó ácido acético al 2% durante 40 minutos a 40°C y después se mantuvo con ácido acético al 0.5% por 16 horas. Al finalizar este período, se realizaron tres lavados con NaHCO<sub>3</sub> al 0.1%, después se renovó la solución y se dejó reposar durante 24 horas. Seguidamente, la muestra se sometió a una serie de deshidratación en etanol: 25%, 50%, 70%, 85%, 95% y 100% por 15 minutos cada uno y en etanol al 100% durante 2 horas. La clarificación se llevó a cabo mediante tres series de solución de metilsalicilato – etanol [3:1, 1:1 y 1:3 v/v], por períodos de una hora para cada caso. Para su observación, la muestra se montó en metilsalicilato y su análisis se realizó con un microscopio Carl ZEISS<sup>™</sup> Axioplan (Germany) acoplado a una cámara digital Carl ZEISS<sup>™</sup> AxioCam ICc5. Las imágenes se tomaron usando el software Carl ZEISS<sup>™</sup> AxioVision SE64 Rel. 4.8. Finalmente, las microfotografías se procesaron con Fiji-ImageJ para ajustar y obtener un mejor contraste.

## 2.1.5. CORTES HISTOLÓGICOS POR CRIOSTATO

Se siguió el protocolo general propuesto por Ku-González (2013b) con ligeras modificaciones. Las semillas prefijadas (ver sección 2.1.3), se expusieron a un gradiente de sacarosa en buffer fosfato (PB) 0.16 M, pH 7.2, al que se le adicionó gradualmente el medio de congelación de tejidos Leica, tal como se indica a continuación: 10% de sacarosa en PB, 20% de sacarosa en PB más dos gotas de medio y 30% de sacarosa en PB más cuatro gotas de medio por períodos de una hora en cada caso. Después, cada muestra se colocó en un molde adecuado y se cubrió completamente con el medio de congelación, inmediatamente se llevó a  $-26^{\circ}$ C por 15 minutos y posteriormente se congeló a  $-80^{\circ}$ C, donde se mantuvo por 24 horas. Finalmente, la muestra se montó en el criostato Leica CM 1950 donde se hicieron cortes longitudinales y trasversales de grosor  $\geq$  a 10 µm. Los cortes histológicos se colocaron en portaobjetos prefijados con poli-L-lisina al 10% y para verificar su integridad, se observaron con distintos objetivos en un microscopio óptico Revelation III LW Scientific.

#### 2.1.6. CORTES HISTOLÓGICOS POR MICROTOMO

Las semillas de 100 DDA prefijadas (ver sección 2.1.3) se deshidrataron en gradientes ascendientes de etanol (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%); cada lavado se realizó por duplicado por 2 horas en cada caso. Las muestras se incluyeron utilizando un medio epoxi (JB-4, Polysciences) de acuerdo con las especificaciones del fabricante, tal como se indica a continuación: lavado de JB4-etanol [1:1 v/v] por 72 horas, después las muestras se cambiaron a la solución de infiltración (solución A + C) por una semana, y finalmente se cambiaron a un molde recubriendo en cada caso con solución de incrustación (solución A + C + B). Finalmente, las muestras incrustadas en resina se seccionaron utilizando un micrótomo rotatorio automático (Leica RM2255) con un espesor de 5  $\mu$ m.

#### 2.1.7. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE GAMETOFITOS Y SEMILLAS

La histoquímica se aplicó, tanto a cortes longitudinales como transversales de cada estructura. En total se utilizaron cinco colorantes, tal como se indica a continuación:

El azul de toluidina, un reactivo metacromático, se utilizó para determinar la estructura de la semilla, ya que este colorante tiene una alta afinidad por los componentes ácidos del tejido y colorea los ácidos nucleicos de azul y los polisacáridos de púrpura. Las secciones fueron teñidas por 60 segundos con azul de toluidina 0.025% y lavadas con agua destilada (Cadot et al., 2006). Se aplicó una doble tinción PAS-ANN para la visualización de cuerpos proteicos (azul), nucleolos (azul oscuro) y redes de polisacáridos (magenta). Las secciones se hidrolizaron con ácido periódico 1% por 20 minutos, se aclararon con agua destilada; posterior se aplicó la tinción de Schiff por 15 minutos, se lavaron con agua destilada y enseguida se aplicó negro azul de naftol 1% por 45 segundos a 60°C, lavándose finalmente con ácido acético 7% y agua destilada estéril (Villegente et al., 2017). Mientras que, para la identificación de lípidos presentes (naranja-rojizo), las secciones fueron teñidas por 30 minutos con Sudan IV 0.1% y montados en glicerol 30% (Deng et al., 2015). Por último, se tiñeron secciones con rojo de rutenio 0.05% por 60 segundos para la identificación de mucopolisacáridos (Retamales & Scharaschkin 2014). Para su observación se empleó un microscopio Carl ZEISS<sup>™</sup> Axioplan (Germany) acoplado a una cámara digital Carl ZEISS<sup>™</sup> AxioCam ICc5. Las imágenes fueron tomadas con el software Carl ZEISS<sup>™</sup> AxioVision SE64 Rel. 4.8 y analizadas con el software Fiji-ImageJ.

## 2.1.8. CARACTERIZACIÓN DEL SACO EMBRIONARIO

Para la caracterización anatómica del saco embrionario se siguió la metodología propuesta en la sección 2.1.4 que corresponde a la tinción y clarificación de óvulos. Mientras que, para su caracterización morfológica se siguió el protocolo propuesto por Ku-González (2013a): los óvulos prefijados en FAA (ver anexo 1) se lavaron hasta eliminar el olor a formaldehido, después se sometieron a una serie de deshidrataciones con etanol con cambios cada 60 minutos, utilizando: 30%, 50%, 70%, 96% y 100%, éste último 3 veces. Las muestras fueron almacenadas en etanol 100% a 4°C hasta el día siguiente. Posterior, se secaron a punto crítico utilizando un secador TOUSIMIS (SAMDRI 795) durante 15 minutos, se montaron en tubos de aluminio con cinta doble cara de carbono y se recubrieron con oro por medio de un metalizador DENTON VACUUM DESK II (Denton Vacuum, Moorestown, N. J., EE. UU.). Las observaciones se llevaron a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido de presión variable marca JEOL modelo JSM-6360 LV, con 10 Kv y las micrografías se analizaron con Fiji-ImageJ.

# 2.1.9. CARACTERIZACIÓN DEL GRANO DE POLEN

Para la caracterización anatómica del polen se siguió la metodología propuesta en la sección 2.1.3, así como también sobre cortes ultrafinos de 2 y 3  $\mu$ m, se aplicaron los protocolos de tinción con PAS y azul de toluidina (ver sección 2.1.7). El número de núcleos se detectó con DAPI (20  $\mu$ L) (excitación 405 nm, emisión de 461 nm), para ello 50  $\mu$ L de granos de polen prefijados en FAA se expusieron a la solución DAPI por 24 horas en oscuridad y fueron montados en glicerol; el análisis se realizó en un microscopio de barrido láser confocal (Olympus, FV1000 SW) con el software FV10 ASW 3. El control se examinó en toda la longitud de onda que abarcó los tres filtros. Para la caracterización morfológica de los granos de polen, se siguió la metodología para microscopía electrónica de barrido expuesta en la sección 2.1.8.1 (5 kV).

El número de granos de polen por antera se contabilizó en un hemocitómetro, por medio de cinco repeticiones. Además, se caracterizó la calidad del polen mediante la estimación de su viabilidad. El medio de germinación de polen (MGP) que se empleó fue el propuesto por Trujillo-Paredes (2004): 150 g/L de sacarosa, 0.1 g/L de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.086 g/L de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O, 0.04 g/L de MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.02 g/L de KNO<sub>3</sub> y 10 g/L de agar. Para calcular el porcentaje de germinación se hicieron tres repeticiones, en cada una se pesaron 10 mg de polen que fueron esparcidos con ayuda de un pincel sobre la caja con MGP, se incubaron por 24 horas en condiciones de fotoperíodo a temperatura ambiente. Se consideró que el polen germinó cuando el tubo polínico

alcanzó una longitud mayor a la del grano de polen. El conteo se realizó en una muestra de 1000 granos de polen en cada caso.

#### 2.1.10. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE SEMILLAS Y EMBRIONES

Semillas de 10, 30, 50, 80 y 100 DDA; así como embriones de 100 DDA (5 por etapa) fueron analizados por MEB como se indica en la sección 2.1.8.

#### 2.1.11. CARACTERIZACIÓN DE LAS SEMILLAS ABORTADAS

Se caracterizaron 50 semillas abortadas de 30 DDA utilizando la técnica de clarificación (sección 2.1.4), cortes histológicos (sección 2.1.5), tinción con azul de toluidina (sección 2.1.7) y por MEB (sección 2.1.8).

#### 2.1.12. CARACTERIZACIÓN DE LOS IDIOBLASTOS Y RAFIDIOS

Para la caracterización histoquímica de los idioblastos se procedió a aplicar los protocolos señalados en los apartados 2.1.4, 2.1.5, 2.1.6, tinción doble PAS-ANN y azul de toluidina (2.1.7). Además, se aplicó el protocolo de Macnish *et al.* (2003): secciones de cortes de 35 µm fueron tratadas con ácido acético glacial 5% (v/v) por 30 minutos para descartar composición de fosfato o carbonato; mientras que otras secciones fueron expuestas a HCl 2% (v/v) para descartar su composición de oxalatos. Finalmente, para la detección de la presencia de iones calcio, otras secciones fueron expuestas de acuerdo con Leszczuk *et al.* (2019) a una solución de rojo de alizarina 1% por 5 minutos. Su morfología se comprobó con base a lo descrito en la sección 2.1.8.

# 2.1.13. APLICACIÓN DE ESCARIFICACIÓN QUÍMICA A SEMILLAS Y SU CARACTERIZACIÓN

De acuerdo con la metodología propuesta por Fang *et al.* (2006) con ligeras modificaciones, 20 semillas se sumergieron en  $H_2SO_4$  al 50% por 10 minutos. El control no se expuso al ácido. Posterior, se sembraron en cajas magenta con algodón y fueron monitoreadas diariamente durante tres semanas. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las semillas se consideraron germinadas cuando la radícula fue igual a la mitad de la longitud de la semilla. El porcentaje de germinación se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula.

Germinación (%) = 
$$\frac{N \text{úmero de semillas germinadas}}{20} x 100$$

# **CAPÍTULO III**

# 3.1. RESULTADOS

De acuerdo con el orden cronológico de participación de los elementos y eventos más importantes que, en conjunto integran el proceso del desarrollo de la semilla de *Carludovica palmata,* así como por la cronología expuesta en los objetivos específicos planteados, los resultados se agruparon por secciones. Por tanto, la sección 3.1.1 presenta la caracterización de los gametofitos en estado maduro. La sección 3.1.2 aborda la doble fecundación; seguidamente y debido a la importancia del embrión, el proceso de embriogénesis cigótica de *C. palmata* se describe a detalle en la sección 3.1.3. El proceso de desarrollo de la semilla queda expuesto en la sección 3.1.4, donde se incluye desde la caracterización de la endospermogénesis hasta la presentación de las diferencias morfológicas e histoquímicas caracterizadas a lo largo de los aproximadamente 90 días que abarca el desarrollo y maduración de la semilla (10 -100 DDA). La sección 3.1.5 aborda la caracterización de los factores que se encontraron durante este análisis y que afectan la producción de semillas maduras y su posterior germinación. Finalmente, la sección 3.1.6 expone el tipo de latencia presente en las semillas de *C. palmata*, así como su germinación para la obtención de plántulas.

## 3.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS GAMETOFITOS MADUROS.

Previo a la caracterización morfológica y anatómica del grano de polen y el saco embrionario de *C. palmata*, se incluye la localización espacio-temporal de cada gametofito dentro de la inflorescencia.

#### 3.1.1.1. Localización espacial de los gametofitos dentro de la inflorescencia

Los granos de polen en *C. palmata*, se encontraron localizados dentro de sacos polínicos que residieron en las anteras de las flores estaminadas o masculinas. Cada flor estaminada fue actinomorfa y simétrica y se localizó sobre el espádice (ver figura 3.1 B); se conformó por cuatro andróforos unidos mediante un bulbo basal. Cada andróforo amarillo contó con un perianto conformado por tépalos glandulosos y constituido por  $37 \pm 0.5322$  estambres tipo sinándria (ver figura 3.2 A). Cada estambre estuvo constituido por un filamento corto y una antera basifija, compuesta por dos tecas, unido al andróforo mediante un bulbo basal y sostenido por un tejido conectivo (ver figuras 3.2 B, C). Cada antera, se abrió por dehiscencia longitudinal y liberó aproximadamente 410  $\pm$  0.8826 granos de polen (ver figuras 3.2 D).



**Figura 3. 1. Localización de los gametofitos en** *Carludovica palmata*. (A) Corte transversal del espádice, donde se observa la posición de las flores respecto al raquis. (B) El andróforo y el gineceo (recuadros negros punteados) presentan hermogamia y el ovario es ínfero (recuadro rojo punteado). Micrografías obtenidas a partir de (A) estereoscopio y (B) corte histológico con TBO. Raquis (rgs).



**Figura 3. 2. Caracterización del androceo de** *Carludovica palmata*. (A) Morfología típica de un andróforo. (B, C) Anatomía de una antera. (D) Antera madura y aperturada. Micrografías obtenidas a partir de (A, C, D) estereoscopio y (B) técnicas de clarificación. Antera (ant) abierta (o), tépalo (tpl), andróforo (and), teca (tca), filamento (flm), bulbo basal (blb), conectivo (cnct), saco polínico (sco), polen (pln), puntos rojos indican las aperturas de las tecas.

El saco embrionario, se localizó dentro de cada óvulo. Los óvulos de *C. palmata*, se encontraron localizados dentro del ovario de cada flor pistilada o femenina. Cada flor pistilada estuvo connada en la base del espádice y fue actinomorfa (ver figura 3.1 A, B), contó con cuatro tépalos coriáceos fusionados entre sí, siendo cada uno más ancho que largo; por tanto, la cámara de polinización quedó constituida por cuatro carpelos que comparten un punto de emergencia y sobre los cuales se encontraron estigmas ovoides y lateralmente comprimidos, y junto a cada uno, se ubicó el sitio de emergencia de los estaminodios, estructuras características y llamativas presentes durante la fase femenina del ciclo floral (ver figura 3.3 A). La presencia de exudados sobre células papilares estigmáticas se tomó como prueba de la receptividad de la flor (ver figura 3.3 B). La flor pistilada presentó un ovario ínfero que se conectó a la cámara de polinización mediante el estilo y a su vez quedó constituido por hasta cuatro lóculos (ver figura 3.3 C). Por cada ovario y unidos a la placenta, se observaron aproximadamente 62  $\pm$  1.5348 óvulos en diferentes etapas de desarrollo (ver figura 3.3 D).

Cada óvulo tuvo una forma piriforme alargado, la capa exterior estuvo conformada por células parenguimáticas nucleadas alargadas (ver figura 3.4 A), fue anátropo (ver figuras 3.3 D, 3.4 A), bitégmico (ver figura 3.4 B) y crasinucelado (ver figuras 3.4 C). Presentó un micrópilo en zig-zag, con un endostoma cercano a la región chalazal y un exostoma al extremo opuesto (ver figura 3.4 C). El integumento externo estuvo compuesto por cinco capas de células parenquimatosas dispuestas de manera compacta (ver figura 3.4 D); mientras que, el integumento interno estuvo conformado por una capa de células alargadas cuyos núcleos se orientaron hacia el saco embrionario (ver figuras 3.4 E). Sobre el tegumento externo, se encontró un reborde denominado rafe, resultado de la soldadura del funículo (ver figura 3.4 C), en el interior de este tejido se observaron haces ovulares que lo recorrieron (ver figura 3.4 D) y llegaron al endostoma, donde convergieron y desembocaron en la nucela (ver figura 3.4 F). La nucela se encontró entre el tegumento interno y el saco embrionario, constó de una (región central) a tres (cerca del endostoma y exostoma) capas celulares recubriendo el megagametofito; en consecuencia, la nucela situada en el exostoma aparentó tener seis capas celulares (ver figura 3.4 G). Las proyecciones nucelares, fueron capas de nucela al interior del saco embrionario (ver figura 3.4 H).



**Figura 3. 3. Caracterización del gineceo de Carludovica palmata.** (A) Morfología de la flor pistilada (cámara de polinización). (B) Acercamiento de la región cercana al estigma receptivo. (C) Lóculo con numerosos óvulos. (D) Posición de los óvulos respecto a la placenta. Micrografías obtenidas a partir de (A-C) MEB y (D) técnicas de clarificación. Carpelo (crp) estaminodio (stm), tépalo (tpl), células papilares estigmáticas (pal), exudados (exd), lóculo (lcl), óvulo (ovl), placenta (plc).



**Figura 3. 4. Caracterización del óvulo de Carludovica palmata**. (A) Morfología de un óvulo representativo con el funículo (fnc), la chalaza (CH) y las células parenquimáticas (prq) de su superficie. (B) Tegumentos que recubren al saco embrionario. (C) Anatomía. (D) Capas celulares en el tegumento externo, el rafe y (E) el integumento interno. (F) Los haces ovulares convergen y se introducen en la nucela. (G) Nucela externa cercana al exostoma e (H) interna. Micrografías obtenidas a partir de (A-G) clarificación de óvulos. Células parenquimáticas (prq), funículo (fnc), chalaza (CH), tegumento externo (tgm ex), tegumento interno (tgm in), nucela (ncl), megagametofito (mgg), micropilo (m), exostoma (exst), endostoma (endt), tegumentos (tgms), proyecciones nucelares (pry), rafe (rf) haces ovulares (tbs), capas celulares (flechas negritas).

#### 3.1.1.2. Grano de polen (gametofito masculino)

Con base en las clasificaciones de Erdtman (1952), se determinó que cada microgametofito en estado maduro se liberó por unidad o monada, fue monoporado, heteropolar, radiosimétrico, elíptico en vista polar con dimensiones entre 22.22 a 31.88 µm y promedio de 26.64  $\pm$  0.36 µm (ver figura 3.5 A); circular en vista ecuatorial con un diámetro entre 14.44 a 18.84 µm y con un promedio de 16.05  $\pm$  0.14 µm (ver figuras 3.5 C) (ver anexo 2). Su relación eje polar – ecuatorial (P/E) fue igual a 1.6591, por lo que tuvo una forma prolada y presentó un tamaño de pequeño a mediano. Estuvo cubierto tanto por intina como exina (ver figuras 3.5 B, D-F), identificándose en esta última ektexina y endexina (ver figura 3.5 B), excepto en el área cercana a su apertura, donde se observó un engrosamiento de intina, pero la exina fue reducida o ausente (ver figura 3.5 D). El grano de polen de *C. palmata* presentó un patrón perforado (ver figuras 3.5 G, H) y se identificó la elongación prematura del tubo polínico (ver figuras 3.5 I-L) en el 4.66  $\pm$  0.88 % de los granos de polen (ver anexo 3); sin embargo, la viabilidad total se estimó en 7.43  $\pm$  0.50 % (ver anexo 4).

En estado maduro, cada grano de polen se integró por un núcleo vegetativo difuso y un largo núcleo generativo teñido intensamente debido probablemente a cromatina concentrada (ver figuras 3.6 A, B). Mientras que, en aquellos microgametofitos con poro germinativo, se observó la migración del núcleo vegetativo hacia el polo proximal y un cambio en la intensidad del núcleo generativo (ver figuras 3.6 C, D). Finalmente, en granos con tubo polínico elongado, se identificaron dos núcleos espermáticos situados a la mitad del plano polar y los residuos del núcleo generativo (ver figura 3.6 E-F). Por tanto, la transición de un grano de polen bicelular a tricelular ocurrió poco después de la germinación (ver figura 3.5 G, H).



**Figura 3. 5. Caracterización del grano de polen de** *Carludovica palmata*. Anatomía tanto en el (A, D) plano polar, con (B, E) acercamientos en los componentes exina-intina; así como en (C, F) plano ecuatorial. Morfología y acercamientos en el polen (G, H) maduro, (I, J) con poro germinativo y (K, L) con elongación del tubo polínico (M) Polen con elongación del tubo polínico, donde se observa una acumulación mayor de intina en esa región. Micrografías obtenidas a partir de cortes histológicos teñidos con (A-C) TBO, (D-F, M-N) PAS; (G-L) MEB. Eje polar (P), eje ecuatorial (E) exina (exn), intina (int), apertura (apr), citoplasma (ctp), ektexina (ectx), endexina (endx), membrana citoplasmática (mmb), apertura (apr), tubo polínico.



**Figura 3. 6. Número de núcleos en el grano de polen de Carludovica palmata**. (A, B) En estado maduro es bicelular; (C, D) con apertura del poro germinativo (continúa siendo bicelular), y hasta (E, F) poco después de germinar, se observan tres núcleos; mismos que (G, H) migran hacia la punta del tubo polínico al elongar. Micrografías obtenidas a partir de (A-F) inmunotinción con DAPI, (G-H) tinción con TBO. Núcleo vegetativo (nve), núcleo generativo (nge), esperma (esp), tubo polínico (tbp).

En longitudes de onda de emisión correspondientes a los colores azul (CA 405 nm) y verde (CV 498 nm), se identificó autofluorescencia total y parcial en los microgrametofitos maduros (ver figuras 3.7 A-D) y germinados (ver figura 3.7 E-H) de *C. palmata* respectivamente.



**Figura 3. 7. Autofluorescencia en granos de polen de** *Carludovica palmata*. En (A) etapa madura, se captó la señal total e intensa en las longitudes de onda correspondientes a los colores (B) azul, (C) verde, pero no en (D) rojo. Mientras que, (E) en etapa germinada, la señal fue (F) débil y periférica para el canal azul, (G) débil para el canal verde y (H) ausente para el rojo. Micrografías obtenidas por (A-H) microscopía confocal. Canal azul (CA), canal verde (CV), canal rojo (CR). La flecha hacia arriba indica mayor captación de la señal y la flecha hacia abajo indica menor captación de señal.

#### 3.1.1.3. Saco embrionario (gametofito femenino)

El saco embrionario o megagametofito de *C. palmata* estuvo compuesto por ocho núcleos y diferenciado en cuatro tipos celulares (figura 3.8): una ovocélula acompañada por dos células sinérgidas orientadas cerca del polo chalazal, una célula central integrada por dos núcleos polares y tres células antípodas en el polo opuesto.



Figura 3. 8. Composición del saco embrionario. Micrografía representativa de 3 DDA y tomada a partir de técnicas de clarificación.

Se consideró al gametofito femenino maduro desde el momento de la apertura floral hasta previo la doble fecundación; por tanto, se siguió el comportamiento de los óvulos del 1 al 9 DDA. Aunque, tanto el óvulo como el saco embrionario incrementaron sus dimensiones, la tendencia de crecimiento se observó del 5 al 9 DDA (ver figura 3.9) (ver anexo 5).


Figura 3. 9. Dimensiones en µm de óvulos y sacos embrionarios en desarrollo de *Carludovica palmata*, desde el primer al décimo día después de antesis (DDA).

La ovocélula de *C. palmata*, tuvo una longitud de 14.56  $\pm$  0.16 µm y un ancho de 65.97  $\pm$  0.96 µm. Este tamaño se mantuvo constante, hasta que ocurrió la fecundación. Por su parte, el núcleo celular cambió su morfología, puesto que pasó de ser semi ovalado a ovalado (1-4 DDA) y el nucléolo modificó su posición al migrar desde la parte inferior hacia la parte superior del núcleo celular, donde se mantuvo previo y durante la fecundación. El nucléolo midió 14.01  $\pm$  0.21 µm por 9.90  $\pm$  0.79 µm (ver figura 3.10, tabla 3.1).

Las dos sinérgidas se encontraron sobre células nucelares alargadas, ambas células experimentaron un comportamiento de expansión, reacomodo (4, 6, 7 DDA) y nuevamente de expansión (ver figura 3.10, ver anexo 6). La sinérgida que flanqueó a la ovocélula en el lateral derecho ( $8.53 \pm 0.81 \mu m \times 11.21 \pm 0.65 \mu m$ ) fue más pequeña que la del lateral izquierdo (7.97  $\pm 0.74 \mu m \times 10.98 \pm 0.43 \mu m$ ) (ver anexo 6). La degeneración de la primera sinérgida tendió a ocurrir a partir del 8 DDA.



**Figura 3. 10. Análisis del comportamiento de la ovocélula y las sinérgidas de** *Carludovica palmata*. (A) En el 1 DDA, se observa una ovocélula con un núcleo celular semi ovalado, mientras que las sinérgidas son amorfas y pequeñas. (A) En el 2 DDA, el núcleo presenta una forma más parecida a un óvalo y las sinérgidas también han incrementado sus dimensiones. (C) En el 3 DDA, el tejido sobre el que se posiciona la ovocélula se vuelve a separar de las sinérgidas, mientras que éstas se observan mas largas y menos anchas. (D) Para el 4 DDA, la ovocélula se encuentra sobre el tejido y con forma ovalada, mientras que las sinérgidas, nuevamente se ven más anchas que largas. (E y F) En el 5 y 6 DDA, el nucléolo cambia su posición dentro del núcleo celular, mientras que las sinérgidas no tienen un cambio morfológico aparente. (G) En el 7 DDA, la ovocélula se observa aparentemente más grande y las sinérgidas vuelven a tener un comportamiento similar al descrito en la figura C. Finalmente en el 8 DDA, se observan (H) aparentemente dos núcleos dentro de una sinérgida y en otros casos (I) la degeneración de la misma. Micrografías obtenidas a partir de (A-I) clarificación de óvulos. Polo chalazal (ch), ovocélula (ovc), sinérgidas (flecha azul), sinérgida degenerada (flecha roja).

La célula central del saco embrionario de *C. palmata*, se integró por dos núcleos polares hasta previo la fecundación, midió  $33.17 \pm 0.76 \mu m$  de largo y  $22.22 \pm 0.27 \mu m$  de ancho (ver anexo 7). Ambos núcleos se desplazaron desde el polo chalazal hacia el polo exostomal en el transcurso de los primeros cinco días después de antesis. Durante los siguientes tres días (6-8 DDA) ocurrió la plasmogamia, y finalmente se convirtieron en el tercer tipo celular dentro del megagametofito (ver figura 3.11). Similarmente, las tres antípodas al 1 DDA se posicionaron en el área exostomal del saco embrionario, sufrieron un proceso de degeneración gradual que culminó en el 5 DDA. Momento en el que la célula central se posicionó sobre este tipo celular (antípodas), excepto en algunas ocasiones que se posicionó a cierta distancia (ver figura 3.12). Las dimensiones de cada antípoda en relación con su proceso de degeneración se muestran en la tabla 3.1.



**Figura 3. 11. Análisis del comportamiento de la célula central del saco embrionario de** *Carludovicapalmata.* (A) En el 1 DDA, hay dos células posicionadas cerca y sobre la ovocélula. (B) En el 3 DDA, ambas células se obsevan cerca de las antípodas en proceso de degeneración. (C) En el 5 DDA, las dos células están posicionadas sobre las antípodas degeneradas (punta de flecha roja). (D) Aproximadamente 24 horas después, se observa que hay desaparición de una región entre las dos membranas de las células (punta de flecha negra), (E) desaparición que continúa en el día 7 DDA. Finalmente, en el 8 DDA, hay una desaparición total de la membrana entre ambas y en consecuencia queda una célula con dos núcleos polares. Micrografías obtenidas a partir de (A-F) clarificación de óvulos. Célula central (cc), ovocélula (ovc) antípodas (antps), polo chalazal (ch).



Figura 3. 12. Análisis del comportamiento de las antípodas de *Carludovica palmata*. (A) Tres antípodas bien definidas fueron observadas en el 1DDA, (B) mientras que una de ellas se observa degenerada en el 2 DDA. (C) Posteriormente, se degenera otra más y solo queda una antípoda completamene definida para el 3 DDA. (D) En el 4 DDA, se observa una mancha completamente oscura que corresponde a dos antípodas degeneradas, mientras que la tercer antípoda no se observa definida. (E) Ya para el 5 DDA, solo se visualiza una gran mancha negra, correspondiente a las tres células degeneradas. (F) Cabe destacar, que en la mayoría de los sacos embrionarios analizados, la célula central se posiciona sobre las antípodas degeneradas. Micrografías obtenidas a partir de (A-F) clarificación de óvulos. Polo exostomal (exst), célula central (cc), antípodas (punta de flechas negras), antípodas degeneradas (punta de flechas rojas).

DDA	A (μm)		Β (μm)		C (μm)	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho
1	23.94	30.00	20.58	25.88	33.52	20.58
2	23.53	34.70	20.00	17.64	х	Х
3	22.05	17.05	15.00 x 22.35*			
4	9.37	15.00	12.75 x 12.50*			
5	12.05 x 11.76*					

Tabla 3. 1. Comportamiento y dimensiones de las antípodas de Carludovica palmata.

\*células degeneradas.

# 3.1.2. LA DOBLE FECUNDACIÓN

La fecundación de la ovocélula (ver figura 3.13 A-D) y de la célula central (ver figura 3.13 E-H) en el interior del megagametofito de *C. palmata* ocurrió a partir de los 9 DDA. En este momento, el saco embrionario midió 504.04 ± 17.0492 × 232.08 ± 18.5734 µm (ver anexo 5), tanto la ovocélula como la célula central mantuvieron sus dimensiones (ver sección 3.1.1.3) y las dimensiones del gameto masculino fueron 17.86 ± 0.9861 × 15.00 ± 0.4214 µm. Este suceso fue asincrónico (ver figura 3.14).



**Figura 3. 13. Doble fecundación en Carludovica palmata.** (A y B) Posicionamiento del gameto masculino sobre la ovocélula. (C y D) Momento de la fusión de los gametos. (E y F) Momento en el que el segundo gameto masculino se posiciona sobre la célula central con dos núcleos polares. (G y H) Usualmente, la segunda fecundación ocurre sobre las antípodas degeneradas. Micrografías obtenidas a partir de (A-H) clarificación de óvulos. Polo chalazal (ch), polo exostomal (exst), esperma (esp), ovocélula (ovc), núcleos polares (puntas de flecha blanca), zonas de acercamiento (recuadros punteados).



**Figura 3. 14. Fecundación asincrónica de la ovocélula y la célula central en** *Carludovica palmata.* (A) Composición del megagametofito en el que se observa el momento de (B) la fusión triploide 1N (gameto masculino) + 2N (núcleos polares) para posteriormente formar la célula primaria del endospermo; simultáneamente en el polo chalazal se observa (C) el cigoto. Micrografías obtenidas a partir de (A-C) clarificación de óvulos. Célula central postfecundada (cc pfcn), cigoto (cgt), polo exostomal (exst), núcleos (punta de flechas azules), polo chalazal (ch).

# 3.1.3. EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA

El desarrollo del embrión cigótico en *C. palmata* se caracterizó a nivel morfohistológico. Con base al análisis de los estadios considerados en este trabajo, este proceso se dividió en tres etapas:

(1) La ontogenia, que inició con la formación del cigoto, pasando por cariogamia y plasmogamia (ver figura 3,15 A, B) hasta la formación de un proembrión multicelular. El esporofito midió 44.45 ± 1.92 μm × 21.60 ± 0.35 μm (ver anexo 8), previo la cariogamia aún se observó la segunda sinérgida sin degeneración. La primera división celular ocurrió en plano transversal y formó un proembrión bicelular, que se caracterizó por tener una célula apical (ca) más grande que la célula basal (cb) (ver figura 3.15 C). La segunda división ocurrió en la cb en plano longitudinal (ver figura 3.16 A), suceso que dio origen a

un proembrión tricelular (ver figura 3.15 D). A los 20 DDA se observó un proembrión con forma de pera, con planos de división difíciles de identificar (ver figura 3.15 E).

- (2) El patrón y crecimiento, este estadio inició con la identificación de un embrión globular con suspensor corto a los 30 DDA (ver figuras 3.15 F; 3.16 B, C). Seguido del embrión de 40 DDA (L1) que presentó un suspensor más definido, diferenciación de protodermis y un cotiledón indiferenciado (ver figura 3.15 G). Diez días después (50 DDA, L2), la morfología embrionaria apenas se modificó, el suspensor sufrió divisiones aparentemente longitudinales y se comenzó a diferenciar el futuro cotiledón (ver figura 3.15 H). El embrión L3 (60 DDA) sufrió crecimiento y diferenciación del cotiledón, de RAM y de SAM (ver figuras 3.16 D, F); esta última zona meristemática se localizó en el lateral derecho, cerca de la porción media de la longitud total del embrión, con dos primordios foliares ya diferenciados, sobre el epicótilo (ver figura 3.15 I, 3.16 E).
- (3) La maduración del embrión abarcó desde los 70 hasta los 100 DDA (L4-L7) (ver figuras 3.15 J-M), cuando tanto SAM y RAM estuvieron diferenciados (ver figuras 3.16 G-I), el embrión ya no tuvo un cambio morfológico contrastante; en cambio se observó alargamiento y la diferenciación de tejidos específicos hasta los 100 DDA.

El embrión de 100 DDA fue considerado maduro, debido a que (i) el tejido que lo recubría (baya) se encontró maduro e histológicamente, (ii) tanto el eje embrionario como sus meristemos fundamentales se encontraron totalmente diferenciados. Similarmente a las diferencias morfológicas reportadas en semillas de 100 DDA (ver figura 3.17 A), se encontraron tres morfotipos de embriones, con una proporción de 0.5 (ver figura 3.17 B), 0.2 (ver figura 3.17 D) y 0.3 (ver figura 3.17 E). La caracterización histológica se realizó basándose en el morfotipo 3.17 B debido, a que se encontró en mayor proporción.



**Figura 3. 15. Etapas caracterizadas durante la embriogénesis cigótica de Carludovica palmata**. Este proceso, se dividio en tres estadios: (1) ontogenia, que abarca desde el cigoto subdividio en (A) plasmogamia y (B) cariogamia, (C-E) las subsecuentes divisiones que conforman una masa celular denominada proembrión, posteriormente ubicamos el (2) patrón y crecimiento del embrión, donde se pudo encontrar el (F) subestadío globular y a partir de ahí, una serie de divisiones en diferentes planos que empezaron a denominarse (G) L1, (H) L2 e (I) L3 donde se pudo observar la diferenciación tanto de SAM y RAM. Finalmente se encontró (3) la maduración, que incluyó cuatro subestadios denominados (J) L4, (K) L5, (L) L6 y (M) L7. Micrografias obtenidas a partir de (A-C) clarificación, (E-M) cortes histológicos de 8 – 20 um teñidos con TBO y (D) contraste de fases. Chalaza (ch), célula apical (ca), célula basal (cb), suspensor (ssp), células protodérmicas (ptd), meristemo apical de la raiz (RAM), meristemo apical del brote (SAM).



**Figura 3. 16. Eventos importantes durante la embriogénesis cigótica en** *Carludovica palmata.* (A) La segunda división celular ocurre en el plano longitudinal en la célula basal. Diferenciación de: SAM a través de cortes transversal en la zona apical del embrión (B) globular, (D) L3, (G) L5; de RAM a través de cortes transversales en la zona basal del embrión (F) L3, (H) L5. Corte longitudinal en embriones (C) globulares donde se observa el suspensor; (E) L3, donde se observa el SAM y la diferenciación de sus dos primordios foliares. (I) Acercamiento de la zona meristemática. Micrografías obtenidas a partir de (A-H) cortes histológicos de 8 – 20 um teñidos con azul de toluidina. Célula basal 1 (cb1), célula basal 2 (cb2), suspensor (ssp), meristemo apical del brote (SAM), epicotilo (epc), primordios foliares (asteriscos), meristemo apical de la raíz (RAM).



**Figura 3. 17 Diferentes morfologías encontradas** en (A) semillas de 100 DDA; (B, D, E) embriones. (C) Acercamiento al cotiledón y (F) al suspensor. Micrografías obtenidas a partir de (A-F) MEB. Cotiledón (ctl), radícula (rdc), suspensor (ssp), el número indica la morfología de la semilla y su embrión correspondiente.

De acuerdo con la clasificación de Martin (1946), el embrión de *C. palmata* fue antítropo (radícula orientada hacia el endostoma), axial y lineal. Sus dimensiones en la etapa L7 fueron de aproximadamente 759.78 µm de largo × 172.5 µm de ancho. Se encontró integrado por un gran cotiledón (ver figura 3.17 C), subdividido en dos regiones: apical y basal (ver figura 3.18 A). En la región apical, se identificó un haz de tejido procambial integrado por células pequeñas, alargadas y con tinción más intensa, debido principalmente a la cromatina condensada presente en sus núcleos (ver figura 3.18 B); células similares se observaron en la periferia apical del cotiledón (ver figura 3.18 C, D). La presencia de estas regiones meristemáticas (adicionales al meristemo fundamental) son importantes debido a una posible función de crecimiento (post maduración) en el embrión o en eventos durante y después de la germinación. Asimismo, se identificaron células tabulares de protodermis recubriendo la periferia del embrión (ver figura 3.18 B).

En embriones L7 de *C. palmata* el suspensor corto persistió (ver figuras 3.17 F, 3.18 E). Presentó un SAM y un RAM conectados entre sí por un corto hipocótilo. El SAM estuvo localizado a un tercio del largo total del embrión, cubierto por un coleóptilo e integrado por dos primordios foliares curvos diferenciados (ver figuras 3.18 F-H). Por su parte, el RAM se situó a poca distancia del suspensor, estuvo recubierto por una cofia (ver figuras 3.18 I-K).



**Figura 3. 18 Caracterización de embrión maduro (100 DDA) de Carludovica palmata.** (A) Anatomía. (B) Localización del procambio y la protodermis. (C) Región periférica y apical del cotiledón. (D) Corte transversal que muestra la localización.(E) Suspensor que une al embrión con el resto de la semilla. Localización de SAM en el embrión, en algunas semillas los primordios se encuentran (F) menos diferenciados, que (G) en otros. (H) Corte transversal del embrión donde se comprueba la existencia de dos primordios. (I, J) Localización de RAM en el embrión. (K) Corte transversal de RAM. Micrografías obtenidas a partir de (A-K) cortes histológicos de 10, 15, 20 µm teñidos con azul de toluidina. Radícula (rdc) hipocotilo (hpc), cotiledón (ctl), porción apical (a), porción basal (b), endostoma (endt), meristemo apical de la raíz (RAM), suspensor (ssp), coleóptido (clp), primordios florales (asteriscos), cofia (cof), procambio (prc), protodermis (ptd). Las líneas punteadas en C, G, J indican la localización aproximada del corte transversal D, H, K respectivamente.

#### 3.1.4. DESARROLLO DE LA SEMILLA

Después de la fertilización, el desarrollo de la semilla de *C. palmata* duró aproximadamente 90 días (10 – 100 DDA), este período se subdividió en dos procesos: (1) morfogénesis y (2) maduración.

#### 3.1.4.1. Morfogénesis

La morfogénesis en la semilla de *C. palmata* tuvo una duración de 50 días aproximadamente; este proceso inició 10 DDA, las dimensiones de la semilla fueron 784.39  $\pm$  18.8624 µm de largo, 373.20  $\pm$  16.3879 µm y 281.35  $\pm$  7.9038 µm de ancho en el polo chalazal y exostomal respectivamente (ver figura 3.19 A) (ver anexo 5). La epidermis tuvo una superficie corrugada (ver figura 3.19 B). Anatómicamente, se identificaron elementos ya descritos en el presente estudio para los óvulos de *C. palmata* (ver figura 3.19 C) (ver sección 3.1.1.1); además se observó mayor número de proyecciones nucelares en el área cercana al endostoma, donde convergen los haces ovulares (ver figura 3.19 G).

En su interior, el saco embrionario de 10 DDA midió aproximadamente  $503.54 \pm 17.6884 \times 233.67 \pm 6.2766 \mu m de largo y ancho respectivamente (ver anexo 5). Se caracterizó por las primeras etapas de la embriogénesis cigótica (ver figura 3.15 A-D) y la endospermogénesis. El esporofito se orientó hacía el polo chalazal y se posicionó sobre una pared de protuberancias internas derivadas de células nucelares alargadas, denominada perisperma (ver figura 3.19 G). Cerca del polo exostomal se ubicó una cámara micropilar pequeña; mientras que, un sincitio ocupó el espacio restante y se conformó por máximo cuatro núcleos ovoides, con posiciones definidas: uno se localizó cerca del esporofito, dos situados en la región media y el restante se orientó hacia la cámara micropilar; cada uno midió 17.16 <math>\pm$  0.0826 µm x 16.80  $\pm$  0.0840 µm (ver figura 3.19 G). Cerca del y, por tanto *C. palmata* presentó un endospermo tipo helobial. El análisis histológico reveló presencia de polisacáridos como constituyentes en la nucela externa y las proyecciones nucelares, así como el inicio de muerte celular programada (PDC por sus siglas en inglés) en la nucela externa al saco embrionario, que se confirmó por la presencia de lípidos en el área (ver figuras 3.22 A-D, 3.23 A-C).



**Figura 3. 19.Semilla de 10 DDA (primer día de desarrollo) de Carludovica palmata**. (A) Morfología y (B) superficie de la epidermis. (C) Anatomía y eventos que ocurren simultáneamente, como el desarrollo temprano del endospermo con una primera división mitótica, que dio origen a (D) una cámara micropilar y a un sincitio, compuesto por hasta cuatro núcleos, (E) donde cada uno es ovoide. (F) Corte transversal, donde se observa la presencia de proyecciones nucelares en el perímetro interno del saco embrionario, así como (G) los haces ovulares desembocando en la nucela. Micrografías obtenidas mediante (A, B) MEB, (C-E) clarificación de óvulos, tinción con (F) azul de toluidina y (G) PAS. Funículo (fnc), exostoma (exst), endostoma (endt), nucela (ncl) haces ovulares (hcs) cámara micropilar (CM), cámara chalazal (CC) núcleo (en), idioblasto (idb), aparato filar, círculo verde = cámara chalazal, rectángulos rojos = núcleos del endospermo.

En el lapso de 20-30 DDA, el esporofito pasó de ser un proembrión a un embrión globular (ver figuras 3.15 D-F, 3.20 C); al final de este período la semilla alcanzó las siguientes medidas 1437.73  $\pm$  15.0454 µm de largo, 722.95  $\pm$  11.7901 µm y 713.65  $\pm$  4.0198 µm de ancho en el polo chalazal y exostomal respectivamente (ver figura 3.20 A) y tuvo una superficie con pequeñas protuberancias visibles bajo el microscopio electrónico de barrido (MEB) (ver figura 3.20 B). Entre los 11 a 20 DDA, la nucela externa culminó la PDC dejando como residuo una capa lipídica; mientras que, en el perímetro del saco embrionario se formó otra capa lipídica probablemente producto de PDC en la capa de proyecciones nucelares contigua y más cercana a la zona. En consecuencia, se formó un canal situado entre el tegmen y el endospermo en desarrollo, flanqueado por capas lipídicas (ver figuras 3.23 F, I), en cuyo interior comenzó la movilización (ver figura 3.20 D); 3.23 D, E, G, H) y acumulación de polisacáridos en células parenquimáticas (ver figura 3.20 E). Similarmente, se observó PDC en las proyecciones nucelares internas (ver figuras 3.20 D, F; 3.23 D).

El proceso de endospermogénesis continuó. Se identificó un mayor número de núcleos (ver figuras 3.20 G, 3.22 E, F) desde los 20 DDA en la cámara chalazal. Mientras que, el proceso de alveolización inició entre el período comprendido de 20 a 30 DDA, puesto que, en este estadio se identificó el proceso ocurriendo desde la periferia y aparentemente implicó condensación y reorganización de redes de polisacáridos (ver figuras 3.20 F, H; 3.22 G, I-K). En cambio, la cámara micropilar mostró divisiones citocinéticas lentas, por lo que su desarrollo fue de tipo celular (ver figura 3.20 I). La presencia y acumulación de lípidos en el endospermo apenas fue detectada con la tinción con Sudan IV (ver figuras 3.22 H, L).



**Figura 3. 20. Eventos presentes en la semilla de 20-30 DDA de Carludovica palmata**. (A) Morfología y (B) superficie de la epidermis y (C) anatomía interna. (D) Movilización y (E) almacenamiento de (F) polisacáridos, así como muerte celular programada de las proyecciones nucelares. (G) Disposición espacial entre el endospermo nuclear y las proyecciones nucelares. (H) Inicio de la alveolización en los núcleos. (I). Disposición espacial entre el endospermo nuclear y el endospermo celular. (A-C, F, H, I) 30 DDA, (D, E, G) 20 DDA. Micrografías obtenidas por (A, B) MEB y por tinción con (C-E, G-I) azul de toluidina y (F) PAS-ANN. Protuberancias (punta de flecha), endospermo celular (cend), endospermo nuclear (nend), nucela (ncl), embrión (emb), proyecciones nucelares (pry), polisacáridos (pls), tegumento interno (tgm in), núcleo (en).

La morfogénesis culminó aproximadamente a los 60 DDA. Ahora bien, de 40 a 60 DDA, el embrión continuó su desarrollo hasta alcanzar su diferenciación (ver figura 3.15 G-I). Para los 50 DDA, la semilla cumplió 40 días de desarrollo y midió un promedio de 1674.68 ± 9.3041 µm de largo, 929.25 ± 14.8624 µm y 884.80 ± 6.2947 µm de ancho en el polo chalazal y exostomal respectivamente (ver figura 3.21 A), sobre su epidermis se distinguieron células bien definidas (ver figura 3.21 B). La PDC de las proyecciones nucelares persistió, encontrando a los 60 DDA solo remanentes de estos tipos celulares (ver figuras 3.21 C; 3.23 J, K, M, N, O, P). La alveolización de los núcleos continuó a los 40 DDA (ver figuras 3.21 I; 3.22 M-O) y a los 50 DDA, este evento sólo se observó en la región central del endospermo nuclear (ver figura 3.21 D; 3.22 Q, S) puesto que la periferia de la cámara chalazal estaba completamente celularizada (ver figura 3.22 R). Por su parte, el endospermo celular ya había ocupado un tercio del espacio total dentro de la semilla y mostró células de parénquima (ver figura 3.21 D, J). Diez días después (60 DDA), todo el endospermo estaba casi celularizado y fue difícil diferenciar el nuclear del celular (ver figura 3.21 F; 3.22 U, V).

El análisis histoquímico demostró que la presencia de lípidos incrementó a partir de los 40 DDA, cuando en las vacuolas que rodeaban a los núcleos se observó coloración positiva a Sudan IV (ver figura 3.22 P). A los 50 DDA comenzaron a observarse cuerpos lipídicos dentro de las células aún en proceso de celularización (ver figura 3.22 T) y a los 60 DDA, la distribución de estas moléculas hidrofóbicas estuvo presente en todas las células del parénquima constituyentes del endospermo (ver figura 3.22 X), al mismo tiempo que se empezó a identificar presencia de proteínas en núcleos que no celularizaban por completo (ver figura 3.22 W). A los 50 DDA se encontró presencia de perisperma cerca del polo exostomal y endostomal (ver figura 3.21 E, G). Por su parte, la circulación de los polisacáridos aumento a los 40 DDA (ver figura 3.23 K) y a partir de ahí disminuyó (ver figura 3.21 E; 3.23 N, P) hasta que a los 60 DDA se encontraron células parenquimáticas vacías (ver figura 3.21 H). Por el contrario, la movilización de lípidos inicio a los 40 DDA (ver figura 3.23 L) e incrementó a los 50 DDA (ver figura 3.23 Ñ), pero a los 60 DDA se observó una ligera disminución, así como el engrosamiento de las dos capas lipídicas hasta casi posicionarse una junto a la otra (ver figura 3.23 Q).



**Figura 3. 21. Eventos presentes en la semilla de 40-60 DDA de** *Carludovica palmata.* (A) Morfología y (B) células epidérmicas. (C) PDC en proyecciones nucelares, (D) Anatomía interna y (E) perispermo situado en el polo exostomal. (F) Anatomía interna que muestra celularización casi completa del endospermo. (G) Perispermo orientado hacia el polo endostomal. (H) células del parénquima vacías. (I) vacuolización de los núcleos en el endospermo nuclear. (J) células del endospermo celular. (A, B, D, E, G, I, J) 50 DDA, (C, F, H) 60 DDA. Micrografías obtenidas por (A, B) MEB, (C-J) tinción con azul de toluidina. Chalazal (CH), proyecciones nucelares (pry), embrión (emb), endospermo celular (cend), endospermo nuclear (nend), parénquima (prq), endostoma (endt), exostoma (exst), perispermo (prsp).



Figura 3. 22. Caracterización histoquímica del endospermo nuclear en la fase de morfogénesis durante el desarrollo de la semilla de *Carludovica palmata*. Tinción con (A, E, I, M, Q, U) azul de toluidina y (B, F, J, N, Ñ, R, V) sus acercamientos; (C, G, K, O, S, W) PAS-ANN y (D, H, L, P, T, X) Sudan IV. Núcleo De endospermo (en), lípido (lip), polisacáridos (pls), células de parénquima (prq), proteínas (prt). Los números (10, 20, 30, 40, 50 y 60) corresponden a los DDA.



Figura 3. 23.Caracterización histoquímica del transporte de macromoléculas y formación de la cutícula en la fase de morfogénesis durante el desarrollo de la semilla de *Carludovica palmata*. Tinción con (A, D, G, J, M, O) azul de toluidina, (B, E, H, K, N, P) PAS-ANN Y (C, F, I, L, Ñ, Q) Sudan IV. Tegumento interno (tgm in), nucela externa(ncl), proyecciones nucelares (pry), polisacáridos (pls), lípidos (lip), endospermo nuclear (nend). Los números (10, 20, 30, 40, 50 y 60) corresponden a los DDA.

#### 3.1.4.2. Maduración

El proceso de maduración en la semilla de *C. palmata* inició entre los 61 a 70 DDA, alcanzando un tamaño a los 70 DDA de 1849.50  $\pm$  9.8634 µm de largo, 952.30  $\pm$  13.5022 µm y 821.69  $\pm$  2.0341 µm de ancho en el polo chalazal y exostomal respectivamente (ver figura 3.24 A). Las células epidérmicas se mostraron bien definidas (ver figura 3.24 B). El embrión también entró a fase de maduración (ver figuras 3.15 J, K). Las células parenquimáticas del endospermo mostraron celularización total (ver figura 3.24 C, 3.26 A, B). A partir de los 70 DDA, tanto en el endospermo como en el embrión (ver figura 3.24 D) se encontró diferenciación y especialización de células de parénquima aleuronífero (ver figura 3.24 C) y a los 80 días se encontró parénquima oleífero (ver figura 3.24 I). La acumulación y distribución de proteínas y lípidos pareció mostrar un comportamiento similar en semillas de 70 y 80 DDA (ver figuras 3.26 A-I). Durante este período (70 a 80 DDA), no se encontró evidencia de transporte de nutrientes en la periferia del endospermo (ver figura 3.27 A, D), sino que se observó una capa lipídica junto a la otra, con una pequeña línea de polisacáridos entre ambas (ver figuras 3.27 B, C, E, F).

Finalmente, en el período de los 90 a 100 días, la semilla tuvo cambios morfológicos mínimos y un crecimiento considerable, en comparación a los 70 DDA. Las dimensiones de la semilla fueron de 2449.72  $\pm$  161.5 µm de largo, 2145.35  $\pm$  78.0271 µm y 1060.93  $\pm$  52.36 µm de ancho en el polo chalazal y exostomal respectivamente (ver figura 3.25 A). Las células del perisperma se encontraron cerca del exostoma (ver figura 3.32 A) y las epidérmicas se observaron bien definidas (ver figuras 3.25 B). A los 100 DDA, tanto el endospermo como el embrión mostraron maduración morfológica (ver figuras 3.25 C, D, E, F, G), La acumulación masiva de sustancias de reserva, tanto en el embrión como en el endospermo, siguió una distribución homogénea (ver figuras 3.25 H-M). Al interior de las células parenquimáticas (ver figuras 3.26 J, K, N, Ñ) se encontraron oleosomas (ver figuras 3.26 M, P), cuerpos proteicos y amiloplastos (ver figuras 3.26 L, O) situados en lugares específicos dentro de cada célula. En la región limítrofe de las dos capas de lípidos de la cutícula se encontró presencia de polisacáridos y lípidos, por lo que probablemente sea algún tipo de lipopolisacárido, sin embargo, se recomienda hacer análisis más detallados al respecto. Asimismo, a los 100 DDA, la bicapa lipídica tendió a separarse ligeramente (ver figuras 3.27 G-L).



**Figura 3. 24. Eventos presentes en la semilla de 70-80 DDA de Carludovica palmata**. (A) Morfología y (B) células epidérmicas. (C) Anatomía interna que muestra la celularización total del endospermo. (D) Corte transversal donde se muestra las células parenquimáticas del endospermo, así como al embrión y la especialización de células de almacenamiento. (E) célula parenquimática oleífera. (A, C) 70 DDA, (D, E) 80 DDA. Micrografías obtenidas por (A, B) MEB, (C-E) tinción con azul de toluidina. Funículo (fnc), polo chalzal (CH), endospermo (end), embrión (emb), lípido (lip).



**Figura 3. 25. Eventos presentes en la semilla de 90-100 DDA de Carludovica palmata**. (A) Morfología y (B) células epidérmicas. (C) Anatomía interna. Corte transversal (D) donde se muestra las células parenquimáticas del endospermo, (E) así como al embrión; así como la celularización de parénquima en el endospermo y el (G) Embrión. Presencia de (H, J, K) lípidos en endospermo y embrión; así como de (I, L, M) polisacáridos y proteínas en endospermo y embrión. Micrografías obtenidas por (A, B, D, E) MEB, Tinción con (C, F, G) azul de toluidina, (H, J, K) Sudan IV y (I, L, M) PAS-ANN. Funículo (fnc), polo chalazal (CH), endospermo (end), embrión (emb).



**Figura 3. 26. Caracterización histoquímica del endospermo nuclear en la fase de maduración, durante el desarrollo de la semilla de** *Carludovica palmata***. Tinción con (A, E, J, Ñ) azul de toluidina y (B, F, G, K, Ñ) sus acercamientos; (C, H, L, O) PAS-ANN y (D, I, M, P) Sudan IV. Lípido (lip), polisacáridos (pls), proteínas (prt). Los números (70, 80, 90 y 100) corresponden a los DDA.** 



**Figura 3. 27.Caracterización histoquímica del transporte de macromoléculas y formación de la cutícula en la fase de maduración, durante el desarrollo de la semilla de** *Carludovica palmata***. Tinción con (A, D, G, J) azul de toluidina, (B, E, H, K) PAS-ANN y (C, F, I, L) Sudan IV. Lípido (lip), polisacáridos (pls), proteínas (prt). Los números (70, 80, 90 y 100) corresponden a los DDA.** 

# 3.1.5. FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS MADURAS DE *C. PALMATA*.

Como resultado de los análisis expuestos hasta el momento, se identificaron diferentes posibles defectos asociados a la gametogénesis y fecundación, que inciden en la formación y germinación de semillas en *C. palmata*. Estas incluyen anomalías en el saco embrionario, ausencia de fecundación, abortos de semillas, así como la formación de una cutícula extra y de rafidios en las semillas. Estas se discuten a continuación.

## 3.1.5.1. Anomalías en el megagametofito.

Se encontraron tres tipos de anomalías en cerca del 20% (22.22) de los megagametofitos maduro de *C. palmata*:

- En el 10% de los óvulos se encontró vacío el saco embrionario, ya que no se identificó la presencia de ninguno de los cuatro tipos celulares característicos, solo se observaron células nucelares alargadas (ver figuras 3.28 A, B).
- En cerca del 7% (6.67%) de los óvulos, el saco embrionario mostró células subdesarrolladas. El caso más frecuente fue en ovocélula, pero también se detectó en la célula central (ver figuras 3.28 C, D).
- En casi el 6% (5.55) de los óvulos, el saco embrionario tenía células fuera de lugar. Las células no se encontraron en las posiciones caracterizadas en la sección 3.1.1.3 (ver figuras 3.28 E, F).

# 3.1.5.2. Ausencia de fecundación

Después de 9 DDA, el 30% de los óvulos con gametofito sin anomalías, no presentó evidencia de eventos de doble fecundación o postfecundación (ver anexo 9). Esto sugiere que no fueron polinizados.



**Figura 3. 28. Anomalías presentes en los megagametofitos de Carludovica palmata**. (A y B) Sin desarrollo. (C y D) Tipos celulares subdesarrollados. (E y F) Tipos celulares en posiciones diferentes a las caracterizadas. Micrografías obtenidas por (A-F) clarificación de óvulos. Células nucelares alargadas (ncl alr), ovocélula (ovc).

## 3.1.5.3. Semillas abortadas

A partir de los 30 DDA se identificaron *en C. palmata*, además de las semillas descritas en la sección 3.1.4.1, otras pequeñas (ver figura 3.29 A, B), con morfología y epidermis similar a la caracterizada para 10 DDA (ver figura 3.29 D), con un promedio de 991.07  $\pm$  23.5023 µm de largo, 388.50  $\pm$  12.4563 µm y 348.11  $\pm$  28.4573 µm de ancho en el polo chalazal y exostomal respectivamente (ver figura 3.29 C). Este tipo de semillas se clasificó en dos tipos: (1) el 70% resultó estar vacía, solo con una pequeña nucela degenerada (ver figura 3.29 E, F); mientras que, en el resto se encontró presencia de embriones y/o endospermo subdesarrollado y un gran espacio vacío (ver figuras 3.29 G, H); por tanto, estas semillas fueron consideradas como abortadas. A pesar de no encontrar un desarrollo de endospermo o embrión avanzado si se detectó desarrollo y diferenciación celular en las capas seminales de estas estructuras. A su vez, la ausencia de fecundación y las anomalías en el megagametofito pudieran contribuir en estos eventos de aborto.

## 3.1.5.4. Formación de cutícula extra

En semillas maduras (100 DDA) se encontró la presencia de una doble cutícula situada entre el endospermo y el tegmen de la semilla, esta doble capa lipídica periférica, cubrió incluso el área cercana a la radícula del embrión (ver figuras 3.27 J-L).



**Figura 3. 29. Caracterización de semillas abortadas a los 30 DDA en Carludovica palmata.** (A, B) Diferencias en tamaño de semillas abortadas respecto a semillas en desarrollo. (C) Morfología de semillas abortadas y (D) su epidermis. (E, F) Semillas abortadas con nucela degenerada y (G, H) con embrión y endospermo semidesarrollado. Micrografías obtenidas por (A-D) MEB, (E, G) clarificación y (F, H) cortes histológicos. Nucela degenerada (ncl dgn), embrión subdesarrollado (sbd), endospermo subdesarrollado (end sbd), semillas abortadas (punta de flecha).

# 3.1.5.5. Formación de rafidios

En semillas de 100 DDA se comprobó la presencia de rafidios e idioblastos, formando una capa con posición contigua al tegmen (ver figuras 3.30 A, B). En el interior de cada idioblasto y envuelto en una matriz de polisacáridos y proteínas (ver figura 3.30 C), se encontró un paquete de rafidios posicionados uno junto a otro (ver figuras 3.30 D, E). Cada rafidio tuvo forma de aguja (ver figura 3.30 F), y con base en el análisis histoquímico, resultó ser compuesto de oxalato de calcio, debido a la respuesta frente a HCI (ver figura 3.31 C, D) y no frente CH<sub>3</sub>COOH (ver figura 3.31 A, B), así como por su tinción con el rojo de alizarina (ver figura 3.31 E, F).

Debido a que, tanto en cortes longitudinales (ver figura 3.32 A) como transversales (ver figura 3.32 B), los idioblastos-rafidios se dispusieron como una capa celular (ver figura 3.32 C), se asumió que su distribución en semillas maduras se extendió en todas las direcciones. La presencia de estos cristales se observó desde el primer día del desarrollo de la semilla (10 DDA) (ver figura 3.32 D), en contraposición en óvulos previo la fecundación donde no se encontró evidencia alguna (ver figura 3.32 E).

Lo anterior, condujo al análisis de óvulos entre el 1 al 10 DDA. Se determinó que a partir del 4 DDA inició un proceso de biomineralización, al diferenciarse células grandes poliédricas y nucleadas denominadas idioblastos, en la tercera capa del integumento interno (ver figura 3.33 A, B). Asimismo, inició la acumulación de un compuesto no identificado en este trabajo en la parte lateral de la célula (ver figura 3.33 C). 24 horas más tarde se identificó la presencia del (los) primero(s) rafidio(s) en su interior (ver figura 3.33 D). El incremento en el número de rafidios dentro de cada idioblasto, así como en su longitud se evidenció a partir del 6 DDA (ver figura 3.33 D, E, F, G). Finalmente fue a partir del 8 DDA, cuando se observó que los idioblastos se alinearon unos con otros; mientras que los rafidios en su interior, con la misma orientación, parecieron formar una línea discontinua que bordeaba el interior del óvulo (ver figura 3.33 H, I).



**Figura 3. 30. Caracterización de idioblastos y rafidios en** *Carludovica palmata*. (A) Corte transversal donde se observa un tegmen y una compleja testa integrada por cinco capas celulares, una de ellas constituidas por (B) rafidios contenidos en idioblastos. (C) Histoquímica en idioblastos, donde se observa su composición rica en polisacáridos y proteínas. Estructura tridimensional de un idioblasto y su contenido visto desde un corte (D) longitudinal y (E) transversal. (F) Morfología típica de un rafidio. Micrografías obtenidas por (A, B) tinción con azul de toluidina. (C, D, F) MEB, (E) tinción PAS-ANN. Tegmen (tgm), rafidio (rfd), testa (tst), idioblasto (idb), proteína (prt), polisacáridos (pls).



**Figura 3. 31. Caracterización histoquímica de los rafidios en** *Carludovica palmata.* Exposición de rafidios frente a: ácido acético (A) antes y (B) después (al no cambiar su morfología se descarta su composición como carbonatos o fosfatos); HCI (C) antes y (D) después (al modificar su morfología dan positivo para oxalato). (E-F) Respuesta a tinción com rojo de alizarina (al teñirse en rojo-naranja, dan positivo para Ca<sup>2+</sup> y se descarta su composición como Si). Micrografías obtenidas por (A-D) microscopía de campo claro, (E-F) Tinción con rojo de alizarina. Recuadros punteados señalan zonas amplificadas, cambio morfológico de los cristales se señala con flechas, iones calcio (Ca<sup>2+</sup>).



**Figura 3. 32. Presencia y localización de rafidios e idioblastos en semillas de** *Carludovica palmata*. A los 100 DDA, tanto en corte (A) longitudinal como (B) transversal, (C) se dispusieron formando una línea. (D) A 10 DDA se identificaron rafidios y (E) en óvulos de 1 DDA no se identificaron rafidios y/o idioblastos. Micrografías obtenidas por (A-C) tinción con rojo de rutenio. (D-E) clarificación. Perisperma (psp), cutícula (ctc), endospermo (end), idioblasto (idb), rafidio (rfd).



**Figura 3. 33. Biomineralización de cristales en células dentro del integumento externo de los óvulos de** *Carludovica palmata.* (A) En el 1 DDA sólo se observan células parenquimatosas. Sin embargo, (B) en el día 4, se diferencian células grandes, poliédricas y nucleadas llamadas idioblastos. (C) En el 5 DDA, se observá una región más oscura en un lateral de la célula. (D y E) En el 6 DDA, se observa que dentro de las células se empiezan a acumular pequeños cristales en forma de aguja. (F y G) Ya para el 7 DDA, los cristales dentro de los idioblastos han incrementado su longitud y su número. (H e I) Para el 8 DDA, los rafidios dentro de los idioblastos son más notorios.Micrografías obtenidas por (A-I) clarificación de óvulos. Idioblasto (idbl), rafidios (puntas de flechas negras).

### 3.1.6. GERMINACION Y LATENCIA

La germinación casi nula de las semillas de *C. palmata* cultivada en la zona del norte de Campeche, sugiere latencia.

La hidratación después de la inmersión por 24 horas en agua sugirió que la latencia en la semilla de *C. palmata* no era física. La aplicación de un tratamiento de escarificación química repercutió en la desestabilización de las capas y tipos celulares constituyentes de la testa y del tegmen, esparciendo los contenidos celulares, entre ellos los rafidios que modificaron su morfología con este tratamiento, similar a lo observado con la exposición frente a HCI (ver figuras 3.34 A-C); por tanto, las semillas de *C. palmata* pueden presentar latencia fisiológica. Es probable, que la presencia de rafidios y/o la doble cutícula en semillas maduras, estén directamente implicados con los problemas de protrusión de la radícula. Asimismo, la germinación de semillas escarificadas inició a partir del día ocho con un máximo de  $20 \pm 2.89$  %; mientras que para el día 12 se incrementó a aproximadamente 93.33 ± 1.67 % y sorprendentemente 72 horas más tarde (día 15), este porcentaje llegó al 100% (ver anexo 10). La germinación en palma jipi aparentemente fue de tipo hipogeo (ver figura 3.35 A-F).



**Figura 3. 34. Efecto del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% en capas seminales de la semilla madura de** *Carludovica palmata***. (A) Los cortes transversales demuestran que las células que conforman la testa, el tegmen y la bicapa de cutícula quedan en su mayoría destruídas y su contenido celular, (D) por ejemplo, los rafidios quedan dispersos, e incluso (C) modifican su morfología. Micrografías obtenidas por (A, B) tinción con azul de toluidina, (C) exposición con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2%. Rafidio (rfd), modificación morfológica (señalado por punta de flecha).** 



**Figura 3. 35. Germinación y obtención de plántulas de** *Carludovica palmata.* (A) protrusión de la radícula, (B) alargamiento del hipocótilo y crecimiento de la raíz primaria. (C) crecimiento de los primordios foliares. (D) surgimiento de la primera raíz de anclaje. (E-F) plántulas. Escala = 2 mm

## 3.1.7. RECAPITULACIÓN DE LOS RESULTADOS

Con la información que se logró obtener sobre la caracterización de los diferentes eventos y el análisis del desarrollo de las semillas de *C. palmata* de plantas cultivadas bajo condiciones de riego continuo, sombra parcial y propagación vegetativa en la región norte del estado de Campeche, se sugiere que: el microgametofito maduro es bicelular hasta poco después de la elongación del tubo polínico y presenta problemas de calidad, puesto que tiene una viabilidad menor al 10% (7.43) del cuál cerca del 5% tiende a germinar precozmente (4.66). Mientras que, el megagametofito maduro se conforma por una ovocélula flanqueada por dos pequeñas sinérgidas orientadas hacia el polo endostomal del óvulo, una célula central binucleada que se

tiende a posicionar sobre tres antípodas degeneradas. Aunque se desconoce el día preciso de la polinización, ahora se sabe que la fecundación de la ovocélula y de la célula central binucleada es asincrónica y ocurre a los 9 DDA. A partir de este momento, inicia el desarrollo de la semilla que tiene una duración aproximada de 90 días y se subdivide en una etapa de morfogénesis (50 días) y otra de maduración (40 días), tanto la embriogénesis como la endospermogénesis se desarrollan simultáneamente. La embriogénesis a nivel morfohistológico se encuentra a su vez subdividida en una etapa ontogénica (cigoto-proembrión), seguida de otro periodo donde sucede un patrón característico de división celular-crecimiento (embrión globular- L3) y maduración (L4-L7), teniendo como resultado final un embrión lineal monocotiledóneo antítropo y axial. La endospermogénesis es de tipo helobial con celularización centrípeda. La morfogénesis se caracteriza por las primeras etapas del desarrollo del endospermo incluyendo la formación de una cámara chalazal con divisiones celulares y una cámara micropilar acitocinética incluyendo su secuenciado proceso de alveolización y celularización; así como por la formación del cigoto hasta la obtención de un embrión L3, además de una muerte celular programada de las provecciones nucelares internas y una movilización de polisacáridos y lípidos. Durante la maduración, el endospermo estuvo completamente celularizado y comenzó la acumulación de carbohidratos, polisacáridos y lípidos, mientras que el embrión estuvo diferenciado y únicamente siguió creciendo. Además, los resultados mostraron que, de los 62 óvulos por baya, cerca del 20% (22.22) de los megagametofitos presentan anomalías (sacos embrionarios vacíos, células subdesarrolladas o células fuera de lugar) y aproximadamente otros 20% (23.22%) no llegan a fecundarse por lo que ambos constituyen factores que originan un porcentaje aún no conocido de las semillas abortadas a los 30 DDA (vacías o con embriones y endospermo subdesarrollado) y por tanto también afectan la producción de semillas maduras; por otro lado, la formación de la cutícula extra así como, la presencia de rafidios de oxalato de calcio contenidos en idioblastos organizados en la circunferencia de la semilla, son otros dos factores que están implicados en los problemas de germinación, siendo ésta principalmente atribuida a la presencia de latencia fisiológica, que se rompe mediante la escarificación química.
# **CAPÍTULO IV**

### 4.1. DISCUSIÓN GENERAL

El microgametofito maduro en Carludovica palmata es monoporado, prolado, bicelular, autofluorescio en el canal azul -verde, con baja calidad ya que tuvo germinación precoz e in vitro de  $\approx$  4.66 ± 0.88 v 7.43 ± 0.50 % respectivamente. En cambio, al interior de cada óvulo anátropo, bitégmico, crasinucelado y con micrópilo en zigzag se encontró un megagametofito constituido por ocho núcleos, diferenciados en cuatro tipos celulares, que se desplazaron o degeneraron previo la doble fecundación, evento que sucedió asincrónicamente a los 9 DDA. A partir de los 10 DDA, inició el desarrollo de la semilla (morfogénesis y maduración), simultáneamente con la embriogénesis cigótica (ontogenia, patrón - crecimiento y maduración); ambos procesos implicaron cambios morfológicos (p. e. incremento de tamaño), anatómicos (p. e. muerte celular programada) e histoquímicos (p. e. transporte, acumulación y distribución de polisacáridos. proteínas y lípidos) que culminaron hasta los 100 DDA (tiempo definido por la apertura prematura de las infrutescencias). La celularización centrípeda total del endospermo helobial, y la diferenciación de SAM-hipocótilo-RAM en el embrión monocotiledóneo, axial y lineal marcó el inicio de la fase de maduración. Además, se caracterizaron tres eventos posiblemente implicados con los problemas de obtención de semillas maduras: (1) anomalías en el megagametofito (vacíos, células subdesarrolladas, células en posiciones diferentes), (2) ausencia de polinización y (3) abortos (vacíos, con embrión y/o endospermo subdesarrollado o ausente); así como dos eventos probablemente correlacionados con los problemas de germinación: (1) formación de cutícula y (2) presencia de idioblastos con rafidios de oxalato de calcio en su interior. La semilla de C. palmata en el sitio de estudio, presentó latencia fisiológica, que se rompió con un método de escarificación química con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, logrando en 15 días una germinación de 100%.

Las etapas de biología floral así como los patrones morfológicos y colorimétricos seleccionados en este estudio, se basaron en la caracterización realizada por Bacab-Caamal (2020). Tanto la apertura de la inflorescencia como el de la infrutescencia se originaron por mecanismos de deshidratación. Durante el período de colecta (2021), en el estado de Campeche se registraron temperaturas promedio y precipitación menor al de 2020 y 2019 (CONAGUA, 2021) (ver anexos 11-12) y aunque en Santa Cruz Ex Hacienda se observó un comportamiento similar a 2020 (WorldWeatherOnline, 2021) (ver anexo 13), se registraron temperaturas por arriba de 40 °C y una disminución por debajo del 25 % de los niveles de humedad relativa (ver anexo 14); en consecuencia la apertura precoz de la infrutescencia pudo estar influenciada por condiciones ambientales como temperatura y humedad relativa del medio.

Los granos de polen monoporados y elipsoidales presentes en palma jipi fueron típicos en Cyclanthaceae, mientras que su liberación independiente y aperturación total hasta el momento de ser funcional, fue similar a lo que ocurre en la mayoría de los Pandanales (Furness & Rudall, 2006; Johri et al., 1992). Por su parte, las dimensiones caracterizadas en este estudio (22.22-31.88 x 14.44-18.84 µm), oscilaron entre el rango de aquellas reportadas por Furness & Rudall (2006) y Harling et al. (1998) para granos de polen de C. palmata en Centro (28-31 × 17-21 µm) y Sudamérica (13-42 x 8-24 µm) respectivamente. Adicionalmente, nuestros resultados respecto al número de células totales en el estado maduro (2) concuerdan a lo reportado por Johri et al. (1992). Asimismo, el grano de polen presentó porcentajes de germinación muy bajos ( $7.43 \pm 0.50$ %) pero ligeramente mayores a los encontrados en el género Agave (A. angustifolia 3%, A. fourcroydes 0.5%) (Piven et al., 2001) y totalmente diferentes a los reportados en algunos ecotipos de Cocos nucifera L (EMA 40.3%, enano verde de Brasil 66.87%, gigante de Brasil Praia do Forte 89.54%) (Feitosa-Moura et al., 2015; Paredes, 2004) (ver anexo 15). El microgametofito maduro emitió autofluorescencia entre el rango de 358-520 nm, por lo que de acuerdo con García-Plazaola et al. (2015), en C. palmata, la exina probablemente contenga moléculas fluorescentes como flavina, fenoles (azul/verde), antocianinas (verde), pero no carotenoides, azulenos, antocianinas (amarillo/naranja), al respecto Castro et al. (2010) señalan que los niveles de autofluorescencia cambian durante la ontogenia y envejecimiento del microgametofito, probablemente por ello en nuestro estudio, los granos de polen germinados demostraron tener menor respuesta a la excitación en las longitudes de onda de los láser DAPI y Alexa 488 (ZEISS) en comparación con aquellos granos no germinados. Por su parte el desarrollo prematuro de tubos polínicos in situ, ha sido reportado principalmente en eudicotilédoneas con flores cleistógamas como especies del género Vicia L. (Fabaceae) (Mann et al., 2021); pero la baja calidad del polen en palma jipi (monocotiledónea) podría estar influenciado por su capacidad de tolerancia a la desecación (Pacini & Dolferus, 2019; Franchi et al., 2011), así como por su exposición frente a una variedad de estrés abiótico, como fluctuaciones de temperatura (Bheemanahalli et al., 2019), humedad (Pacini, 2012), a la dinámica de calcio en la planta (Hua Zheng et al., 2019) o como consecuencia de microesporogénesis en anteras infértiles producto de cambios citológicos derivados de algún grado de depresión endogámica, como se ha reportado en Pitcairnia encholirioides L. B. Sm. (Bromeliaceae) (Mendes et al., 2016; Losdat et al., 2014).

Similarmente, la morfología del óvulo encontrada en *C. palmata* fue característica de Cyclanthaceae (Johri *et al.*, 1992; Harling, 1958). La presencia de una nucela orientada hacia la

región exostomal ocurre también en gramíneas (Zhao et al., 2017). Las dimensiones del saco embrionario maduro previo la doble fecundación (504.04 x 232.08 µm) fueron aproximadamente el doble de las reportadas para A. tequilana (247 × 106 µm), pero ambas concordaron en que son más anchas en el polo chalazal que en el polo opuesto (González-Gutiérrez et al., 2014). El número de núcleos (8) y tipos celulares (4) presentes en el saco embrionario de palma jipi coincidió con lo reportado para otras especies del género Agave como A, fourcrovdes Lem. (Piven et al., 2001) y A. tequilana (Escobar-Guzmán et al., 2008). Sin embargo, en C. palmata la ovocélula y las dos sinérgidas se encontraron orientadas hacia el polo chalazal y no hacia el exostomal. Asimismo, la posición de los núcleos polares en C. palmata difirió de A. fourcroydes (Piven et al., 2001) y en contraposición con lo reportado para A. tequilana; en C. palmata no se observó la fusión de los dos núcleos polares (cariogamia) para formar el núcleo de la célula central previo o durante el proceso de doble fecundación; sin embargo en ambas especies, las tres antípodas se degeneraron completamente (González-Gutiérrez et al., 2014). En cuanto a la funcionalidad de los tipos celulares constituyentes del saco embrionario, el óvulo y la célula central fueron las células reproductivas que participaron en el proceso de doble fertilización; mientras que, las sinérgidas y las antípodas fueron células accesorias, las primeras jugaron un papel esencial ya que Berger et al. (2008) han reportado que son las responsables de conducir, recibir al tubo polínico y quiar a los gametos masculinos hacia la ovocélula, por su parte la funciones posibles propuestas para las antípodas incluyen nutrición, secreción, almacenamiento y la realización de funciones nutricionales para la semilla en etapas tempranas de desarrollo (Brzezicka & Kozieradzka-Kiszkurno, 2019). Cabe destacar, que con base al índice de Cruden (1977) que relaciona tanto el número de óvulos como de granos de polen producidos en una flor, C. palmata tendió a presentar un sistema reproductivo xenógamo facultativo (P/O = 231.45), y debido a que la especie se ha propagado principalmente vía vegetativa, se esperaría que, en estudios de variabilidad genética, los individuos producto de reproducción sexual presenten baja variabilidad genética.

Ahora bien, el cigoto de palma jipi, no presentó un alargamiento ni aumento del tamaño celular respecto a la ovocélula, lo que concuerda con lo reportado por Zhao *et al.* (2017) para gramíneas (monocotiledóneas). Por otro lado, la primera división del cigoto fue asimétrica en el plano transversal, característica común en monocotiledóneas (Dresselhaus & Jürgens, 2021). Mientras que, semejante a lo encontrado en *Euterpe oleraceae* Mart. (Arecaceae), la célula basal pasó por una división en el plano longitudinal, que originó un proembrión de tres células (Ferreira *et al.*, 2021). Las etapas de desarrollo consideradas en este trabajo fueron tomadas a partir del

trabajo de Juárez-Escobar et al. (2021) ya que, para monocotiledóneas, esta información es muy escasa, sobre todo debido a que las principales limitaciones para la investigación de la embriogénesis cigótica son: el desarrollo asincrónico de las semillas y la cantidad limitada de material biológico disponible para compilar perfiles detallados del proceso en desarrollo. Aunque el embrión maduro difiere morfológica y estructuralmente según la especie, hay caracteres que pueden ser común entre géneros, familias o clados taxonómicos (Ferreira et al., 2021), en palma jipi se encontró un embrión pequeño, lineal, con eje radicular e hipocótilo corto, con una diferenciación de SAM y RAM, aspectos que coinciden con algunas especies de Arecaceae (monocotiledóneas) como Euterpe edulis Mart. (Arecaceae) (Panza et al., 2004). La presencia de procambium en regiones específicas en el embrión de C. palmata, podría deberse a que la especie requiere un proceso de post-maduración o en dado caso, podría ser necesaria durante los eventos post germinativos (Silva et al., 2014). Así mismo, el nivel de diferenciación de la protodermis y el procambium es común en otras monocotiledóneas, entre las que nuevamente destacan las Arecaceae como Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Ferreira-Moura et al., 2010) y E. edulis (Panza et al., 2004). El comportamiento del endospermo helobial durante las primeras etapas de su desarrollo, descrito en este estudio, concordó con lo reportado por Johri et al. (1992) para Cyclanthaceae; mientras que la celularización centrípeda fue similar a lo reportado para Pitcairnia encholirioides (Mendes et al., 2018); pero este tipo de endospermogénesis contrastó con los análisis de parsimonia realizados por Holloway & Friedman (2008), autores que posicionaron a Pandanales dentro de endospermo tipo nuclear.

Domínguez y Cejudo (2014) señalaron que, durante el desarrollo de las semillas, los tejidos maternos, entre los que se incluye la nucela y sus proyecciones pueden sufrir una muerte celular programada, lo que permite la removilización de su contenido celular para nutrir nuevos tejidos como el embrión y el endospermo; sin embargo, sus residuos pueden tender a formar cutículas. El transporte de nutrientes en *C. palmata*, similar a lo que ocurre en trigo y cebada, se observó a lo largo de toda la semilla a través de una única banda vascular y su distribución hacia la cavidad del endospermo fue aparentemente a través de los perispermas posicionados en el área exostomal y endostomal (Kladnik *et al.* 2014). En las semillas, la cutícula puede tener una función protectora, porque puede impedir la pérdida de agua por transpiración, restringir el intercambio gaseoso, por lo que posiblemente en *C. palmata* esta estructura actuó como un bloqueo en la cubierta de la semilla, que impidió la elongación de la radícula y, por lo tanto, influyó en el éxito y/o la velocidad de germinación en palma jipi (Baskin y Baskin, 2004).

Similarmente a lo reportado por Becraft y Gutierrez-Marcos (2012) para cereales, la acumulación de compuestos de reserva en C. palmata inició cuando el endospermo nuclear no estaba completamente celularizado, marcando el inicio de la maduración de la semilla. Las células parenquimáticas en el endospermo acumularon polisacáridos, lípidos y proteínas. Aunque para palma jipi se desconoce el tipo específico de macromoléculas de almacenamiento, Harling et al. (1998) han reportado que el principal carbohidrato de reserva en Cvclanthaceae es el almidón. mientras que la principal clase de compuestos hidrofóbicos almacenados en cuerpos lipídicos en las semillas, incluyendo las Arecaceae (Panza et al., 2004) son los triacilgliceroles (Iglesias-Fernández & Vicente-Carbajosa, 2022); por su parte, en cereales se han caracterizado diversas proteínas de almacenamiento (SSP) de dos tipos: abundantes en embriogénesis media y embriogénesis tardía (LEA) (Khan et al., 2019). Funcionalmente, los polisacáridos de la pared celular del endospermo sirven como reservas de almacenamiento para procesos post germinativos (Hiane et al., 2005); los lípidos al formar parte de las membranas celulares desempeñan numerosas e importantes funciones energéticas (Ferreira & Borguetti, 2004); en cambio las proteínas actúan como fuente de esqueletos de nitrógeno (N), carbono (C) y azufre (S) para el embrión en desarrollo (Khan et al., 2019). Tanto la reserva de lípidos como proteínas son consumidas en las etapas iniciales de germinación.

Como se ha analizado en A. fourcroydes (Piven et al., 2001), los sacos embrionarios vacíos encontrados en palma jipi, pudieron ser producto de fallas en los procesos meióticos durante la megagametogénesis. El porcentaje encontrado en C. palmata (10%) fue mayor al encontrado en A. tequilana (2-5%) (Escobar-Guzmán et al., 2008); sin embargo, en A. americana no se detectó presencia de este tipo de anomalía (Escobar-Guzmán et al., 2008). La identificación morfológica de semillas abortadas a los 30 DDA contribuye en los porcentajes de aborto masivo de las semillas reportados en la especie por Bacab-Caamal (2020). En C. palmata, el aborto pudo ocurrir debido a diversas causas, entre las más probables se encuentran: (i) aborto selectivo de la descendencia de baja calidad o cierto grado de autoincompatibilidad (Meyer et al., 2014), (ii) producción excedente de óvulos como mecanismo utilizado por la planta para maximizar las probabilidades de fecundación exitosa (Melser & Klinkhamer, 2001) o (iii) incapacidad de la planta para proporcionar nutrientes y recursos necesarios para el desarrollo completo de sus unidades reproductivas, en respuesta a factores de estrés como las condiciones climáticas, ausencia/presencia de agua, tipo de suelo, entre otras (Ruan et al., 2012; Bawa & Hedge, 1989). A su vez, el tipo identificado de semillas abortadas vacías pudo ser producto de los errores en el desarrollo del megagametofito o después de la fertilización, como se han encontrado en A. tequilana y A. americana (Escobar-Guzmán et al., 2008). Al respecto, la ausencia de la doble fecundación en el 30% de los sacos embrionarios analizados pudo además deberse a diversos factores como la falta de especies polinizadoras adecuadas, errores durante la fertilización, como células subdesarrolladas (Escobar-Guzmán *et al.*, 2008) e inclusive, una explicación alternativa podría ser el efecto de la endogamia, donde los alelos recesivos podrían tener efectos nocivos que conduzcan al aborto espontáneo después de la fertilización (Escobar-Guzmán *et al.*, 2008). Asimismo, la baja calidad del polen también pudo haber conducido a una reducción adicional en el éxito de la fertilización de los óvulos (Losdat *et al.*, 2014).

La presencia de rafidios en tegumentos de la semilla, ha sido reportado previamente por Harling, (1958) para Cyclanthaceae y por Smith & Stockey (2003) para Araceae. Tanto su presencia como morfología, son específicas de la especie y del telido, en consecuencia esta característica puede utilizarse como un carácter taxonómico (Raman et al., 2014). Su composición química es oxalato de calcio, lo que concuerda con lo reportado para la mayoría de angiospermas (Franceschi & Nakata, 2005). La formación de estos cristales por procesos de biomineralización en C. palmata podrían tener funciones diversas, incluyendo la regulación del calcio (Ca<sup>2+</sup>), la protección contra herbívoros, procesos de desintoxicación (por ejemplo de metales pesados o ácido oxálico), equilibrio iónico o actuar como soporte de tejido (Franceschi & Nakata, 2005). El número de idioblastos que contienen rafidios y que están presentes en la semilla de C. palmata al momento de su maduración, podría estar determinado inclusive por procesos de estrés abiótico, como la concentración de calcio (Ca) en el suelo o agua (Jáuregui Zúñiga & Moreno Cárcamo, 2004). Al respecto, en la zona de estudio de palma jipi (Santa Cruz Ex Hacienda) se ha clasificado al agua subterránea como cálcico bicarbonatada o muy dura, con valores arriba de 500 ppm (INEGI, 2016; CONAGUA 2006) y con un tipo de suelo leptosol-luvisol (Ortega-Haas, 2016). Por otro lado, se ha reportado la presencia de proteínas como la calreticulina en el compartimiento de membranas sintetizadas de novo que da forma y ayuda al empaquetamiento de los cristales dentro de los idioblastos, por lo que es muy probable que, por eso la doble tinción histológica PAS-ANN aplicada a este tipo celular hava dado positivo tanto para polisacáridos y proteínas en la periferia de los rafidios (Raman et al., 2014; Franceschi & Nakata, 2005). Por otra parte, la composición química de estos cristales se modifica únicamente ante la exposición de ácidos fuertes como HCl, o como se determinó en este estudio, frente  $H_2SO_4$  (Macnish *et al.*, 2003).

Por último, se descarta la presencia de latencia física en las semillas debido a la permeabilidad de la cubierta, que es visible 24 horas después del embebimiento de la misma (Bacab-Caamal, 2020); pero no se descarta la latencia morfológica a pesar de que en la caracterización del

embrión, se encontró que el sistema meristemático fundamental estaba bien diferenciado (SAM y RAM); sin embargo de acuerdo con lo propuesto por Finch-Savage y Leubner-Metger (2006), el embrión axial lineal en monocotiledóneas, pudiese presentar latencia fisiológica. Con base al análisis realizado en este estudio, la presencia de idioblastos con altos contenidos de oxalato de calcio distribuidos en la periferia de la semilla, podrían formar parte de una barrera que impida la protrusión de la radícula; como consecuencia de ello, los rafidios y también la presencia de la cutícula podrían estar causando una latencia fisiológica en las semillas maduras de *C. palmata* (Guerrero, 2015; Finkelstein *et al.*, 2008; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Baskin & Baskin, 2004; C. Baskin & Baskin, 1998); al respecto estos mismos autores mencionan que entre los tratamientos para vencer este tipo de latencia para lesionar los tegumentos, se encuentran la escarificación física (agua caliente), mecánica (papel lija) o química (ácidos) en la región cercana a la radícula.

# **CAPÍTULO V**

# 5.1. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1.1. CONCLUSIONES GENERALES

Con base en los resultados obtenidos y analizados sobre los diferentes estudios anatómicos, morfológicos, estructurales e histoquímicos de los tejidos y procesos de diferenciación que conducen a la formación, maduración y germinación de las semillas de *Carludovica palmata*, la hipótesis quedó demostrada y los objetivos específicos propuestos al inicio de este trabajo fueron cumplidos en su totalidad; por tanto, se concluye que en *C. palmata*:

- El microgametofito maduro es monoporado, prolado, bicelular (los gametos masculinos se diferencian poco después del inicio de la elongación del tubo polínico), pero presenta baja vialidad (<10%) y germinación precoz (≈5%). Mientras que, el megagametofito maduro se ubica dentro de cada óvulo anátropo, bitégmico, crasinucelado, con micrópilo en zig-zag y consta de ocho núcleos, siete células y cuatro tipos celulares: (1) una ovocélula que cambia su morfología, (2) dos sinérgidas que se degeneran, (3) tres antípodas que se degeneran y (4) una célula central con dos núcleos polares que se desplaza previo la doble fecundación.</li>
- La fecundación de la ovocélula y de la célula central es asincrónica, pero ambos ocurren a partir del 9 DDA. La embriogénesis cigótica se agrupo en tres categorías: (1) ontogenia que incluye desde la formación del cigoto (plasmogamia-cariogamia) al proembrión multicelular, (2) el patrón y crecimiento, que inicia con la formación del embrión en etapa globular hasta la etapa L3 y (3) la maduración, a partir de 70 DDA, e incluye cuatro subetapas L4, L5, L6 y L7. El embrión maduro es de tipo axial lineal, compuesto por un gran cotiledón, mientras que el SAM está integrado por dos primordios foliares; y el RAM se encuentra protegido por una cofia. La endospermogénesis es de tipo helobial con celularización centrípeda.
- El desarrollo de la semilla dura 90 días e incluye cambios morfológicos, anatómicos (formación de tejido nuevo y muerte celular programada) e histoquímicos (presencia y distribución de polisacáridos, lípidos y proteínas). Este periodo se divide en dos procesos:
   (1) los primeros 59 días son de morfogénesis y (1) a partir de los 60 días de desarrollo inicia la maduración, con la acumulación de compuestos de reserva en el endospermo.
- Tres son los factores identificados y que influyen en la producción de semillas maduras: (1) anomalías en el saco embrionario maduro (vacío, con células subdesarrolladas o en sitios

no convencionales), (2) ausencia de fecundación y (3) abortos (semillas vacías o con embrión y/o endospermo subdesarrollado), mientras que dos factores adicionales tienen relación con los problemas de viabilidad en la especie: (1) formación de cutícula y (2) presencia de idioblastos y rafidios de oxalato de calcio.

 La semilla de 100-104 DDA presenta latencia fisiológica que se rompe mediante escarificación química con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% por 10 minutos; sin embargo, no se descarta la presencia de latencia morfológica o combinada.

#### 5.1.2. PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas propuestas para mejorar y dar continuidad a este trabajo, se encuentran:

- 1- Determinar si la semilla de *C. palmata* es tolerante a la desecación o no, mediante la determinación del contenido de humedad, secado y pruebas de viabilidad secuenciadas.
- 2- Realizar los experimentos de polinización controlada y no controlada, que se tenían previstos, para determinar si esta planta es autoincompatible o no.
- 3- Clarificar etapas tempranas del desarrollo del megagametofito para identificar el tipo de saco embrionario presente, y similarmente realizar lo mismo con el microgametofito.
- 4- Caracterizar las mutaciones presentes en los microgrametofitos maduros, similar a lo que se hizo en este estudio en el megagametofito, para analizar su relación con la calidad del polen.
- 5- Mediante la técnica de EDX o por refracción de rayos X, verificar la composición química de los rafidios.
- 6- Corroborar las etapas de embriogénesis cigótica, mediante la recolección de material fresco y la correcta fijación utilizando vacío, para lograr cortes ultrafinos, así como buscar la integridad de las capas seminales (incluyendo los rafidios e idioblastos).
- 7- Realizar histología en semillas de 10, 11...20 DDA, para poder clasificar adecuadamente el tipo de embriogénesis cigótica presente en *C. palmata*.
- Realizar análisis similares a los establecidos en este trabajo, pero con semillas provenientes de poblaciones silvestres de *C. palmata* (Centro y Sudamérica)

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Ali, F., Qanmber, G., Li, F., & Wang, Z. (2022). Updated role of ABA in seed maturation, dormancy, and germination. *Journal of Advanced Research*, 35, 199-214. https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.03.011.
- Alpert, P. (2005). The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology*, *45*, 685–695.
- Apple, M. (2021). Mapa de Santa Cruz Ex- Hacienda. Mapa de Santa Cruz Ex Hacienda; Satellites.pro. <u>https://satellites.pro/Mexico\_map#20.396171,-90.237520,18</u> [Acceso 09 mayo 2021].
- Arancibia, E. & López, F. (2004). Jipi japa fibre, handicrafts: Bolivian case, en: Riches of the forest: fruits, remedies and handicrafts in Latin America, López, F. y Shanley, P. (Eds.).
   Center for International Forestry Research (CIFOR), Desa Putra, Indonesia, pp. 41-44.
- Armenta-Medina, A., Gillmor, C. S., Gao, P., Mora-Macias, J., Kochian, L. V., Xiang, D., & Datla, R. (2021). Developmental and genomic architecture of plant embryogenesis: from model plant to crops. *Plant Communications*, 2(1), 100-136. https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100136.
- Bacab-Caamal, D. (2020). Análisis de la fase reproductiva de palma jipi *(Carludovica palmata Ruiz & Pavón)* en plantas cultivadas en el norte del estado de Campeche. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el Estado de Campeche. pp. 20-50.
- Barbedo, C. J., Centeno, D. da C., & Ribeiro, R. de C. . (2013). Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea*, *40*(4), 583–593. <u>https://doi.org/10.1590/s2236-89062013000400001</u>.
- Baroux, C., & Grossniklaus, U. (2019). Seeds—an evolutionary innovation underlying reproductive success in flowering plants. *Current Topics in Developmental Biology*, 131, 605–642. <u>https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.11.017</u>.
- Barret, S. (2015). Influences of clonality on plan sexual reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 8859-8866. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1501712112.</u>

Baskin, C., & Baskin, J. (1998). Seeds - ecology, biogeography, and evolution of dormancy and

germination. Academic Press. pp.27-42.

- Baskin, J., & Baskin, C. (2004). A classification system for seed dormancy. Seed Science Research, 14, 1–16.
- Bawa, K. S., & Hedge, S. (1989). Embryo and seed abortion in plants. Nature, 342(6250), 625.
- Becraft, P. W., & Gutierrez-Marcos, J. (2012). Endosperm development: dynamic processes and cellular innovations underlying sibling altruism. WIREs Developmental Biology, 1, 579– 593. <u>https://doi.org/10.1002/wdev.31</u>.
- Bennet, B., Alarcon, R., & Cerón, C. (1992). The ethnobotany of *Carludovica palmata* Ruiz & Pavon (Cyclanthaceae) in Amazonian Ecuador. *Economic Botany*, *46*(3), 233–240.
- Berger, F., Grini, P. E., & Schnittger, A. (2006). Endosperm: an integrator of seed growth and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(6), 664–670. <u>https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.09.015</u>.
- Berger, F., Hamamura, Y., Ingouff, M., & Higashiyama, T. (2008). Double fertilization caught in the act. *Trends in Plant Science*, *13*(8), 437–443. <u>https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.05.011</u>.
- Bewley, J., Bradford, K., Hilhorst, H., & Nonogaki, H. (2013). Seeds: Physiology od Development, Germination and Dormancy, third Edition. New York, USA, Springer, pp.5-7.
- Bheemanahalli, R., Sunoj, V. S. J., Saripalli, G., Prasad, P. V. V., Balyan, H. S., Gupta, P. K., Grant, N., Gill, K. S., Jagadish, S. V. K., Bheemanahalli, R., Sunoj, V. S. J., Saripalli, G., & Prasad, P. V. V. (2019). Quantifying the Impact of Heat Stress on Pollen Germination ,Seed Set, and Grain Filling in Spring Wheat. *Crop Science*, *13*, 1–13. https://doi.org/10.2135/cropsci2018.05.0292.
- Biancucci, M., Mattioli, R., Forlani, G., Funck, D., Costantino, P., & Trovato, M. (2015). Role of proline and GABA in sexual reproduction of angiosperms. *Frontiers in Plant Science*, 6, 680–691. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00680</u>.
- Bisby, F., Roskov, Y., Orrell, T., Nicolson, D., Paglinawan, L., Bailly, N., Kirk, P., Bourgoin, T., & Baillargeon, G. (2010). Species 2000 & ITIS catalogue of live: 2010 annual checklist. Species 2000. <u>http://www.catalogueoflife.org/annual-</u>

checklist/2010/browse/tree/id/2248380 [Acceso 09 mayo 2021].

- Bleckmann, A., Alter, S., & Dresselhaus, T. (2014). The beginning of a seed: regulatory mechanisms of double fertilization. *Frontier in Plant Science*, *5*(452), 1–12. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00452.
- Brzezicka, E., & Kozieradzka-Kiszkurno, M. (2019). Female gametophyte development in Sedum sediforme (Jacq.) Pau (Crassulaceae) an anatomical, cytochemical and ultrastructural analysis. Protoplasma, 256, 537–553.
- CABI (2022). Invasive Species Compendium: *Carludovica palmata* (Panama hat plant). Wallingford, UK: CAB International. <u>www.cabi.org/isc.</u> [Acceso 06 noviembre 2022].
- Cadot, Y., Miñana-Castello, M., & Chevalier, M. (2006). Anatomical, histological and histochemical changes in grape sedes from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during fruit development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9206-9215. <u>https://doi.org/10.1021/jf061326f</u>.
- Castro, A. J., Rejon, J. D., Fendri, M., Jimenez-Quesada, M. J., Zafra, A., Jimenez-Lopez, J. C., Rodriguez-Garcia, M. I., & Alche, J. D. (2010). Taxonomical discrimination of pollen grains by using confocal laser scanning microscopy (CLSM) imaging of autofluorescence. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, 607– 613.
- Catusse, J., Job, C., & Job, D. (2012). Proteomics reveals a potential role of the perisperm in starch remobilization during sugarbeet seed germination, en: Seed Development: OMICS Technologies toward Improvement of Seed Quality and Crop Yield: OMICS in Seed Biology, G. K. Agrawal & R. Rakwal (Eds.). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4749-4\_2, pp. 27–41.
- Chan-Poot, S. (2019). Propagación *in vitro* de palma jipi *(Carludovica palmata* Ruiz & Pavón). Informe de Residencia Profesional. Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el Estado de Campeche., México. <u>pp.</u>
- Chase, M. W., Christenhusz, M. J. M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., Mabberley, D. J., Sennikov, A. N., Soltis, P. S., Stevens, P. F., Briggs, B., Brockington, S., Chautems, A., Clark, J. C., Conran, J., Haston, E., Möller, M., Moore, M., Olmstead,

R., & Weber, A. (2009). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *161*(1), 105–121. <u>https://doi.org/10.1111/boj.12385</u>.

- Chase, M. W., Christenhusz, M. J. M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., Mabberley, D. J., Sennikov, A. N., Soltis, P. S., Stevens, P. F., Briggs, B., Brockington, S., Chautems, A., Clark, J. C., Conran, J., Haston, E., Möller, M., Moore, M., Olmstead, R., & Weber, A. (2016). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *181*(1), 1–20. https://doi.org/10.1111/boj.12385.
- Chettoor, A., Phillips, A., Coker, C., Dilkes, B., & Evans, M. Maternal gametophyte effects on seed development in maize. *Genetics*, 204(1), 233-248. <u>https://doi.org/10.1534/genetics.116.191775</u>
- Chi Chi, L. (n.d.). Diversidad genética en *Carludovica palmata* Ruíz & Pavón en Campeche, *México*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México.
- Coen, O., & Magnani, E. (2018). Seed coat thickness in the evolution of angiosperms. *Cellular* and Molecular Life Sciences, 75(14), 2509–2518. <u>https://doi.org/10.1007/s00018-018-2816-x</u>
- CONAGUA. (2006). Programa Hidráulico Regional 2002-2006, Península de Yucatán, Región XII. SEMARNAT-CNA, pp. 23-31.
- CONAGUA. (2021). Pronóstico metereológico por mes del estado de Campeche. Pronóstico Meteorológico General. <u>https://smn.conagua.gob.mx/es/pronosticos/pronosticossubmenu/pronostico-</u> <u>meteorologico-general</u> [Acceso 23 mayo 2021].
- Cordova, I., Oropeza, C., Almeyda, H., & Harrison, N. (2000). First report of a phytoplasmaassociated leaf yellowing syndrome of palma jipi plants in southern México. *Plant Disease*, *84*(7), 807–807.
- Cortes, V., Gómez, D., & Nuñez-Avellaneda, L. (2018). Relación de visitantes florales con las fases florales de *Carludovica palmata* (Ruiz & Pav 1798) (Cyclanthaceae) en un bosque

seco tropical en Colombia. Entomología Mexicana, 4, 315-321.

- Croat, T. (1978). Flora of Barro Colorado Island. Stanford, Stanford University Press.
- Cronquist, A. (1988). *The Evolution and classification of flowering plants* (Second edición). New York Botanical Garden Press, New York, USA, pp. 515.
- Cruden, R. (1977). Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 32-46. <u>https://doi.org/10.2307/2407542</u>
- Dahlgreen, R., Clifford, T., & Yeo, P. (2012). The Families of the monocotyledons: structure, evolution, and taxonomy. Berling, Springer Berlin Heidelberg, pp. 463.
- De la Cuadra, C. (2008). Germinación, latencia y dormición de las semillas. *Hojas Divulgadoras*, *3*(92), 2–20.
- Dante, R., Larkins, B., & Sabelli, P. (2014). Cell cycle control and seed development. *Frontiers in Plant Science*, 5(493), 1-14. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00493</u>
- Deng, Y., Feng, Z., Yuan, F., Guo, J., Suo, S., & Wang, B. (2015). Identification and functional analysis of the autofluorescent aubstance in Limonium bicolor salt glands. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97, 20–27. <u>https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.09.007</u>.
- Devic, M., & Roscoe, T. (2016). Seed maturation: Simplification of control networks in plants. *Plant Science*, 252, 335-446. <u>https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.08.012</u>
- Domínguez, F., & Cejudo, F. J. (2014). Programmed cell death (PCD): an essential process of cereal seed development and germination. *Frontiers in Plant Science*, *5*(366), 1–11. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00366.
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, *31*(1), 74–85.
- Dorval, J., & de Araujo, J. (2021). Embryo and endospem development in *Billbergia nutants* H. Wendl. Ex Regel (Bromelioideae-Bromeliaceae) and its implications for the embryonomy of Bromeliaceae. *Flora*, 281, 151867. <u>https://doi.org/10.1016/j.flora.2021.151867</u>
- Doll, N., & Ingram, G. (2022). Embryo-Endosperm Interactions. *Annual Reveiew of Plant Biology*, 73, 293-321. <u>https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-091838</u>

- Dresselhaus, T., & Jürgens, G. (2021). Comparative embryogenesis in angiosperms : activation and patterning of embryonic cell lineages. *Annual Review of Plant Biology*, *72*, 641–676.
- Drews, G., & Koltunow, A. (2011). The female gametophyte. *The Arabidopsis Book/ American* Society of Plant Biologists, 9, 2–24. <u>https://doi.org/10.1199/tab.0155</u>.
- Emeterio-Lara, A., García-Franco, J., Hernández-Apolinar, M., Mora-Herrera, M., Toledo-Hernández, V., Valencia-Díaz, S., & Flores-Palacios, A. (2018). Endogamy costs and reproductive biology of *Laelia autumnalis*, an endemic orchid of Mexico. *Plant Ecology*, 219, 1423–1434.
- Endress, P. K. (2011). Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms. *American Journal of Botany*, *98*(3), 370–396. <u>https://doi.org/10.3732/ajb.1000299</u>.
- Erdtman, G. (1952). Pollen morphology and plant taxonomy. Stockholm, Sweden, Hafner Publishing Company, pp. 65-81.
- Eriksson, R. (1994). Systematics of the Cyclanthaceae, especially *Sphaeradenia* and *Chorigyne*. Tesis de Doctorado. University of Goteborg, Suecia. pp. 60-63.
- Escobar-Guzmán, R. E., Hernández, F. Z., Vega, K. G., & Simpson, J. (2008). Seed production and gametophyte formation in *Agave tequilana* and *Agave americana*. *Botany*, *86*(11), 1343–1353. <u>https://doi.org/10.1139/B08-099</u>.
- Fadiman, M. (2001). Hat weaving with jipi, *Carludovica palmata* (Cyclanthaceae) in the Yucatan Peninsula, Mexico. *The New York Botanical Garden Press*, *55*(4), 539-544.
- Fang, S., Wang, J., Wei, Z., & Zhu, Z. (2006). Methods to break seed dormancy in *Cyclocarya paliurus* (Batal)Iljinskaja. *Scientia Horticulturae*, *110*(3), 305–309. <u>https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2006.06.031</u>.
- Feitosa-Moura, C., Aráujo-Machado, C., & Silva-Lédo, A. (2015). *In vitro* germination and viability of pollen grain of coconut accessions. *Revista Ciência Agronômica, 46*(2), 421–427.
- Fernandes Cardoso, J., Lacerda Viana, M., Matias, R., Furtado, M., de Souza Caetano, A. P., Consolaro, H., & Garcia de Brito, V. (2018). Towards a unified terminology for angiosperm reproductive systems. *Acta Botanica Brasilica*, 32(3), 329–348. <u>https://doi.org/10.1590/0102-33062018abb0124</u>.

Ferreira, A., Borguetti, F. (2004). Seed germination. Artmed, Porto Alegre, RS, Brazil.

- Ferreira-Moura, E., Contin-Ventrella, M. & Motoike-Yoshimitsu, S. (2010). Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Scientia Agricola*, 67, 339-407. <u>https://doi.org/10.1590/S0103-90162010000400004</u>
- Figueiredo, D., Batista, R., Roszak, P., & Henning, L., K. (2016). Auxin production in the endosperm drives seed coat development in *Arabidopsis*. *Elife*, 5, 20542. https://doi.org/10.7554/eLife.20542
- Finch-Savage, W., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, *171*, 501–523.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariisumi, T., & Steber, G. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plants Biology*, *59*, 387–415.
- Franceschi, V., & Nakata, P. (2005). Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology*, *56*(1), 41–71. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106.
- Franchi, G., Piotto, B., Nepi, M., Baskin, C., Baskin, J., & Pacini, E. (2011). Pollen and seed dessication tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal and survival. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5267–5281.
- Franz, N. (1999). Biología reproductiva de algunas ciclantáceas (Cyclanthaceae) y de los picudos asociados (coleopeta: curculionidae). Tesis de Maestría. Universidad de Costa Rica. pp.53-64.
- Franz, N. (2004). Analyzing the history of the derelomine flower weevil-Carludovica association (Coleoptera: Curculionidae; Cyclanthaceae). Biological Journal of the Linnean Society, 81, 483–517.
- French, J., Clancy, K., & Tomlinson, P. (1983). Vascular patterns in stems of the Cyclanthaceae. *American Journal of Botany*, *79*, 1383–1400.

Furness, C. A., & Rudall, P. J. (2006). Comparative structure and development of pollen and

tapetum in Pandanales. International Journal of Plant Sciences, 167(2), 331-348.

- García-Barriga, H. (1975). Flora medicinal de Colombia, vol 2. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Bogotá, Bogotá, Colombia.
- García-Plazaola, J. I., Fernández-Marín, B., Duke, S. O., Hernández, A., López-Arbeloa, F., & Becerril, J. M. (2015). Autofluorescence: Biological functions and technical applications.
   *Plant Science*, 236, 136–145. <u>https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.03.010</u>.
- Germanà, M. A., & Walker, J. M. (2016). Somatic versus zigotic embryogenesis: learning from seeds, en *In vitro embryogenesis in Higher Plants*, M. A. Germaná & M. Lambardi (Eds.). Springer International Publishing, pp.25-46.
- Gniech Karasawa, M., Carnier Dornelas, M., & Guerra de Araújo, C. (2015). Biology and genetics of reproductive systems. En *Reproductive Diversity of Plants*, M. Gniech Karasawa & L. de Queiroz (Eds.). Springer International Publishing, pp. 41-84.
- González-Gutiérrez, A. G., Gutiérrez-Mora, A., & Rodríguez-Garay, B. (2014). Embryo sac formation and early embryo development in *Agave tequilana* (Asparagaceae). *SpringerPlus*, *3*(575), 1–11. <u>http://www.springerplus.com/content/3/1/575</u>.
- Google, M. (2021). *Mapa Santa Cruz Ex Hacienda, Campeche*. Mapa de Santa Cruz Ex Hacienda. <u>https://www.google.com.mx/maps/@20.3941379,-</u> <u>90.2369009,355a,35y,39.4t/data=!3m1!1e3</u> [Acceso 09 mayo 2021].
- Gotssberger, G. (1990). Flowers and beetles in the South American tropics. *Botanica Acta*, *103*(4), 360–365.
- Gottsberger, G. (1991). Pollination of some species of the Carludovicoideae, and remarks on the origin and evolution of the Cyclanthaceae. *Botanische Jahrbücher Fur Systematik*, *113*, 221–235.
- Guerrero, R. (2015). Niveles de Dormancia en Semillas de Chile Silvestre de Diferentes
   Ecorregiones y Desarrollo de Protocolos para la Germinación y Regeneración de
   Accesiones. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Aguascalientes., México. pp. 46.

Guo, A., y Zheng, C. X. (2013). Female gametophyte development. Journal Plant Biology, 56,

345–356. <u>https://doi.org/10.1007/s12374-013-0131-5</u>.

- Hafidh, S., Fíla, J., & Honys, D. (2016). Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. *Plant Reproduction*, 29, 31–51. https://doi.org/10.1007/s00497-015-0272-4.
- Hamilton, K., Offord, C., Cuneo, O., & Deseo, M. (2013). A comparative study of seed morphology in relation to desiccation tolerance and other physiological responses in 71 Eastern Australian rainforest species. *Plant Species Biology*, 28, 51–62.
- Hamamura, Y., Nagahara, S., & Higashiyama, T. (2012). Double fertilization on the move. *Current* opinion in plant biology, 15(1), 70-77. <u>https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.11.001</u>
- Han, C., & Yang, P. (2015). Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *Proteomics*, *15*, 1671–1679. <u>https://doi.org/10.1002/pmic.201400375</u>.
- Harling, G. (1958). Monograph of the Cyclanthaceae (Rudolf (Ed.)). Hakan Ohlssons Boktryckeri.
- Harling, G., Wilder, G., & Eriksson, R. (1998). Cyclanthaceae. En *The families and genera of vascular plants,* Kubitzki, K (Ed.). Springer, pp. 202-215.
- Hats, J. (2020). Catálogo jipijapa hats: finos sombreros tejidos a mano. Jipijapa Hats. <u>https://jipijapahats.com/</u> [Acceso 23 mayo 2021].
- Hewitt, A. (2020). Genetic and environmental factors in the trade-off between sexual and asexual reproduction of a rare clonal angiosperm. *Austral Ecology*, *45*, 187–194. <u>https://doi.org/10.1111/aec.12846</u>.
- Hiane, P., Ramos-Filho, M., Ramos, M., & Macedo, M. (2005). Pulp and seed oil of bocaiúva, Acronomia aculeata (Jacq.) Lodd. Characterization and composition of fat acids. Brazilian Journal of Food Technology, 8, 256-259.
- Hilhorst, H. (2011). Standardizing seed dormancy research, en: Seed dormancy. Methods in molecular biology, Kermode, A. (eds). Humana Press, New Jersey, pp.43-52.
- Hisanaga, T., Yamaoka, S., Kawashima, T., Higo, A., Nakajima, K., Araki, T., Kohchi, T. & Berger,
  F. (2019). Building new insights in plant gametogenesis from an evolutionary
  perspective. *Nature Plants*, 5(7), 663–669. <a href="http://doi.org/10.1038/s41477-019-0466-0">http://doi.org/10.1038/s41477-019-0466-0</a>

- Holloway, S. J., & Friedman, W. E. (2008). Embryological features of *Tofieldia glutinosa* and their bearing on the early diversification of monocotyledonous plants. *Annals of Botany*, *102*(2), 167–182. <u>https://doi.org/10.1093/aob/mcn084</u>.
- Honys, D., Renák, D., & Twell, D. (2006). Male gametophyte development and function. En Floriculture, Omamental and Plant Biotechnology (Volumen I), da Silva, T. (Ed.). Global Science Books, pp 76-78.
- Howard,F. (2001). Sap-feeders on Palms, en: Insects on palms, Moore, F., Giblin-Davis, R., Abad, R. (Eds). CABI Publishing, Wallingford, UK. pp.400.
- Hu, Y., Barrett, S. C. H., Zhang, D., & Liao, W. (2015). Experimental analysis of mating patterns in a clonal plant reveals contrasting modes of self-pollination. *Ecology and Evolution*, 5(22), 5423–5431. <u>https://doi.org/10.1002/ece3.1801</u>.
- Hua Zheng, R., De Su, S., Xiao, H., & Qiao Tian, H. (2019). Calcium: A Critical Factor in Pollen Germination and Tube Elongation. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*, 420– 432.
- Huijser, P., & Schmid, M. (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, 4129, 4117–4129. <u>https://doi.org/10.1242/dev.063511</u>.
- Iglesias-Fernández, R.,& Vicente-Carbajosa, J. (2022). A view into seed autophagy: from development to environmental respondes. *Plants*, 11(23), 3247. https://doi.org/10.3390/plants11233247.
- INEGI. (2017). Anuario estadístico y geográfico de Campeche 2017. Gobierno del estado de Campeche.
- Jáuregui Zúñiga, D., & Moreno Cárcamo, A. (2004). La biomineralización del oxalato de calcio en plantas: retos y perspectivas. *REB*, *23*(1), 18–23.
- Jo, L., Pelletier, J., & Harada, J. (2019). Central role of the LEAFY COTYLEON1 transcription factor in seed development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 61(5), 564-580. https://doi.org/10.1111/jipb.12806
- Johri, B., Ambegaokar, K., y Srivastava, P. (1992). Comparative embryology of angiosperms (Vol. 2). Springer-Verlag Heidelberg, Berlin pp. 951-953.

- Juarez-Escobar, J., Bojórquez-Velázquez, E., Elizalde-Contreras, J., Guerrero-Analco, J., Loyola-Vargas, V., Mata-Rosas, M., & Ruiz-MaY, E. (2021). Current proteomic and metabolomic knowledge of zygotic and somatic embryogenesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11807. <u>https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104112</u>
- Khan, Z., Patel, R., Mehrotra, S. & Mehrotra, E. (2019). *In-silico* analysis of seed storage proteín gene promoters reveals differential occurrence of 7 cis-regulatory elements in monocot and 14 in dicot plants. *Gener Reports*, 15, 100520.
- Kicińska-Jakubowska, A., Bogacz, E., & Zimniewska, M. (2012). Review of natural fibers. Part I-Vegetable fibers. *Journal of Natural Fibers*, *9*(3), 150–167.
- Kladnik, A., Chamusco, K., Dermastia, M., Chourey, P. (2004). Evidence of programmed cell death in post-phloem transport cell of the maternal pedicel tissue in developing caryopsis of maize. *Plant Physiology*, 136, 3572-3581. <u>https://doi.org/10.1104/pp.104.045195</u>
- Ku-Gonzalez, A. (2013a). Preparacion de muestras biologicas para el microscopio electronico de barrido. Pp. 2-3
- Ku-Gonzalez, A. (2013b). Protocolo general para el uso del criostato en tejido vegetal. Pp. 4
- Leal, S. (2018). Phylogeny of Cyclanthaceae (the Panama-hat family) based on molecular and morphological data. Tesis de Doctorado. Instituto de Biociencias de la Universidad de Sao Paulo, Brasil. pp. 10-21.
- Lei, S. (2010). Benefits and cost of vegetative and sexual reproduction in perennial plants: a review of literature. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, *42*(1), 9–14.
- Leszczuk, A., Wydrych, J. & Szczuka, E. (2019). The ocurrence of calcium oxalate crystals and distribution of arabinogalactan proteins (AGPs) in ovary cells during *Fragaria x ananassa* (Duch.) development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(3), 1028-1036.
- Lionakis Meyer, D. (2005). Seed development and structure in floral crops, en: Flower Seed Biology and Technology, McDonald, M., Kwong, F. (Eds). CABI Publishing, Londres, Inglaterra, pp 117-144.
- Lin, J., Le, B., Chen, M., Henry, K., Hur, J., Hsieh, T., Chen, P., Pelletier, J., Pellegrini, M., Fischer,

R., Harada, J., & Goldberg, R. (2017). Similarity between soybean and *Arabidopsis* seed methylomes and loss of non-CG methylation does not affect seed development. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* (PNAS), 114(45), 730-739. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1716758114</u>

- Liu, J., Wu, M., & Liu, C. (2022). Cereal endosperms: development and storage product accumulation. *Annual Review of Plant Biology*, 73, 255-291. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070221-024405
- Locascio, A., Roig-Villanova, I., Bernardi, J., Varotto, S. (2014). Current perspectives on the hormonal control of seed development in *Arabidopsis* and maiz: a focus on auxin. *Frontiers in Plant Science*, 5(42), 412-434. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00412</u>
- Losdat, S., Chang, S. M., & Reid, J. M. (2014). Inbreeding depression in male gametic performance. *Journal of Evolutionary Biology*, *27*(6), 992–1011. <u>https://doi.org/10.1111/jeb.12403.</u>
- Ma, H., & Sundaresan, V. (2010). Development of flowering plant gameophytes. *Current topics in developmental biology*, 91, 379-412. <u>https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91013-2</u>
- Macnish, A., Irving, D., Joyce, D., Vithanage, V., Wearing, A., Webb, R. & Frost, R. (2003). Identification of intracellular calcium oxalate crystals in *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany*, 51(5), 565-572.
- Mann, N., Uniyal, P., & Lakhanpaul, S. (2021). Incidence on *In Situ* Pollen Germination in Three Species of *Viola L.* of Uttarakhand. *National Academy Science Letters*, *44*(1), 63–65.
- Manzanero-Acevedo, L. (2005). La artesanía estrategia de vida familiar en la región de Calkiní, Campeche, México.Tesis de Maestría. El Colegio de la Frontera Sur. México. pp. 42-45.
- Martin, A. (1946). The comparative internal morphology of seeds. *American Midland Naturalist*, *36*(3), 513–660.
- Maruyama, D., Higashiyama, T., Endo, T., & Nishikawa, S. (2020). Fertilization-coupled sperm nuclear fusion is required for normal endosper nuclear proliferation. *Plant & Cell Physiology*, 61(1),29-40. <u>https://doi.org/10.1093/pcp/pcz158</u>

Matilla, A. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas, en: Fundamentos de fisiología

*vegetal*, Azcón-Bieto y Talón, M. (Eds). McGraw-Hill Interamericana de España, S.L., pp 537-558.

- Medina-Vidal, A. (2018). De los tejedores de jipijapa de la región de los Petenes frente a la intervención gubernamental en el contexto de la globalización. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social. Ciudad de México. pp. 14-328.
- Melser, C., & Klinkhamer, P. G. (2001). Selective seed abortion increases offspring survival in *Cynoglossum officinale* (Boraginaceae). *American Journal of Botany*, *88*(6), 1033–1040.
- Mendes, S., Duarte-Silva, E., Kaltchuk-Santos, E., Mariath, J., Vieira, R., & Toni, K. (2016). A case of male sterility in the endangered endemic species *Pitcairnia encholirioides* L.B. Sm. (Bromeliaceae) of Brazilian Atlantic Forest Inselbergs. *International Journal of Plant Sciences*, 177(6), 498-510.
- Mendes, S., Vieira, R., & De Toni, K. (2018). Embryo and endosperm development in *Pitcairnia encholirioides* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae): an endangered species of the Atlantic Forest. Flora, 246, 10-18.
- Metcalfe, S. E., Schmook, B., Boyd, D. S., De la Barreda-Bautista, B., Endfield, G. E., Mardero, S., Manzón Che, M., Medina González, R., Munguia Gil, M. T., Navarro Olmedo, S., & Perea, A. (2020). Community perception, adaptation and resilience to extreme weather in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Regional Environmental Change*, *20*(1), 1–15. https://doi.org/10.1007/s10113-020-01586-w.
- Meyer, K. M., Soldaat, L. L., Auge, H., & Thulke, H. H. (2014). Adaptive and selective seed abortion reveals complex conditional decision making in plants. *The American Naturalist*, *183*(3), 376–389.
- Shin Min, J., Yuan L., & Kawashima, T. (2022). Live-cell imaging reveals the cellular dynamics in seed development. *Plant Science*, 325, 111485.
- Moo-Huchin, V., Pérez-Pacheco, E., Ríos-Soberanis, C., Bello-Pérez, L., Cervantes-Uc, J., Dzul-Cervantes, M., & Estrada-León, R. (2019). Extraction and characterization of natural cellulosic fiber from jipijapa extraction and characterization of natural cellulosic fiber from jipijapa (*Carludovica palmata*). *Chiang Mai Journal Science*, *46(3)*, 579–591.

- Moo Chablé, R. (2011). Surgimiento y perspectiva de la sociedad cooperativa "Loól Xaán" (flor de jipi), en el área de la Reserva de la Biosfera los Petenes, Campeche, México. Tesis de Licenciatura. UASC.México. pp. 156-163.
- Muñoz, M., y Tuberquia, D. (1999). Estudio preliminar para el manejo sostenible *de Carludovica palmata* R. y P. como materia prima en la producción de papel artesanal en Cabo Corrientes, Chocó, Colombia. *Actualidades Biológicas*, 21(71), 87–96.
- Ortega-Haas, J. (2016). Efecto de abono orgánico e inorgánico en el crecimiento de la palma de jipi (*Carludovica palmata* Ruiz &Pavón) en el norte de Campeche, México. Tesis de Maestría. El Colegio de la Frontera Sur, México. pp. 12-20.
- Pacini, E. (2012). Pollen and seed analogies. *Plant Biosystems*, 146(3), 738–748. https://doi.org/10.1080/11263504.2012.716798.
- Pacini, Ettore, & Dolferus, R. (2019). Pollen Developmental Arrest: Maintaining Pollen Fertility in a World With a Changing Climate. *Frontiers in Plant Science*, *10*(679).
- Palma, P. (2018). Nacional versus importado: breve historia de las enfermedades tipo amarillamiento letal en México. *Desde el Herbario CICY*, 10, 241-249
- Panza, V., Lainez, V., & Maldonado, S. (2004). Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis. Botanical Journal of the Linnean Society*, 145(4), 445-453. <u>https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2004.00293.x</u>
- Paredes, N. (2004). Desarrollo de metodologías para la transformación in planta de cocotero (*Cocos nucifera* L.). Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México. pp. 52-54.
- Perea-Mercado, S., Alayón, J., & Lope-Alzina, D. (2012). La diversidad vegetal en solares y el empoderamiento de mujeres en comunidades aledañas a la Reserva de la Biosfera Calakmul, en: Aves y huertos de México, Vásquez-Dávila, M. y Lope-Alzina, D. (Eds). Gender Studies, pp. 90-91.
- Piven, N., Barredo-Pool, F., Borges-Argáez, I., Herrera-Alamillo, M., Mayo-Mosqueda, A., Herrera-Herrera, J., & Robert, M. (2001). Reproductive Biology Of Henequén (*Agave fourcroydes*) And Its Wild Ancestor *Agave angustifolia* (Agavaceae). *American Journal*

of Botany, 88(11), 1966–1976. https://doi.org/10.2307/3558424.

- Poethig, R. S. (2013). Vegetative phase change and shoot maturation in plants, en: *Current topics in developmental biology*, Rougvie, A. y O'connor, M. (Eds.). Academic Press, New Jersey, pp. 125-152.
- PROTA (2016). PROTA4U web database Wageningen and Nairobi, Netherlands/Kenia: Plant Resources of Tropical Africa. <u>https://www.prota4u.org/database/</u>[Acceso 06 de noviembre 2022].
- Purseglove. (1972). Monocotyledons (tropical crops). Longman, London, UK, pp. 101.
- Radoeva, T., Vaddepalli, P., Zhang, Z., Weijers, D. (2019). Evolution, initiation, and diversity in early plant embryogenesis. *Developmental Cell*, 50(5), 533-543. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.07.011
- Raghavan, V. (2003). Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present. *New Phytologist*, *159*, 565–583. <u>https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00846.x</u>.
- Raka, M., Vijayalakshmi, G., Naik, M., Basha, P., Sergeant, K., Hausman, J. & Khan, P. (2019).
   Pollen development and function under heat stress: from effects to responses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41, 1-20. <u>https://doi.org/10.1007/s11738-019-2835-8</u>
- Raman, V., Horner, H., & Khan, I. (2014). New and unusual forms of calcium oxalate raphide crystals in the plant kingdom. *Journal of plant research*, 127, 721-730. https://doi.org/10.1007/s10265-014-0654-y.
- Retamales, H, & Scharaschkin, T. (2014). A statining protocol for identifying secondary compounds in Myrtaceae. *Applications in Plant Sciences*, 2(10), 1400063, https://doi.org/10.3732/apps.1400063.
- Roberts, E. (1973). Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, *1*, 499–512.
- Rodríguez-Huerta, E., Rosas-Casals, M., & Hernández-Terrones, L. (2019). Water societal metabolism in the Yucatan Peninsula . The impact of climate change on the recharge of groundwater by 2030. *Journal of Cleaner Production*, 235, 272–287. <u>https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.310</u>.

- Romero, E. (2011). Propagación vegetativa de *Carludovica palmata,* Ruiz. Pav. (Bombonaje) en estación experimental agropecuaria Satipo-Junín. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional del Centro de Perú. Perú. pp. 20-21.
- Ruan, Y.-L., Patrick, J. W., Bouzayen, M., Osorio, S., & Fernie, A. R. (2012). Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends in Plant Science*, *17*(11), 656–665.
- Sabelli, P. A. (2012). Seed development: a comparative overview on biology of morphology, physiology, and biochemistry between monocot and dicot plants, en: Seed Development: OMICS Technologies toward Improvement of Seed Quality and Crop Yield: OMICS in Seed Biology, Agrawak, G. y Rakwal, E. (Eds). Springer Netherlands. pp. 3-25.
- Sajo, M., Lombardi, J., Forzza, R., & Rudall, P. (2014). Comparative anatomy of reproductive structures in Cyclanthaceae (Pandanales). *International Journal of Plant Sciences*, *175*(7), 814–827.
- Schmid, M. W., Schmidt, A., & Grossniklaus, U. (2015). The female gametophyte: an emerging model for cell type-specific systems biology in plant development. *Frontiers in Plant Science*, 6(907), 1–18. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00907</u>.
- Schmidt, A., Schmid, M. W., & Grossniklaus, U. (2015). Plant germline formation: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction. *Development*, 142, 229–241. <u>https://doi.org/10.1242/dev.102103</u>.
- Schremmer, F. (1982). Blühverhalten und bestäubungsbiologie von *Carludovica palmata* (Cyclanthaceae)-ein ökologisches Paradoxon. *Plant Systematics and Evolution*, *140*, 95–107.
- Seres, A., & Ramírez, N. (1995). Biología floral y polinización de algunas monocotiledóneas de un bosque nublado venezolano. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, *82*, 61–81.
- Sharma, A., Singh, M. B., & Balla, P. (2014). Cytochemistry of pollen development in Brachypodium distachyon. Plant Systematics and Evolution, 300, 1639–1648. https://doi.org/10.1007/s00606-014-0989-9.
- Shin, J., Yuan, L., & Kawashima, T. (2022). Live-cell imaging reveals the cellylar dynamics in<br/>seeddevelopment.PlantScience,111485.

https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111485

- Silva, R., Ribeiro, L., Mercadante-Simpoes, M., Nunes, Y., & Lopes, P. 82014). Seed structure and germination in buriti (*Mauritia flexuosa*), the Swamp palm. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecolocy of Plants*, 209(11), 674-685. <u>https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.08.012</u>
- Snider, J. L., & Oosterhuis, D. M. (2011). How does timing, duration and severity of heat stress influence pollen-pistil interactions in angiosperms? *Plant Signaling and Behavior*, 6(7), 930–933. <u>https://doi.org/10.4161/psb.6.7.15315</u>.
- Staples, G. & Herbst, D. (2005). A Tropical Garden Flora: Plants Cultivated in the Hawaiian Islands and Other Tropical Places. B. Press, Honolulu, Hawaii, USA, pp. 35-38.
- Steinacher, G., & Wagner, J. (2011a). Effect of temperature on the progamic phase in highmountain plants. *Plant biology*, 14(2), 295-305. <u>https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00498.x</u>
- Steinacher, G., & Wagner, J. (2013b). The progamic phase in high-mountain plants: from pollination to fertilization in the cold. *Plants*, 2(3), 354-370. https://doi.org/10.3390/plants2030354
- Sohn, S., Pandian, S., Senthil, T., Bovys, Y., Muthuramalingam, P., Shilpha, J., Satish, L. & Ramesh, M. (2021). Seed dormancy and pre-harvest sprouting in rice-an updated overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11804. <u>https://doi.org/10.3390/ijms222111804.</u>
- Soltis, D., Soltis, P., Endress, P., Chase, M., Manchester, S., Judd, W., Majure, L., & Mavrodiev, E. (2018). Phylogeny and evolution of the angiosperms. The University of Chicago, USA, pp. 23.
- Sreenivasulu, N., & Wobus, U. (2012). Seed-deveopment programs: a systems biology-base comparison between dicots and monocots, en: Seed Development: OMICS Technologies towar Improvement od Seed Qualitu and Crop Yiel, Agrawal, G. y Rakwal, R. (Eds.). Springer International Publishing, New York, pp. 3-26.
- Su, L., Wan, S., Zhou, J., Shao, Q., & Xing, B. (2021). Transcriptional regulation of plant seed

 development.
 Physiologia
 Plantarum,
 173(4),
 2013-2025.

 https://doi.org/10.1111/ppl.13548

- The-Plant-List, A. (2013). *The Angiosperms (flowering plants)*. The Plant List. <u>http://www.theplantlist.org/</u> [Acceso 15 mayo 2021].
- Tobe, H., & Kadokawa, T. (2010). Endosperm development in the Araceae (Alismatales) and evolution of developmental modes in monocots. *Journal of Plant Research*, 123(6), 731– 739. <u>https://doi.org/10.1007/s10265-010-0327-4</u>.
- Tomlinson, P., & Wilder, J. (1984). Systematic anatomy of Cyclanthaceae (Monocotyledoneae)an overview. *Botanical Gazette*, *145*(4), 535–549.
- Trujillo-Paredes, N. (2004). Desarrollo de metodologías para la trnasformación *in planta* de cocotero (*Cocos nucifera* L.). Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. pp. 71.
- Tucker, M., & Koltunow, A. (2009). Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. *Functional Plant Biology*, 36(6), 490–504.
- Uc-Dzul, E. (1995). El cultivo de la palma de jipi (*Carludovica palmata* Ruiz y Pavón): aprovechamiento y características agronómicas en la parte norte del estado de Campeche.Tesis de Licenciatura. Universidad de Chapingo, México. pp. 111-118.
- USDA-ARS (2020). Germplasm Resources Information Network (GRIN). Online Database. In: Germplasm Resources Infomation Network (GRIN). Online Database Beltsville, Maryland, USA: National Germplas Resources Laboratory. <u>http://tropical.theferns.info/</u> [Acceso 06 de noviembre 2022].
- USDA, y NRCS. (2021). *Carludovica palmata Ruiz & Pav*. The PLANTS Database; National Plant Data Team. The PLANTS Database <u>https://npgsweb.ars-</u> <u>grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomysimple.aspx</u> [Acceso 22 mayo 2022].
- Villegente, M., Marmey, P., Job, C., Galland, M., Cueff, G., Godin, B., Rajjou, L., Balliau, T., Zivy,
   M., Fogliani, B., Sarramegna-burtet, V., & Job, D. (2017). A combination of histological ,
   physiological , and proteomic approaches shed light on seed desiccation tolerance of the

basal angiosperm *Amborella trichopoda*. *Proteomes*, *5*(19), 1–16. <u>https://doi.org/10.3390/proteomes5030019</u>.

- Wang, W., Xiong, H., Sun, K., Zhang, B., & Sun, M. (2021). New insights into cell-cell communications during seed development in flowering plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 215-229. <u>https://doi.org/10.1111/jipb.13170</u>
- Wilder, G. (1988). Inflorescence position as a taxonomic character in the Cyclanthaceae. *Botanical Gazette*, 149(1), 110-115.
- WorldWeatherOnline. (2022). Santa Cruz Ex-Hacienda: monthly climate averages, Campeche,

   MX.
   <a href="https://www.worldweatheronline.com/santa-cruz-ex-hacienda-weather-averages/campeche/mx.aspx">https://www.worldweatheronline.com/santa-cruz-ex-hacienda-weather-averages/campeche/mx.aspx</a> [Acceso 22 mayo 2022].
- Yang, W., Shi, D., & Chen, Y. (2010). Female gametophyte development in flowering plants. Annual Review of Plant Biology, 61(1), 89–108. <u>https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112203</u>.
- Yang, Y. Y., & Kim, J. G. (2016). The optimal balance between sexual and asexual reproduction in variable environments: a systematic review. *Journal of Ecology and Environment*, 40(12), 1–18. <u>https://doi.org/10.1186/s41610-016-0013-0</u>.
- Zakharova, E., Khaliluev, M., & Kovaleva, L.(2022). Hormonal signaling in the progamic phase of fertilization in plants. *Horticulturae*, 8(5), 356. <u>https://doi.org/10.3390/horticulturae8050365</u>
- Zambrano-Artega, J., Hoyos-Sánchez, R., & Chicaiza-Finley, D. (2022). Evaluación de la germinación de semillas de palma de iraca (*Carludovica palmata*) en condiciones *in vitro* y *ex vitro. Caldasia*, 44(2). <u>https://doi.org/https://doi.org/10.15446/caldasia.v44n2.86282</u>.
- Zhang, Y., & Zhang, D. (2007). Asexual and sexual reproductive strategies in clonal plants. *Frontiers of Biology in China*, 2(3), 256–262. <u>https://doi.org/10.1007/s11515-007-0036-</u> <u>0</u>.
- Zhao, P., Begcy, K., Dresselhaus, T., & Sun, M. (2017). Does early embryogenesis in eudicots and monocots involve the same mechanism and molecular players? *Plant Physiology*, 173, 130–142. <u>https://doi.org/10.1104/pp.16.01406</u>.

# ANEXO(S)

# Anexo 1. Composición de la solución fijadora FAA por cada 100 mL

Solución	Porcentaje
Formaldehído	10%
Etanol (grado analítico)	50%
Ácido acético glacial	5%
Agua destilada	35%

Anexo 2. Dim	ensiones del gra	ano de polen ma	duro de C. palmata.
--------------	------------------	-----------------	---------------------

Rep	E.P. (µm)	E.E. (µm)
1	27.64	18.51
2	29.13	15.95
3	24.96	17.9
4	23.03	17.58
5	27.54	16.77
6	27.34	14.79
7	22.41	16.77
8	22.72	15.35
9	26.7	15.54
10	26.45	15.42
11	27.23	14.71
12	30.73	16.19
13	30.99	16.33
14	27.42	16.52
15	30.53	15.27
16	24.8	16.14
17	29.8	16.97
18	24.06	16.32
19	26.79	15.39
20	24.41	15.66
21	25.98	14.75
22	22.56	14.96
23	23.08	14.76
24	26.48	15.24
25	25.8	14.93
26	25.56	14.77
27	23.7	14.66
28	23.08	15.49
29	22.9	15.72
30	31.5	18.7
31	28.18	15.28

-			
32	23.68	15.43	
33	26.37	17.82	
34	31.88	17.6	
35	31.3	18.84	
36	30.62	18.3	
37	31.3	16.66	
38	29.63	16.23	
39	24.13	15.14	
40	30.14	16.59	
41	28.91	17.53	
42	28.11	15.36	
43	24.92	15.14	
44	24.85	16.08	
45	31.3	16.8	
46	29.78	16.95	
47	27.43	14.87	
48	25.41	15.01	
49	28.37	14.44	
50	25.77	15.3	
51	26.42	16.6	
52	28.95	17.25	
53	26.42	15.96	
54	25.84	16.46	
55	22.81	14.8	
56	23.75	15.52	
57	27.94	16.02	
58	23.97	15.09	
59	22.22	16.31	
60	22.81	16.02	
Promedio	26.64	16.06	
Desviación	2.83	1.116	
Error	0.36 0		

R	sin germinación	Con germinación	Total	% Germinación precoz
R1	97	3	100	3
R2	94	6	100	6
R3	95	5	100	5
			Promedio	4.66
			Desviación	1.52
			Error	0.88

Anexo 3. Porcentaje de germinación precoz en granos de polen de C. palmata.

#### Anexo 4. Germinación de polen in vitro.

R	Germinadas	No germinadas	Total	% Germinación
R1	84	916	1000	8.4
R2	67	933	1000	6.7
R3	72	928	1000	7.2
			Promedio	7.43
			Desviación	0.87
			Error	0.50

DD	A / Dimensión	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n)	largo	658.85	661.98	663.60	664.71	664.09	696.70	770.02	29'117	782.88	784.39
Óvulo (µr	ancho (polo chalazal)	327.49	327.10	330.55	331.03	330.74	317.39	355.09	340.91	361.40	373.20
	ancho (polo exostoma)	235.87	235.05	240.99	244.98	244.36	246.92	271.32	273.39	293.42	292.56
co onario n)	Largo	377.52	377.11	377.87	378.18	394.13	410.89	481.66	483.15		503.54
Sa embric (µr	ancho saco	190.91	191.55	192.35	191.34	197.39	189.70	227.99	230.47	232.08	233.67

Ovocélula (µm)						Sinérgio	las (µm)	
	Núcleo		Cél	ula	Flanco d	erecho	Flanco izc	uierdo
DDA	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo
1	14.07	5.63	14.33	69.93	4.15	11.13	4.11	9.41
2	12.94	8.82	14.85	64	5.88	11.76	5.8	10.58
3	13.4	9.10	14.1	65.9	9.47	7.98	10.2	9.8
4	13.8	9.62	15.1	63	8.82	9.41	7.41	10.58
5	14.29	9.89	14.46	67.9	9.03	11.76	8.46	12.81
6	14.26	11.26	13.9	62.1	10.00	11.41	8.82	11.76
7	14.49	12.17	14.67	68.01	10.30	14.11	8.99	12.35
8	14.79	12.73	15.08	66.9	10.58	12.11	10	10.58
x	14.01	9.90	14.56	65.97	8.53	11.21	7.97	10.98
σ	0.60	2.24	0.44	2.73	2.30	1.83	2.11	1.21
Е	0.21	0.79	0.16	0.96	0.81	0.65	0.74	0.43

Anexo 6. Cambio en las dimensiones de la ovocélula y las sinérgidas de Carludovica palmata.

\*Donde: ancho (plano horizontal) y largo (plano vertical) de la estructura

Repetición Ancho (µm) Largo (µm) **R1** 37.64 21.76 **R2** 35.67 21.63 R3 32 22.85 **R4** 32.07 20.53 R5 31.39 22.85 R6 33.52 23.7 **R7** 34.09 21.29 **R8** 27.79 22.91 R9 32.98 22.32 22.4 R10 34.58 Promedio 33.17 22.22 Desviación 2.66 0.93 Error 0.76 0.27

Anexo 7. Dimensiones (µm) de célula central en el megagametofito.

Г

Anexo 8. Dimensiones (µm) del cigoto.

Repetición	Ancho	Largo
1	33.59	19.24
2	47.4	22.28
3	49.02	22.45
4	39.68	21.42
5	40.26	21.65
6	45.38	21.85
7	46.88	21.48
8	48.38	22.06
9	47.89	22.1
10	46.01	21.48
Promedio	44.45	21.60
Desviación	4.99	0.90
Error	1.92	0.36

# Anexo 9. Proporción de semillas no fecundadas después del 9 DDA

Evento	Número por cada 10 estructuras analizadas
Posfecundación	6
Fecundación	1
Sin evento	7

Anexo 10. Porcentaje de germinación después	s de la aplicación del tratamiento con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50%
---	---

Repetición	1 dia	8 días	9 dias	10 días	12 días	15 días
С	0	0	0	0	0	0
1	0	15	45	65	90	100
2	0	25	60	95	95	100
3	0	20	45	90	95	100
Promedio	0	20.00	50.00	83.33	93.33	100
Desviación	0	5.00	8.66	16.07	2.89	0
Error	0	2.89	5.00	9.28	1.67	0

Mes	Enero		Echroro		OZJEM		Abril		Oven			0			Agosto		Sentiemhre	Septiembre		Octubre			Diciembre		lend	אוועמו
Año	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min
2019	29.4	17.2	33.2	20.0	33.5	20.2	35.6	21.8	37.7	24.5	35.8	24.0	35.0	23.0	35.3	23.3	34.3	23.2	33.2	23.2	31.1	20.9	29.9	18.5	33.7	21.7
2020	30.2	19.0	32.4	19.6	34.9	21.1	38.5	23.8	36.7	23.6	34.1	23.8	35.0	23.7	34.4	23.6	34.0	23.6	32.2	22.9	31.0	21.6	29.1	18.6	33.5	22.1
2021	29.3	18.9	31.3	19.1	33.9	21.0	36.5	22.8	36.2	23.5																

Anexo 11. Temperatura promedio (°C) para el estado de Campeche (CONAGUA, 2021).

Anexo 12. Precipitación (mm) para el estado de Campeche (CONAGUA, 2021).

Tiempo	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Anual
2019	26.7	14.2	34.6	32.7	72.6	250.9	156.8	124.7	182.8	235.3	90.5	81.4	1303.2
2020	31.1	13.4	4.1	25.9	207.1	499.1	137.2	184.8	234.2	293.1	99.1	50.3	1779.3
2021	52.8	21.1	30.4	21.6	137.5								

# Anexo 13. (A) Temperatura (°C) máxima, mínima y promedio. (B) Precipitación (mm) (WorldWeatherOnline, 2021).





Anexo 14. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) en Campeche, del 7 de febrero al 24 de mayo de 2021 (CONAGUA, 2021).

Anexo 15. Porcentajes de germinación de pollen *in vitro* utilizando medio Brewbaker y Kwacks en monocotiledóneas, con duración de 24 horas.

Especie	Тіро	% germinación	Catalogada	Referencia		
Agave angustifolia	monocotiledónea	3	Muy baja	(Piven <i>et al</i> ., 2001)		
<i>Agave fourcroydes</i> (henequén)	monocotiledónea	0.5	Muy baja	(Piven <i>et al</i> ., 2001)		
Cocos nucifera L (EMA)	monocotiledónea	40.3	Baja- intermedio	(Paredes, 2004)		
<i>Cocos nucifera L</i> (enano verde de Brasil)	monocotiledónea	66.87	Intermedio	(Feitosa-Moura <i>et</i> <i>al</i> ., 2015)		
<i>Cocos nucifera</i> L (Gigante de Brasil Praia do Forte)	monocotiledónea	89.54	Alto	(Feitosa-Moura <i>et</i> <i>al</i> ., 2015)		