



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS VERACRUZ

DOCTORADO EN CIENCIAS POR INVESTIGACIÓN

MEGAGAMETOFITOGÉNESIS EN TRES ESPECIES DE ZAMIACEAE (CYCADALES), DEL ESTADO DE VERACRUZ

MARÍA YDELIA SÁNCHEZ TINOCO

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

TEPETATES, MANLIO FABIO ALTAMIRANO, VERACRUZ, MÉXICO

2023



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Megagametofitogénesis en tres especies de Zamiaceae (Cycadales), del estado de Veracruz**, realizada por la alumna: **María Ydelia Sánchez Tinoco**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS POR INVESTIGACIÓN


AGROECOSISTEMAS TROPICALES

CONSEJO PARTICULAR


CONSEJERO


DR. ALEJANDRO ALONSO LÓPEZ

CO-DIRECTOR


DR. ANDREW PETER VOVIDES PAPALOUKA

ASESOR


DR. EDMUNDO GARCÍA MOYA

ASESORA


DRA. GALDY HERNÁNDEZ ZÁRATE

ASESORA


DRA. LOURDES GEORGINA IGLESIAS ANDREU

ASESOR


DR. DENNIS WILLIAM STEVENSON

Tepetates, Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, México, abril 2023.

MEGAGAMETOFITOGÉNESIS EN TRES ESPECIES DE ZAMIACEAE (CYCADALES), DEL ESTADO DE VERACRUZ

María Ydelia Sánchez Tinoco, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2023

RESUMEN

Dada la importancia biológica, elevados niveles de toxicidad, condición de especies amenazadas, atractivo ornamental, alto valor comercial, intentos de conservación y reintroducción mediante su propagación por semilla, las cícadas han despertado el interés de científicos, etnólogos, médicos y horticultores por más de una centuria. Sin embargo, características inherentes a su biología general, tales como su lento crecimiento, prolongadas fases de su ontogenia y consecuentes largos ciclos reproductores, han limitado el avance principalmente en el conocimiento de su biología reproductora. Los reportes sobre la ontogenia de los óvulos, así como de los ciclos reproductores en general, son fragmentados y contradictorios a causa de la dificultad para dar seguimiento al desarrollo de los óvulos jóvenes en etapas críticas. La investigación que aquí se presenta enfoca estos aspectos con base en el estudio de la ontogenia del megagametofito o megagametofitogénesis de *Ceratozamia tenuis*, *Dioon edule* y *Zamia furfuracea*, mediante observaciones directas en las localidades de ocurrencia, recolectas sistematizadas de óvulos, microtécnicas histológicas y análisis mediante microscopía fotónica. Para ello se hicieron tanto cortes con óvulos frescos como fijados para describir la anatomía de las etapas de la megagametofitogénesis, desde la etapa de núcleos libres, hasta la diferenciación de los arquegonios durante la etapa de crecimiento de la célula central. Diversas interpretaciones resultan al cabo de la presente investigación, de entre las que sobresalen: el esclarecimiento del arreglo de los núcleos libres para formar los alveolos previo a la formación de paredes, la manera en que las células del cuello son empujadas hacia el interior de la cámara arquegonial, el número constante de dos células del cuello previo a la fertilización, así como sus características estructurales asociadas a la atracción y facilitación del paso del anterozoide para fecundar a la ovocélula. Dichos resultados representan aportes al conocimiento de la biología reproductora de estas plantas que permiten, no solo identificar a nivel anatómico las etapas de la megagametofitogénesis, sino relacionar la participación de dichas estructuras con los mecanismos que favorecen su reproducción y determinar los tiempos de ocurrencia en el ciclo reproductor de cada una de las especies estudiadas.

Palabras clave: Alveolación, anatomía, arquegonios, biología reproductora, Cycadales, megagametofitogénesis, núcleos libres, óvulos, Zamiaceae.

MEGAGAMETOPHYTOGENESIS IN THREE SPECIES OF ZAMIACEAE (CYCADALES) FROM THE STATE OF VERACRUZ

María Ydelia Sánchez Tinoco, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2023

ABSTRACT

Due to their biological importance, high toxicity levels, endangered species status, ornamental attractiveness, high commercial value, conservation attempts and reintroduction through seed propagation, cycads have been of interest to scientists, ethnologists, physicians and horticulturists for more than a century. However, inherent characteristics of their general biology, such as slow growth, long phases of ontogeny and consequently long reproductive cycles, have limited progress mainly in the knowledge of their reproductive biology. Reports on ovule ontogeny, as well as reproductive cycles in general, are fragmented and contradictory because of the difficulty in following the development of young ovules at critical stages. The research presented here focuses on these aspects based on the study of the ontogeny of the megagametophyte or megagametophytogenesis of *Ceratozamia tenuis*, *Dioon edule* and *Zamia furfuracea*, through direct field observations at the sites of occurrence, systematized collections of ovules, histological microtechniques and analysis by brightfield light microscopy. For this purpose, both fresh and fixed ovules were sectioned to describe the anatomy of the stages of megagametophytogenesis, from the stage of free nuclei to the differentiation of archegonia during the stage of central cell growth. Several interpretations result from the present investigation, among which stand out: the clarification of the arrangement of the free nuclei to form the alveoli prior to the formation of walls, the way in which the neck cells are pushed towards the interior of the archegonial chamber, the constant number of two neck cells prior to fertilization, as well as their structural characteristics associated with attracting and enabling the passage of the antherozoids to fertilize the egg cell. These results represent contributions to the knowledge of the reproductive biology of these plants that allow, not only to identify at anatomical level the stages of megagametophytogenesis, but to relate the involvement of these structures with the mechanisms that favor their reproduction and to determine the times of occurrence in the reproductive cycle of each of the species studied.

Key words: Alveolation, anatomy, archegonium, Cycadales, free nuclei, megagametophytogenesis, ovule, reproductive biology, Zamiaceae.

DEDICATORIA

A DON OSCAR,

Papá, se que allá a dónde estás ahora
estarás orgulloso de lo que hiciste de mi.

A TIM,

Por creer en mi y hacer mis sueños realidad.

A MI SOBRINO OSCAR,

Con mucho cariño.

A RAÚL,

Por su apoyo constante e incondicional.

AL DR. E. MARK ENGLEMAN,

Por haber formado a la anatomista que soy.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis representa la conclusión de una labor en la que participaron diferentes personas en distintos momentos, así que este espacio me ofrece la oportunidad de hacerles patente mi agradecimiento.

En primer lugar y de manera muy especial agradezco al Dr. Timothy John Gregory, un ejemplo de altruismo y amor por la conservación de la naturaleza. Un ser humano auténticamente bondadoso. Sin su financiamiento no habría sido posible mi permanencia dentro del programa doctoral y, sobre todo, el desarrollo de esta investigación. Tim, no existe espacio, palabras, sentimientos que expresen mi profundo agradecimiento, no solo por creer en mí y apoyarme en este proyecto de mi formación académica, sino por materializar uno de mis más grandes sueños.

Agradezco al Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, por permitirme llevar a cabo mi propuesta de investigación, así como por todas las facilidades y prerrogativas durante mi estancia dentro del Programa de Doctorado por Investigación.

A la Universidad Veracruzana por alentar y facilitar la superación profesional de sus académicos. A todos los directivos, administradores y secretariado que participaron en las gestiones para mi descarga académica. En especial, a la Secretaría Académica, a la Dirección General de Investigaciones y a la Dirección General de Desarrollo Académico e Innovación Educativa, que aportó un estímulo económico temporal para cubrir el concepto de inscripción. Es imperativo resaltar mi agradecimiento a mi institución laboral, el Instituto de Investigaciones Biológicas, en particular deseo agradecer al Dr. Eduardo Morteo Ortiz, director del instituto por sus generosas gestiones para realizar mis estudios doctorales.

Agradezco a mi Consejo Particular que, sin duda, no pudo constituirse mejor. Debo reconocer la buena disposición de todos para apoyarme, para motivarme, para responder con prontitud y buena disposición a todas mis solicitudes; les agradezco sus críticas, comentarios y aportaciones. Pero por encima de todo, por sus manifestaciones más humanas, aquellas que difícilmente se transmiten en el ámbito académico.

Al Dr. Alejandro Alonso López, mi profesor consejero, por darme una cordial bienvenida al campus Veracruz y acogerme como su estudiante, por desestimar mis avatares y alentarme en todo momento a concluir esta tesis.

Al Dr. Andrew Vovides, director de tesis, maestro y entrañable amigo, agradezco todas sus esmeradas enseñanzas y aportaciones al enriquecimiento de esta investigación, sus motivaciones y su siempre buena disposición para ayudarme a resolver cualquier desavenencia.

Al Dr. Dennis Wm. Stevenson, mi gratitud por haber aceptado integrarse a este equipo. No solo me ha enriquecido grandemente con sus enseñanzas y prestigiada experiencia en el mundo de las gimnospermas y las cícadas, sino que ha me ha incentivado a aplicarme en la práctica de la difusión escrita. Mi gratitud infinita por todas las horas invertidas en la revisión y edición de los artículos, así como su siempre esmerada respuesta a todas mis solicitudes. Dr. Dennis, ha sido un verdadero privilegio trabajar con Ud.

Al Dr. Edmundo García Moya, le agradezco inmensamente el aceptar unirse a mi Consejo Particular, me ha honrado con su participación. He recibido de Ud., innumerables enseñanzas, he valorado el empeño en cada revisión de mis manuscritos a través de los cuales me ha transmitido valiosas enseñanzas. Le agradezco que haya desestimado temáticas, distancias y tiempos, siempre manifestando su firme intención de apoyarme.

A la Dra. Galdy Hernández Zárate, le reconozco su buena disposición y acciones emprendidas para colaborar en todo momento. Así también, todas sus atenciones y muestras de simpatía hacia mi persona. Fue un acierto sumarla en este equipo del que he aprendido tanto.

A mi querida amiga, la Dra. Lourdes Georgina Iglesias Andreu, pilar fundamental para facilitarme mi trámite de descarga académica al incorporarme a su Cuerpo Académico y recomendarme el campus Veracruz del Colegio de Posgraduados. Por creer en mí, por su disponibilidad para apoyarme en todo momento; por todos sus consejos, enseñanzas y por las angustias que vivimos juntas durante mi trayectoria en este programa doctoral.

A mi querido colega, amigo y brillante investigador, al M.C. Leonel Torres Hernández. Leonel, mi agradecimiento para ti lo interpreto como uno de los más grandes aciertos en mi vida; haber coincidido contigo en el espacio laboral por más de tres décadas, tiempo en el que he absorbido de tu sapiencia y bondad tanto como lo que me hace admirarte. Gracias por contribuir siempre de la mejor manera a discutir, evaluar y revisar no solo tres tesis, sino cualquier tipo de manuscrito.

Al Dr. Miguel Ángel Pérez Farrera, un ejemplo de compromiso, trabajo y bondad. Miguel, gracias por tu permanente preocupación por mí, aún a la distancia estás ahí por cada vez que te necesito.

Al Sr. Miguel Vega Zúñiga, le agradezco su siempre amable disposición para apoyarme en el trabajo microtécnico.

A la Dra. Verónica Lango Reynoso, directora del campus Veracruz, le agradezco y me disculpo por todas las angustias ocasionadas, por su permanente compromiso para resolver cualquier trámite por imposible que se presentara; siempre con la mejor actitud dispuesta a apoyarme desde el primer día que pisé el campus. Gracias por creer en mí. Verónica, de ti he aprendido mucho en este tiempo y te admiro. De mi paso por el campus, tu amistad es uno de los preceptos más valiosos que atesoro.

No podría cerrar este segmento sin expresar mi profundo agradecimiento a mis compañeras de trabajo que, cuando solicité una mano para descargarme de múltiples funciones, me ofrecieron dos. Ellas de alguna manera están presentes en esta obra. A la L.A.E. María Angélica López Vásquez y a la Sra. Martha Mendoza Hernández, no puedo decirles más que gracias, muchas muchas gracias.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA	5
El Orden Cycadales.....	5
Taxonomía y distribución.....	5
Aspectos evolutivos	7
Morfología general.....	8
Ciclo reproductor.....	14
Ontogenia del óvulo y semilla	17
Iniciación del óvulo	17
Megasporogénesis	18
Megagametofitogénesis.....	19
Arquegonios	22
Fertilización.....	23
Embriogénesis.....	25
Localidades de recolecta.....	26
CHAPTER I. SALIENT OVULE FEATURES OF <i>Zamia furfuracea</i> L. FIL.: EARLY STAGES OF MEGAGAMETOPHYTOGENESIS	31
1.1 ABSTRACT	31
1.2 INTRODUCTION.....	31
1.3 MATERIALS AND METHODS.....	34
1.4 RESULTS	34
1.4.1 Free nucleus stage.....	35
1.4.2 Alveolation stage	36
1.5 DISCUSSION	37
1.5.1 Free nuclei stage.....	37

1.5.2 Alveolation stage	38
1.6 CONCLUSION	42
CHAPTER II. LATE STAGES OF MEGAGAMETOPHYTOGENESIS: ARCHEGONIA DEVELOPMENT IN ZAMIACEAE	44
2.1 ABSTRACT	44
2.2 INTRODUCTION.....	44
2.3 MATERIALS AND METHODS	47
2.4 RESULTS	48
2.4.1 The central cell growth stage.....	48
2.4.2. Anatomy of <i>C. tenuis</i> ovules during the central cell growth stage.....	49
2.4.3. Anatomy of <i>Z. furfuracea</i> ovules during the central cell growth stage 50	
2.5 DISCUSSION.....	51
2.6 CONCLUSION	53
DISCUSIÓN GENERAL.....	58
Ciclos reproductores	58
Etapas iniciales de la megagametofitogénesis	60
Núcleos libres	60
Alveolación.....	61
Etapa tardía de la megagametofitogénesis.....	63
Las células del cuello durante la etapa de crecimiento de la célula central.	63
CONCLUSIONES GENERALES	66
LITERATURA CITADA.....	70
ANEXOS	78
Anexo A	78
Anexo B	79
Anexo C	80

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía del Orden Cycadales. Calonje M, Stevenson D.W. & Osborne R. (2013-2023).....	6
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del Orden Cycadales. Modificado de González-Astorga et al., (2019).....	7
Figura 2. <i>C. tenuis</i> . Planta adulta femenina. Modificado de Sánchez-Tinoco, (1998).	10
Figura 3. <i>D. edule</i> . Planta adulta femenina. Modificado de Vovides et al., (1983).....	11
Figura 4. <i>Z. furfuracea</i> . Planta adulta femenina. Modificado de Ordóñez-Balderas, (2011).....	12
Figura 5. Estructuras reproductoras en <i>C. tenuis</i>	13
Figura 6. Representación del ciclo reproductor de <i>Zamia</i>	16
Figura 7. Representación de las etapas iniciales de la ontogenia del óvulo a semilla.....	18
Figura 8. Representación de las etapas iniciales de la megagametofitogénesis.....	21
Figura 9. Representación de la ontogenia del arquegonio	23
Figura 10. Corte longitudinal del óvulo de <i>Dioon edule</i> durante la fertilización.....	25
Figura 11. Desarrollo de las primeras etapas del embrión.....	26
Figura 12. Localidad de <i>C. tenuis</i>	28
Figura 13. Localidad de <i>D. edule</i>	29
Figura 14. Localidad de <i>Z. furfuracea</i> . a. hábito, b. detalles del hábitat, c. localización geográfica (@GoogleEarth).....	30
Figure 1.1. <i>Zamia furfuracea</i> . A. Megastrobilus emerging in June	36
Figure 1.2. A. Schematic representation of ovule showing the formation of the female gametophyt (Modified from Chamberlain; 1919).....	39
Figure 1.3. A. Schematic representation of complete alveolation in an ovule of <i>Pinus sylvestris</i> , (Modified from Maheswari & Singh, 1966)	41
Figure 2.1. Development of the archegonium in <i>Dioon edule</i>	55
Figure 2.2. A. <i>C. tenuis</i> ovule in May during the central cell growth stage.....	56
Figure 2.3. A. <i>Z. furfuracea</i> ovule in September during the central cell growth stage..	57

INTRODUCCIÓN GENERAL

La obra que se presenta a continuación se desarrolla bajo el formato de capítulos, los cuales están integrados por dos artículos. Los artículos reportan resultados de la investigación propuesta como proyecto de tesis para conseguir el grado de Doctor en Ciencias por Investigación dentro del Colegio de Postgraduados.

Con el objetivo general de describir una etapa de la ontogenia de la semilla de *Ceratozamia tenuis* (Dyer) D. W. Stev. & Vovides, *Dioon edule* Lindley y *Zamiafurfuracea* L. fil., *Zamiaceae* (Cycadales) del estado de Veracruz, se investigó la formación del gametofito femenino o megagametofitogénesis. El artículo "Salient ovule features of *Zamia furfuracea* L. fil.: early stages of megagametophytogenesis" describe las etapas iniciales de la megagametofitogénesis, esto es, la etapa de núcleos libres, la alveolación y el inicio de la formación de paredes en el gametofito. El artículo "Late stages of megagametophytogenesis: archegonia development in *Zamiaceae*" integra información de los procesos finales de la ontogenia del megagametofito, se describe estructuralmente la etapa de crecimiento de la célula central y la anatomía de los arquegonios.

Las Cycadales, comúnmente conocidas como cícadadas, constituyen un grupo de plantas con caracteres evolutivamente ancestrales, incluidos en la agrupación natural de las gimnospermas (Chamberlain, 1935). Como expresión de su antiguo linaje evolutivo, las Cycadales presentan características estructurales importantes que permiten el estudio de la evolución de las Spermatophyta (Norstog, 1972); bajo esta consideración se han llamado "fósiles vivientes".

Entre las características ancestrales relacionadas al aparato reproductor de estas plantas, se destacan el arquegonio u órgano sexual femenino, así como la presencia de arquegonios diferenciados en el óvulo (Crane, 1985). Esto incorpora un logro en la evolución de la vida vegetal considerando que la semilla representó la liberación de la dependencia del agua libre como ocurre en las formas inferiores, caso de las Criptógamas, ya que los arquegonios están contenidos dentro de la semilla (Strasburger, 1994).

La megagametofitogénesis u ontogenia del megagametofito en las cícadas y en *Ginkgo* corresponde al tipo más primitivo entre todas las gimnospermas vivientes, cuyo resultado final es la formación del gameto femenino u ovocélula (Coulter & Chamberlain, 1910). La megagametofitogénesis en sus primeras etapas origina una estructura celular que corresponde a la parte vegetativa del gametofito, en su madurez funciona como tejido de reserva; en la etapa complementaria se forman los arquegonios y dentro de ellos la ovocélula, que en conjunto constituyen la porción reproductora del gametofito.

En las cícadas, la reproducción sexual o fusión de gametos y posterior reducción (meiosis), se asocia a la alternancia de generaciones, donde el esporofito diploide es la generación dominante y el gametofito representa la generación haploide. El gameto (n), cigoto ($2n$) están contenidos dentro del arquegonio; después, el embrión ($2n$), continúa su crecimiento dentro del gametofito femenino vegetativo protegido por la cubierta seminal ($2n$). De tal modo que, en la semilla se expresan la combinación de generaciones esporofíticas y gametofíticas (Bold, 1973; Foster y Gifford, 1974; Gifford y Foster, 1989; Graham, 1985).

Otras características ancestrales asociadas al proceso reproductor son los anterozoides móviles (Ikeno, 1896; Smith, 1955; Brenner et al., 2003). Las células del cuello en el arquegonio que están presentes en todas las plantas arquegoniada, constituyen un aparato eficiente en el transporte del gametofito masculino hacia el citoplasma de la célula central para más tarde fertilizar a la ovocélula (Sánchez-Tinoco et al., 2018a).

Los ciclos del desarrollo reproductor en las gimnospermas, mismos que involucran el tiempo que transcurre entre cada uno de los procesos ontogenéticos, desde la iniciación de los óvulos, megasporogénesis, megagametofitogénesis, polinización, fecundación y desarrollo del embrión o, en otras palabras, la maduración de la semilla, pueden ser de entre uno y tres años. Este tiempo puede ser más prolongado en las gimnospermas de zonas templadas y más corto en las de zonas tropicales (Singh, 1961; Smith, 1978; Dehgan & Johnson, 1983; Owens et al., 1997; Hann -Chung & Yu-Fen, 2001).

La estacionalidad de la actividad reproductora también es determinante en la longitud de los ciclos (Singh & Johri, 1972), lo cual en las cícadas varía según el género. En *C. tenuis*, especie de bosque mesófilo de montaña, el ciclo reproductor transcurre en dos años (Sánchez-Tinoco et al., 2000; Vovides et al., 2016); dentro de este tiempo sobresale un periodo prolongado de latencia previa a la germinación que oscila entre los ocho y 12 meses (Pérez-Farrera & Vovides, 1997). Por el contrario, *Z. furfuracea* crece en dunas costeras y su ciclo es de un año (Sánchez-Tinoco et al., 2018b). En tanto, en *D. edule*, que se establece en la selva baja caducifolia en el estado de Veracruz, se estima que el desarrollo de los óvulos a semillas es de tres años (Vovides & Iglesias, 1994).

El conocimiento actual del desarrollo del óvulo a semilla en las cícadas se ha integrado con contribuciones fragmentadas, es decir, se han estudiado porciones del proceso en algunas formas vivientes (Singh & Johri, 1972); sobresalen grandes aportes en las obras de Coulter & Chamberlain (1910), Chamberlain (1935), Andrews (1961), Doyle (1963), Sporne (1965), Maheswari & Singh (1967), Bierhorst (1971), Singh & Johri (1972) y Singh (1978). Lo desafortunado es que, aun cuando se cuenta con valiosa información, en algunos casos ésta no precisa los taxa estudiados para las Cycadales vivientes y para aquellos casos en que los taxa son referidos, su situación taxonómica ha cambiado. Norstog (1990), señaló que aun cuando se tiene conocimiento de ciertos procesos de la biología reproductora de las cícadas en general, la información aún es incompleta.

Estudiar la ontogenia de los óvulos en particular involucra cierto grado de dificultad, principalmente seguir el desarrollo de los óvulos jóvenes en etapas críticas y, por ende, de contar con semillas maduras (Quisumbing, 1925; Chamberlain, 1935; Norstog, 1990). Por otro lado, lo prolongado de los ciclos constituye un retraso al momento de conseguir una etapa en particular o de hacer repeticiones. Sin dejar de lado que un obstáculo importante lo constituye el hecho de que las poblaciones naturales son objeto de saqueos con fines comerciales y de la destrucción de su hábitat.

No obstante, los resultados obtenidos al cabo de la presente investigación, producto de una década de estudio, constituyen aportaciones significativas a la biología

de estas plantas milenarias, destacando el esclarecimiento y adición de información sobre la ontogenia del óvulo en las etapas iniciales y tardías de la megagametofitogénesis. Dentro de las etapas iniciales, sobresale la información sobre la organización de los núcleos libres, la estructura y arreglo de dos tipos de alveolos que en corte longitudinal forman radios y en el transversal simulan un panal de abejas, descrito para los órdenes Ephedrales y Pinales. Además, se describen las células de transferencia y su anatomía se asocia a la translocación de nutrientes. En la etapa tardía de la megagametofitogénesis, se describen detalles de la ontogenia de las células del cuello y la estructura del arquegonio durante la fase de crecimiento de la célula central, lo que se asocia a la facilitación de la fecundación de la ovocélula. Se postula que este estadio caracterizado por un profuso citoplasma vacuolado, del que sobresale una gran vacuola central, juega un papel importante en la expulsión de las células del cuello hacia la cámara arquegonial. No se registraron diferencias sustanciales entre la estructura de estos complejos estructurales en las dos especies estudiadas, solo varían en la celeridad de los procesos.

Adicionalmente, se integró información para determinar los eventos del ciclo reproductor desde la iniciación de los óvulos hasta el desarrollo del cuerpo del embrión para las tres especies, mismos que ocurren en dos años para *C. tenuis*, en tres para *D. edule* y un año para *Z. furfuracea*.

REVISIÓN DE LITERATURA

El Orden Cycadales

Taxonomía y distribución

Las Cycadales representan el único orden viviente dentro de la división Cycadophyta. Por tradición se ha incluido dentro del grupo de las gimnospermas (vocabulo griego; γυμνος gymnos = desnudo y σπέρμα sperma = semilla), en función de la exposición de la semilla con el medio. Es un taxón en la superdivisión Spermatophyta, dentro del reino Plantae y subreino Tracheobionta, o de las plantas vasculares. Estudios filogenéticos basados en secuencias moleculares y caracteres morfológicos, proponen dos familias dentro del orden: Cycadaceae, con el género *Cycas*, y Zamiaceae que comprende nueve géneros: *Bowenia*, *Ceratozamia*, *Dioon*, *Encephalartos*, *Lepidozamia*, *Macrozamia*, *Microcycas*, *Stangeria* y *Zamia*, sumando 371 especies aceptadas taxonómicamente (Calonje et al., 2013-2023) (Cuadro 1). Geográficamente se distribuyen en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo (Figura 1). México es el segundo centro de diversidad del orden con 72 especies pertenecientes a los géneros *Ceratozamia*, *Dioon* y *Zamia* (Norstog & Nicholls, 1997; Vovides, 2000; Christenhusz et al., 2011; Osborne et al., 2012; Calonje et al., 2013-2023).

Cuadro 1. Taxonomía del Orden Cycadales. Calonje M, Stevenson D.W. & Osborne R. (2013-2023).

CYCADALES	
10 géneros	
371 especies	
CYCADACEAE	
ZAMIACEAE	
▶ <i>Bowenia</i> (2)	▶ <i>Lepidozamia</i> (2)
▶ <i>Ceratozamia</i> (39)	▶ <i>Macrozamia</i> (41)
▶ <i>Cycas</i> (118)	▶ <i>Microcycas</i> (1)
▶ <i>Dioon</i> (18)	▶ <i>Stangeria</i> (1)
▶ <i>Encephalartos</i> (65)	▶ <i>Zamia</i> (84)

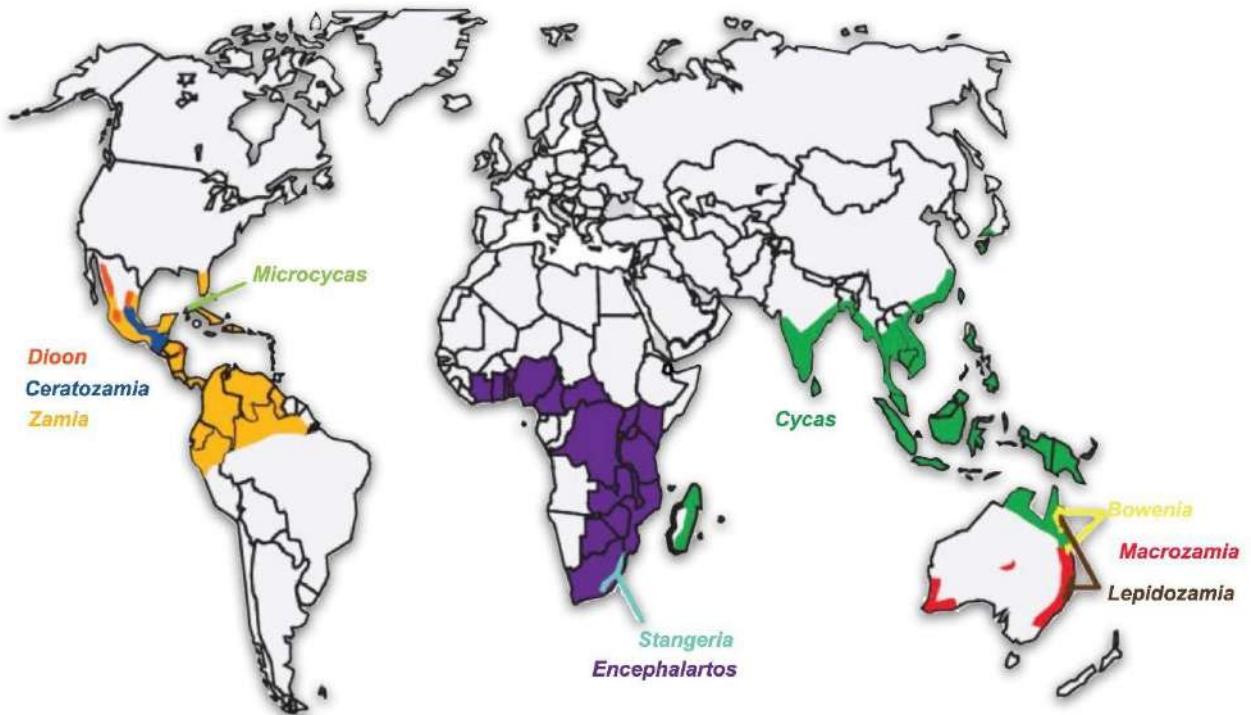


Figura 1. Distribución del Orden Cycadales. Modificado de González-Astorga et al., (2019).

Aspectos evolutivos

Las Cycadales constituyen un relicto importante del pasado (Norstog, 1972); su registro fósil data del Mesozoico, hace 250 millones de años. Sin embargo, análisis filogenéticos y datos moleculares sugieren que las especies actuales tienen una antigüedad aproximada de 12 millones de años (Nagalingum et al., 2011). Las Cycadales presentan características intermedias útiles para estudiar algunas rutas en la evolución de las Spermatophyta (Brenner et al., 2003). Algunos rasgos son apomórficos o derivados, “innovaciones”; tales como la retención, reducción y reorganización del gametofito dentro del tejido materno; y la protección que le imparte el tegumento al megagametofito. Como parte del tegumento, la sarcotesta o capa externa carnosa, que en algunas especies es de colores llamativos; constituye un atractivo para dispersores potenciales (Brenner et al., 2003; Sánchez-Tinoco & Engleman, 2004). El tallo contráctil en algunas especies de Zamiaceae, el hábito epífita en *Zamia pseudoparasitica* J. Yates de las selvas panameñas. La nervadura central en foliolos del género *Cycas*, *Stangeria eriopus* (Kunze) Baill., *Zamia chigua* Seem., y *Zamia restrepoi* (D.W. Stev.) A. Lindstr., (Stevenson et al., 1996; Lindstrom, 2009) y el tejido de transfusión. Así como el desarrollo

de toxinas, algunas carcinogénicas potentes ocurren de manera natural como las macrozaminas, cicasinas y la neurotoxina BMAA, solo presentes dentro del clado de las cícadas modernas (Brenner et al., 2003).

Otras características son plesiomórficas o ancestrales, “reminiscencias” de los grupos de plantas inferiores que ya no se encuentran en las angiospermas, entre las que sobresalen la presencia de gametos masculinos ciliados, similares a los de helechos con semilla (Brenner et al., 2003), Las líneas de dehiscencia en la región micropilar de la semilla que se observan predominantemente en la esclerotesta, convergen con la hipótesis sinangial de Benson, que postula al óvulo como una transformación de la agrupación de los esporangios y posterior esterilización de los esporangios periféricos, para formar un anillo de lóbulos tegumentarios libres rodeando un esporangio fértil central único (el megasporangio), relacionados con los apéndices de la semilla de *Genomosperma kidstonii* del carbonífero temprano (Takhtajan, 1981; Kenrick & Crane, 1997; Sánchez- Tinoco & Engleman, 2004). El estróbilo femenino abierto con varios óvulos marginales del género *Cycas* es un vestigio del fósil pérmico *Crossozamia* (Zhifeng & Thomas, 1989). Su síndrome de polinización mediante escarabajos miembros de familias primitivas, constituye un indicio de un prolongado proceso coevolutivo (Vovides, 1991). Otra característica ancestral es su anatomía estelar y el hábito paquicaule con muy poco xilema, como vestigio de la anatomía estelar de las Medullosaceae (Nagalium et al., 2011; Sánchez-Tinoco & Engleman, 2004).

Morfología general

Estas plantas parecen palmas o helechos arborescentes, pese a su similitud no tienen ninguna relación taxonómica (Figuras 2-4). Su talla va desde unos cuantos centímetros, hasta 15 m de altura. Presentan tallos con hábitos subterráneos o hipógeos, semiepígeos llegando a ser arborescentes, con apariencia de globosa a cilíndrica y, por lo general sin ramificación, en algunas especies los tallos más viejos pueden ramificarse. Los tallos de la mayoría de las especies están cubiertos por las bases persistentes de los pecíolos de las frondas y catáfilas, son paquicaules con madera suave o manoxílica (Norstog & Nicholls, 1997).

Las hojas o frondas están compuestas de un pecíolo y la extensión de éste llamada raquis, de donde emergen a lo largo los folíolos o pinnas por pares agrupados de modo opuesto o subopuesto. Las frondas están agrupadas en una corona hacia el ápice del tallo presentando una filotaxia helicoidal. Generalmente, las frondas son una vez pinnadas, con excepción de *Bowenia* cuyas frondas son bipinnadas, y también en ciertas especies de *Cycas*, como en *C. debaoensis* y *C. multipinnata* son multipinnadas (Whitelock, 2002).

La raíz primaria en algunos géneros de hábito subterráneo como *Macrozamia*, *Zamia* y *Stangeria*, puede contener elementos contráctiles que ayudan al anclaje del tallo en el suelo, sistema contráctil que persiste durante el crecimiento de la raíz. Las especies de hábito arborescente, por el contrario, reemplazan sus raíces contráctiles con un sistema secundario de raíces adventicias y los tallos no se arrastran más hacia el suelo (Stevenson, 1980; Norstog & Nicholls, 1997). Del sistema radical principal de las cícadas, emergen raíces secundarias y algunas raíces adventicias que presentan geotropismo negativo (apogeotrópicas), sus extremos se modifican para formar raíces coraloides, en donde se efectúa una relación simbiótica con cianobacterias de los géneros *Anabaena* o *Nostoc* (Grilli Caiola, 1990; Lindblad & Bergman, 1990; Norstog & Nicholls, 1997).

Todas las especies son dioicas. Las estructuras reproductoras son estróbilos que emergen del centro de la corona de hojas. La estructura básica de los estróbilos de ambos sexos consiste de un eje y hojas fértiles o esporófilos, únicamente en el género *Cycas* las esporófilas femeninas o megasporófilas, no están agrupadas en un estróbilo cerrado, sino en un estróbilo abierto con eje corto (Norstog & Nicholls 1997). En *Cycas* los óvulos se localizan sobre los márgenes, en la porción distal de una megasporófila larga. En el resto de los géneros los estróbilos femeninos o megaestróbilos, producen dos óvulos los cuales se desarrollan en cada megasporófila corta. Los estróbilos masculinos o microestróbilos producen gran cantidad de polen, el cual está contenido dentro de sacos polínicos llamados microsporangios localizados en las esporófilas masculinas o microsporoófilas (Figura 5) (Stevenson et al., 1981; Norstog & Nicholls, 1997; Sánchez-Tinoco, 1998; Whitelock, 2002).

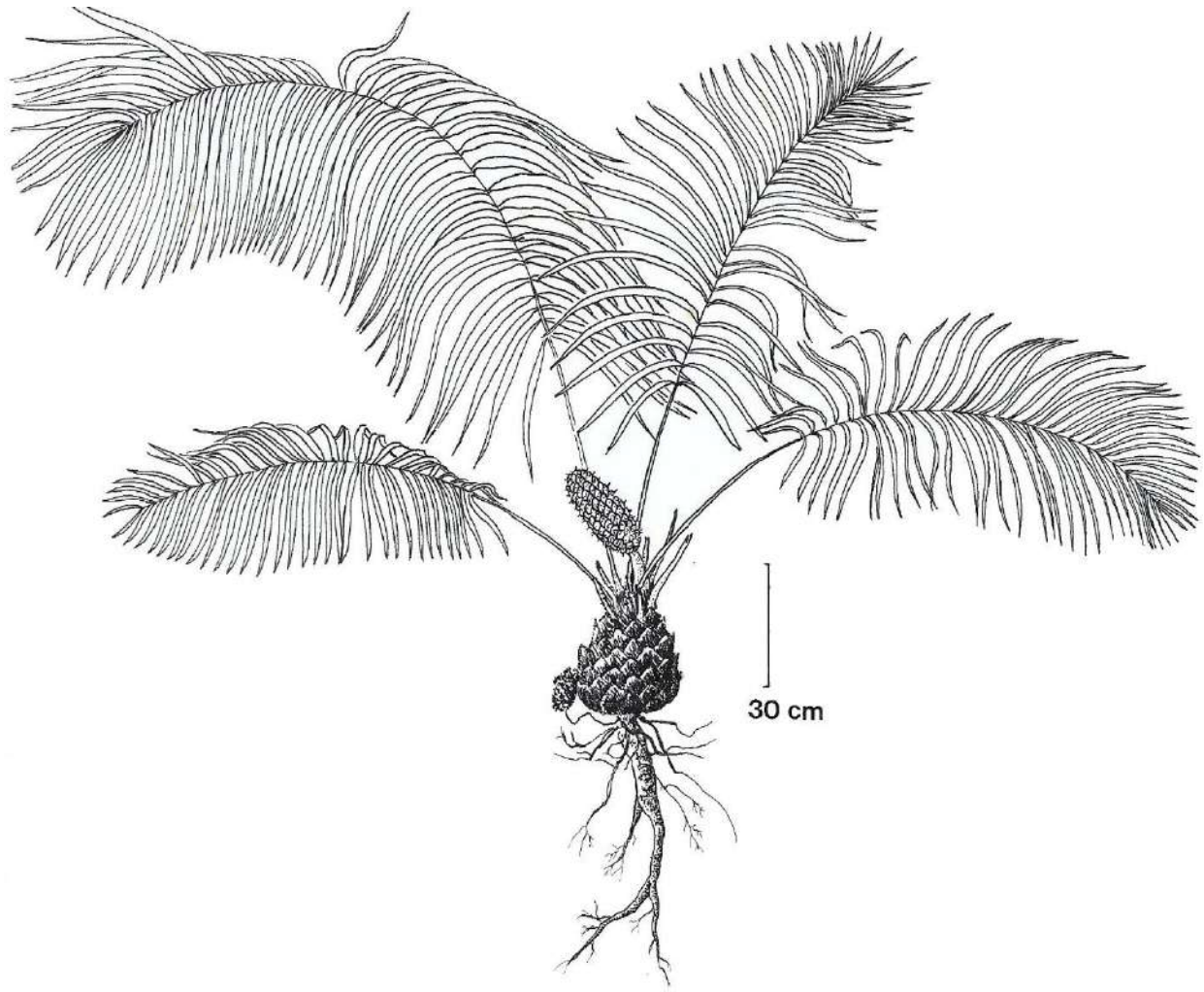


Figura 2. *C. tenuis*. Planta adulta femenina. Modificado de Sánchez-Tinoco, (1998).

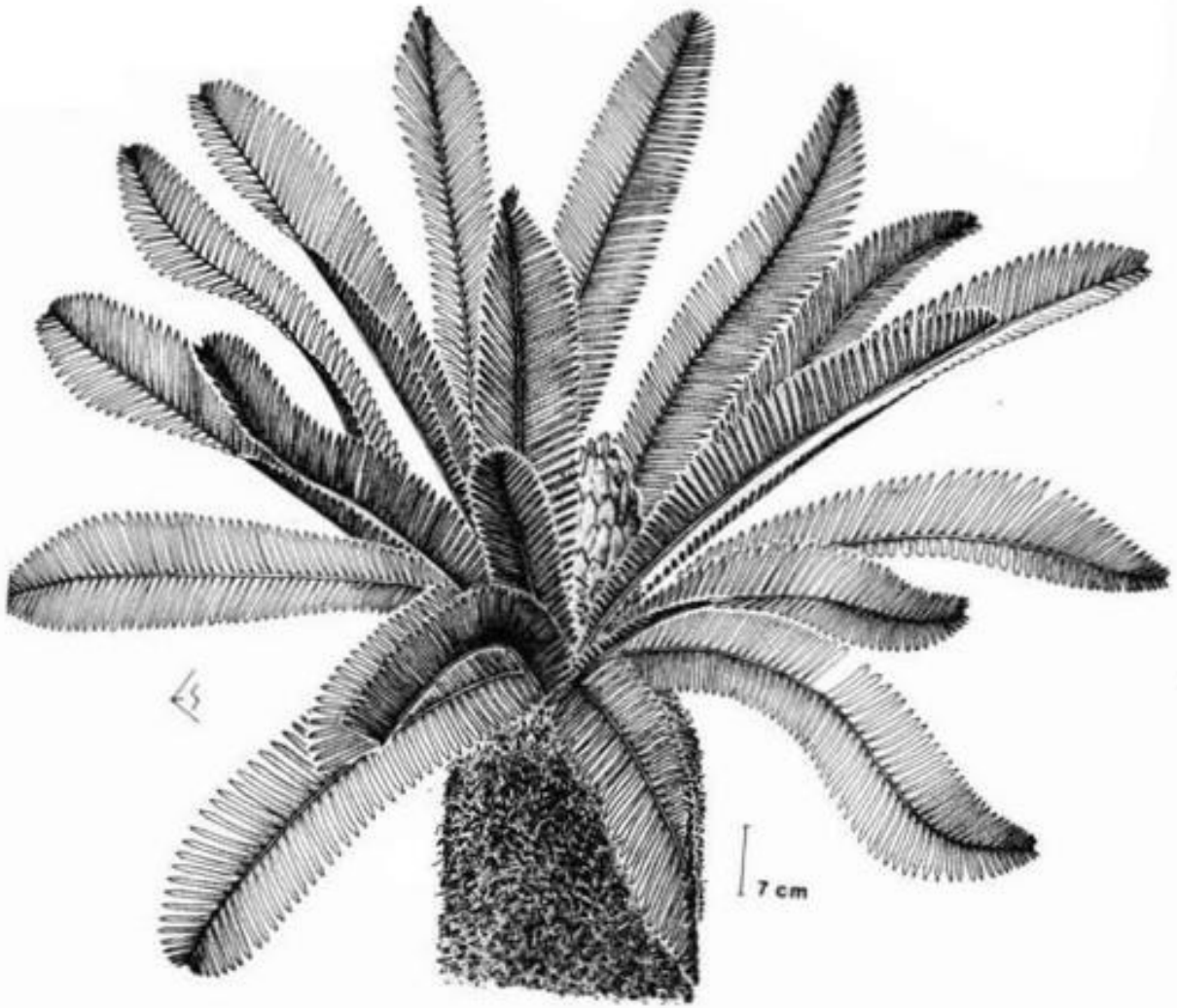


Figura 3. *D. edule*. Planta adulta femenina. Modificado de Vovides et al., (1983).

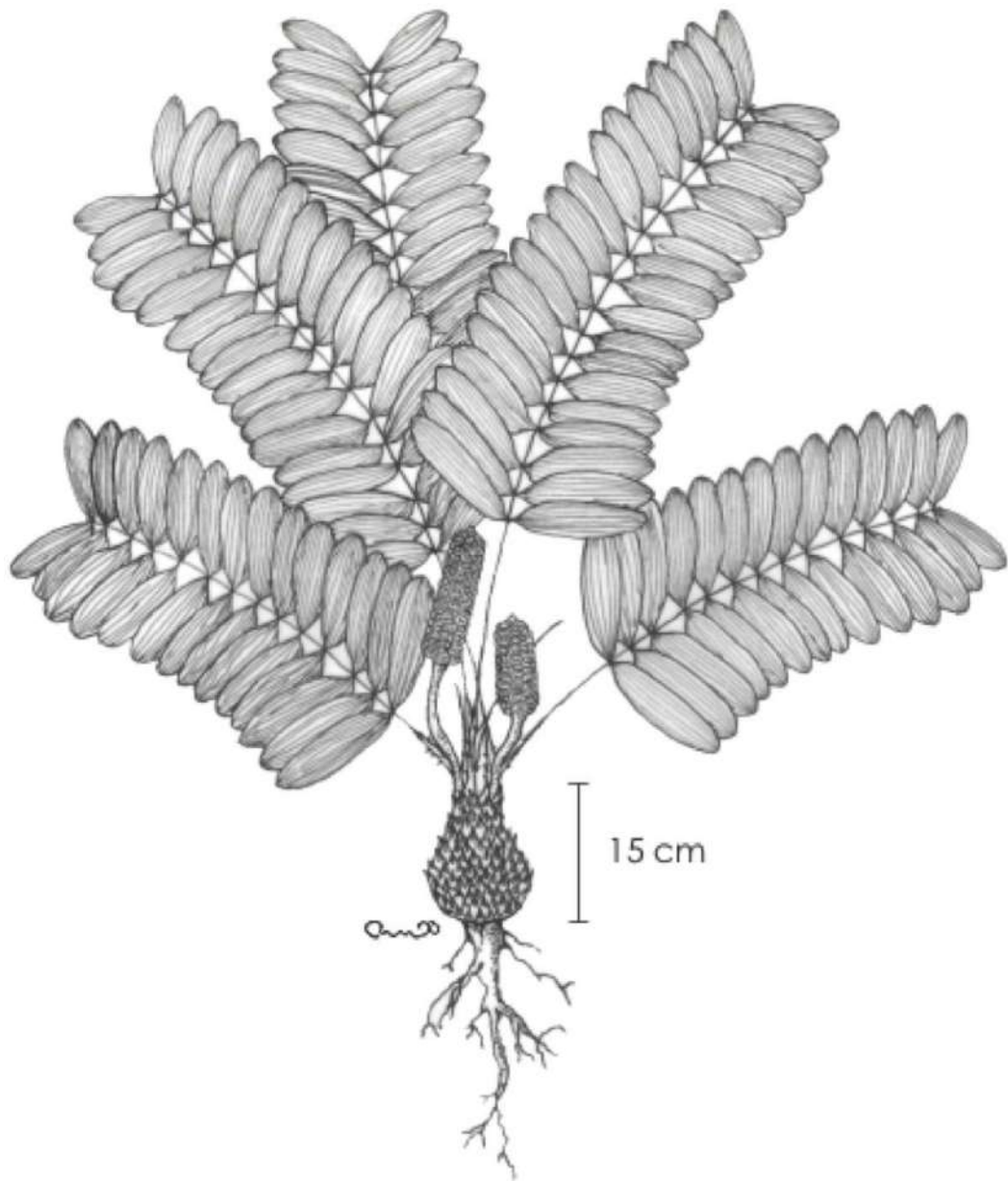


Figura 4. *Z. furfuracea*. Planta adulta femenina. Modificado de Ordóñez-Balderas, (2011).

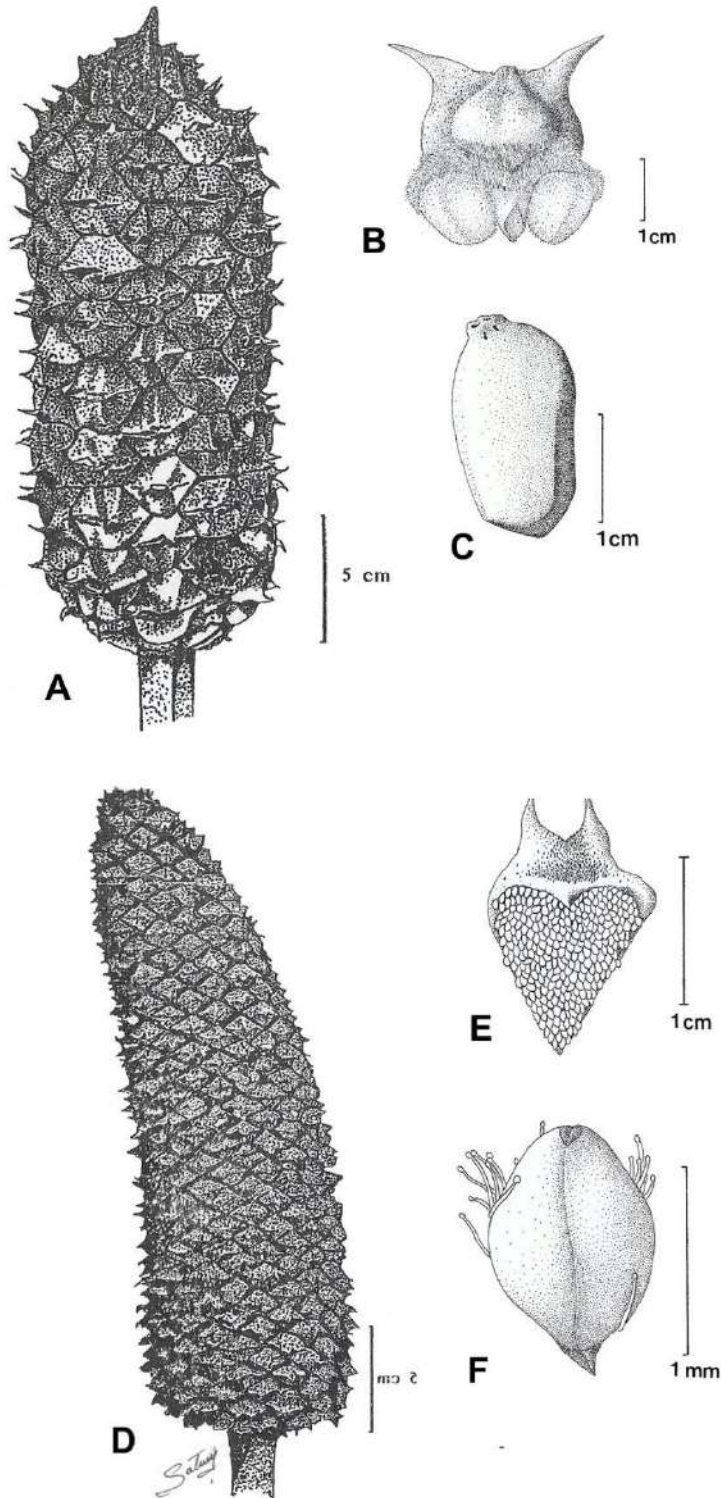


Figura 5. Estructuras reproductoras en *C. tenuis*. A, megastróbil, B, vista frontal de megasporófila, C, semilla, D, microstróbil, E, vista abaxial microsporófila con microsporangios, F, detalle de microsporangio. Modificado de Sánchez-Tinoco (1988, 2000).

Ciclo reproductor

La mayor información que se tiene en cuanto a ciclos reproductores en las cícadadas, es para *D. edule* (Chamberlain, 1919; 1935); *Cycas revoluta* (Ogura, 1967; Niklas & Norstog, 1984) y *Zamia pumila* (Niklas & Norstog, 1984; Norstog, 1986). Sin embargo, Norstog & Nicholls (1997), consignaron que, con respecto a los ciclos reproductores, en casi todas las cícadadas hay una marcada periodicidad y regularidad en lo que respecta a la iniciación de los megatróbilos y su ulterior desarrollo, y que los ciclos se mantienen incluso cuando las plantas son removidas de su medio natural.

Estos autores señalaron que en la mayoría de las especies de cícadadas la iniciación de los estróbilos ocurre en la primavera, que los estróbilos son polinizados en el verano y que se obtienen semillas en otoño e invierno. Pero también refieren a que hay diferencias de celeridad entre las especies de un mismo género.

La emergencia de estróbilos en *Zamia integrifolia* L.f., ocurre en el otoño y la polinización se lleva a cabo en diciembre. En *Z. furfuracea* la iniciación de los megatróbilos es en la primavera y se polinizan en julio (Norstog & Nicholls, 1997). En opuesto, en *Zamia roezlii* Linden, en su localidad de ocurrencia no presenta periodicidad en la emergencia de los estróbilos, y diferentes estadios de su desarrollo se pueden encontrar en la misma población (Norstog, 1977). Los estudios de Sánchez-Tinoco et al., (2000) en *C. mexicana* (ahora *C. tenuis* de la localidad Coacoatzintla), reportaron que la iniciación de los óvulos ocurre al finalizar el verano (agosto) y continúa hasta aproximadamente la primera mitad del otoño (septiembre y octubre). La polinización ocurre en la primavera, se inicia a finales de febrero, la mayor actividad se reporta en marzo y algunos registros aislados se presentan en el mes de junio. La fertilización se estima que ocurre en septiembre. La dispersión se presenta en septiembre y octubre; en este tiempo la semilla puede presentar arquegonios y en pocos casos suspensores en sus primeras etapas del desarrollo. Esto sugiere la posibilidad de que las semillas sean dispersadas sin ser fertilizadas (Sánchez-Tinoco, et al., 2000).

La fertilización en estas plantas, de manera general, ocurre al sincronizarse la maduración de los microtróbilos y megatróbilos (Figura 5,6). Se ha demostrado que la polinización o acarreo del grano de polen del microtróbilo al micrópilo del óvulo, es

entomófila por curculiónidos, e improbable la acción del viento o anemófila (Norstog et al., 1986; Tang, 1987; Norstog & Nicholls, 1997; Tang et al., 2018) (Figura 6). El acarreo del grano de polen no garantiza la inmediata fusión de los gametos o fecundación, pueden transcurrir entre tres y siete meses entre la polinización y la fertilización; así lo demuestra la presencia de tubos polínicos germinando y anterozoides dentro de la cámara arquegonial, así como arquegonios inmaduros durante este tiempo (Norstog & Nicholls, 1997; Sánchez-Tinoco, 2000). El desarrollo del embrión inicia con una etapa cenocítica, seguida por la citocinesis o formación de paredes (Dogra, 1992) y la ulterior diferenciación del suspensor. El embrión maduro, por lo general, presenta dos cotiledones, tiene forma de torpedo y presenta un nudo cotiledonar donde se distingue el epicótilo compuesto por un meristemo apical del vástago que forma varios primordios de escamas (catáfilos) y el primordio foliar (nomófilo) (Dorety, 1908b; Chamberlain, 1935; Pant, 1973). La coleorriza se presenta como una vaina que recubre a la radícula, misma que se endurece cuando el embrión se ha alargado por completo (Chamberlain, 1935). Doyle & Donoghue (1986), Crane (1988), Stevenson (1990) y Loconte & Stevenson (1990), consignan que con excepción de *Cycas*, que tiene semillas platispérmicas es decir, simetría bilateral, el resto de los géneros tienen semillas con simetría radial o radiospérmicas (Stevenson, 1990). Las plántulas se caracterizan por presentar uno o más folíolos eófilos al germinar, transcurridos meses o años, aumenta el número de frondas, crece el tronco y al final emergen los estróbilos dentro de los cuales tiene lugar el desarrollo de los gametofitos (Norstog & Nicholls, 1997; Whitelock, 2002).

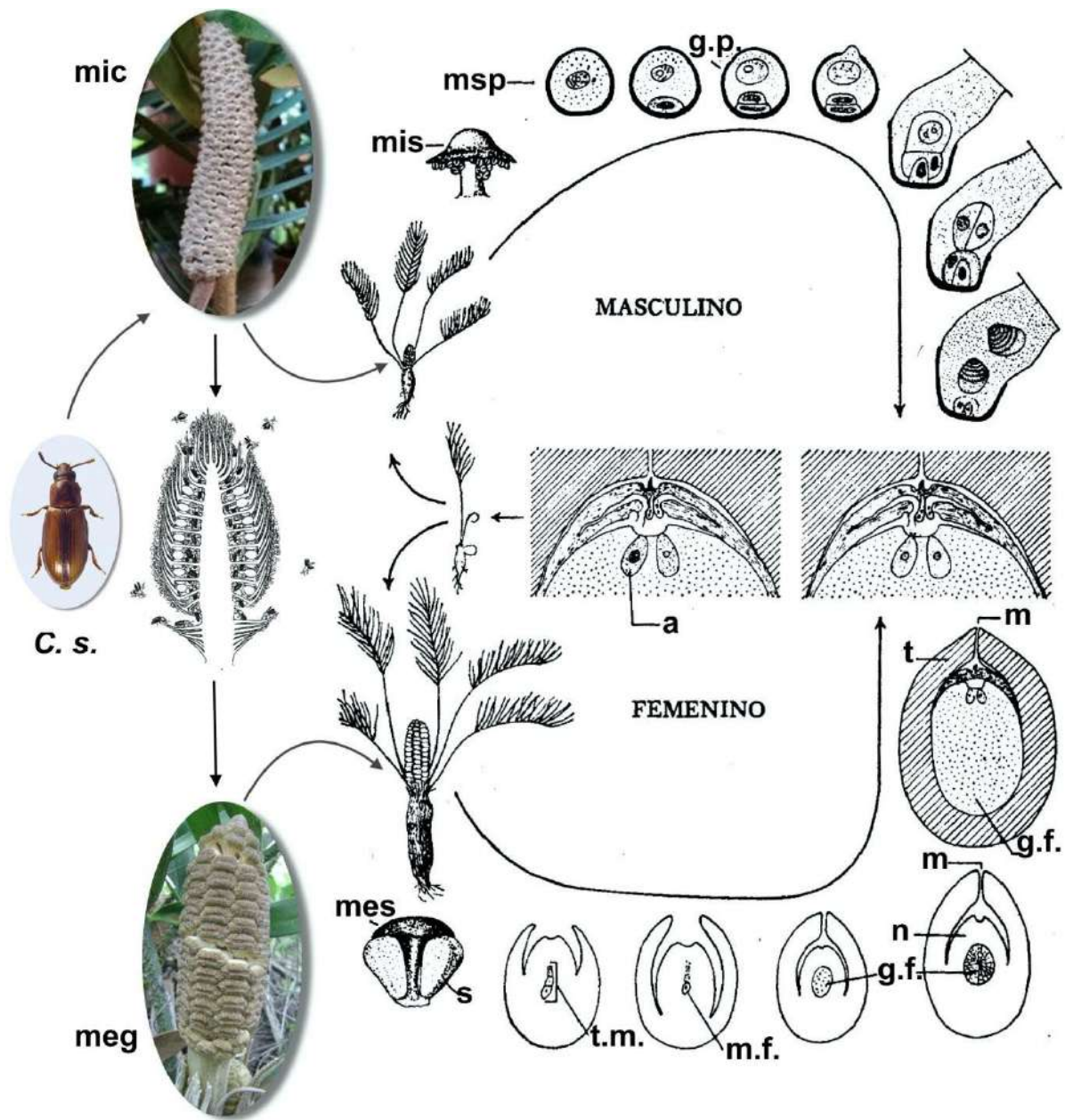


Figura 6. Representación del ciclo reproductor de *Zamia*. a. arquegonio con óvulo fecundado, g.f. gametofito femenino, m.f. megaspora funcional, t. tegumento, m. micrópilo, mes. megasporófila, mis. microsporófila, msp. microspora, n. nucela, g.p. grano de polen, t.m. tétrada de megasporas, s. semilla. meg. megastróbilo, mic. microstóbilo. C. s. *Ceratophila sanchezae*, escarabajo polinizador. Modificado de Cronquist, (1994); Norstog & Stevenson, (1980); Tang et al., (2018).

Ontogenia del óvulo y semilla

Los eventos más sobresalientes en el desarrollo de los óvulos a semillas maduras en las cícadas son los siguientes: iniciación del óvulo, megasporógenesis, megagametofitogénesis, formación de arquegonios, fertilización y embriogenia (Anexos A, B, C)

Iniciación del óvulo

Según Singh & Johri (1972), la posición del estróbilo entre la corona de hojas impide la observación del inicio de su emergencia. Stevenson (1988), en sus intentos por aclarar la ramificación del tallo en las cícadas observó la forma en que se originan los estróbilos, sin determinar el momento en el que comienza la formación de los óvulos. Es cierto, tal como lo mencionan Quisumbing (1925), Chamberlain (1935) y Norstog (1990) entre otros, las primeras etapas del desarrollo de los óvulos no han sido estudiadas con detalle, dada la dificultad de encontrar material en esas etapas.

Los óvulos en las cícadas, por lo general, son sésiles, aunque algunas especies del género *Cycas* presentan un pedicelo corto (Pant, 1973). Stevenson (1990), menciona que los óvulos son pedunculados en el género *Dioon* durante las primeras etapas de desarrollo. En contraste, el género *Stangeria* presenta óvulos parcialmente envueltos por tejido estéril de la megasporófila.

Los óvulos en *Zamiaceae*, son ortótropos, invertidos y están orientados con el micrópilo dirigido hacia el eje central del estróbilo; sólo presentan un tegumento (Chamberlain, 1935). El tamaño de los óvulos varía desde 70 mm en algunas especies de *Cycas* y *Macrozamia* hasta tamaños de 5 mm en *Zamia pygmaea* (Chamberlain, 1919). En todos los géneros de *Zamiaceae* emergen dos óvulos sobre la superficie abaxial de la megasporófila (Pant, 1973; Stevenson, 1990).

El óvulo en las etapas iniciales, presenta la nucela o megasporangio como una masa central blanca rodeado por cutícula y protegido por un solo tegumento (Figura 7). En las cícadas, el tejido nucelar muestra poca diferenciación interna; sin embargo, en etapas avanzadas aparece una hilera central de células alargadas con citoplasma escaso (Chamberlain, 1935; De Sloover, 1964; Singh & Johri, 1972; Meeuse, 1974). Al

mismo tiempo, se forma la cámara polínica, consistente en una depresión apical en la nucela, rodeada por una protuberancia igual de tejido nucelar (Chamberlain, 1935; Singh & Johri, 1972; Meeuse & Bouman, 1974).

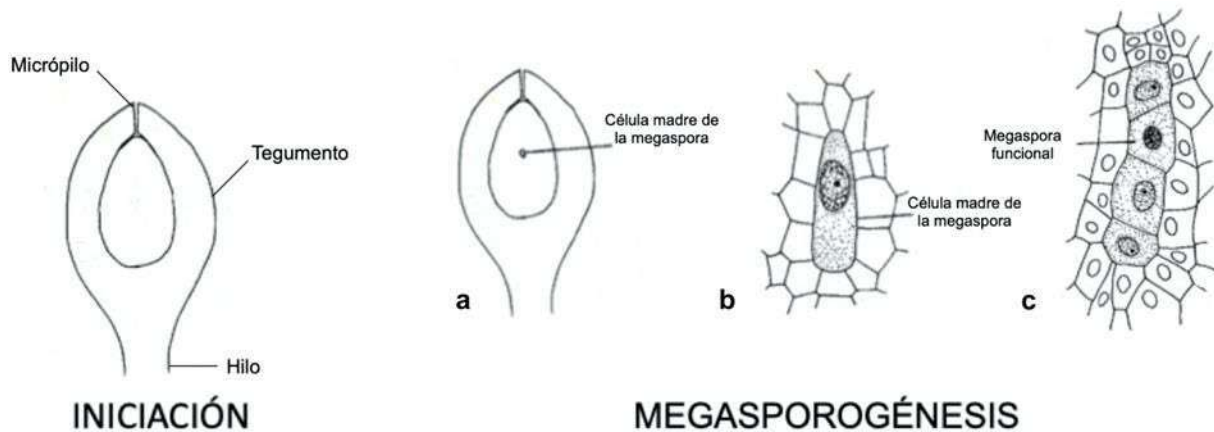


Figura 7. Representación de las etapas iniciales de la ontogenia del óvulo a semilla. Iniciación, partes del óvulo. Megasporogénesis, a) diferenciación de la célula megaspora, b) crecimiento de la megaspora, c) tétrada de megasporas. Modificado de Scagel et al., (1980).

Megasporogénesis

El conocimiento de los detalles de la megasporogénesis en las cícadas es escaso y contradictorio. Se tiene información de aspectos de la megasporogénesis en *Zamia floridana* (Smith, 1910) y de la diferenciación de la célula madre de la megaspora dentro de la nucela en los reportes de Chamberlain (1935), Erdtman (1965) y Singh & Johri (1972). Ellos señalaron que la diferenciación de la célula madre de la megaspora consiste en un aumento de tamaño, forma alargada y pared conspicua. En *Encephalartos poggei*, la pared de la célula madre de la megaspora consta de calosa, la cual forma una cápsula. La cápsula está relacionada con la formación de las paredes transversales entre las células resultantes de la meiosis, es decir, de las megasporas. La cápsula se desorganiza durante el alargamiento de la megaspora funcional (De Sloover, 1961).

Smith (1910) informó que, de una tétrada en *Z. floridana*, las tres megasporas que están orientadas hacia el extremo micropilar se desorganizan, y la calazal se alarga y origina al gametofito femenino. Maheswari & Singh (1967) han descrito hileras de tres

células en algunos otros géneros de cícadas. De Sloover (1961) consignó en *Zamia* sólo dos megasporas. Todas las observaciones coinciden en que la megaspora calazal es la funcional (Figura 7).

Megagametofitogénesis

La megaspora funcional aumenta de tamaño e inicia una serie de cariocinesis sincronizadas, que constituye el estado de núcleos libres o cenocítico del gametofito femenino (Chamberlain, 1935) (Figura 8-a). Chamberlain (1935), mencionó que alrededor de 1,000 núcleos libres en *D. edule*, y De Sloover (1964), más de 3,000 en *Encephalartos poggei*.

Los numerosos núcleos que se forman durante la etapa de núcleos libres empiezan a organizarse hacia la periferia dentro de la pared de la megaspora. Además, se forma una gran vacuola central (Figura 8-b).

Posterior a la etapa de núcleos libres, ocurre la megagametofitogénesis, sucesivamente se forma el gametofito celular, el arquegonio y la ovocélula. Después de la fecundación, el embrión se aloja dentro del megagametofito vegetativo que está constituido por parénquima de almacenamiento que contiene almidón, lípidos, proteínas y otros polisacáridos. El gametofito vegetativo permanece durante la germinación y el desarrollo de la plántula en sus primeros tres años, tanto en cícadas como en otras gimnospermas (Favre-Duchartre, 1957; Singh, 1978; Sánchez-Tinoco et al., 2000).

Con excepción de *Gnetum* y *Welwitschia*, Maheshwari y Singh (1967), describieron las primeras etapas de la megagametofitogénesis en las gimnospermas, mencionan que existe un patrón uniforme que consistente en: (i) numerosas divisiones nucleares sincrónicas, siendo el número resultante de núcleos libres constante para algunas especies (Favre-Duchartre, 1957); (ii) una gran vacuola central en el joven gametofito (Chamberlain, 1935); y (iii) formación de paredes anticlinales dispuestas en dirección centrípeta que cuando se completan, dan la apariencia de un panal al joven gametofito. Cada cavidad del panal es un alvéolo (Maheshwari & Singh, 1967; Singh, 1978). En los alvéolos, los núcleos se disponen en la periferia y mediante repetidas divisiones periclinales forman hileras de células dispuestas en rayos desde el centro

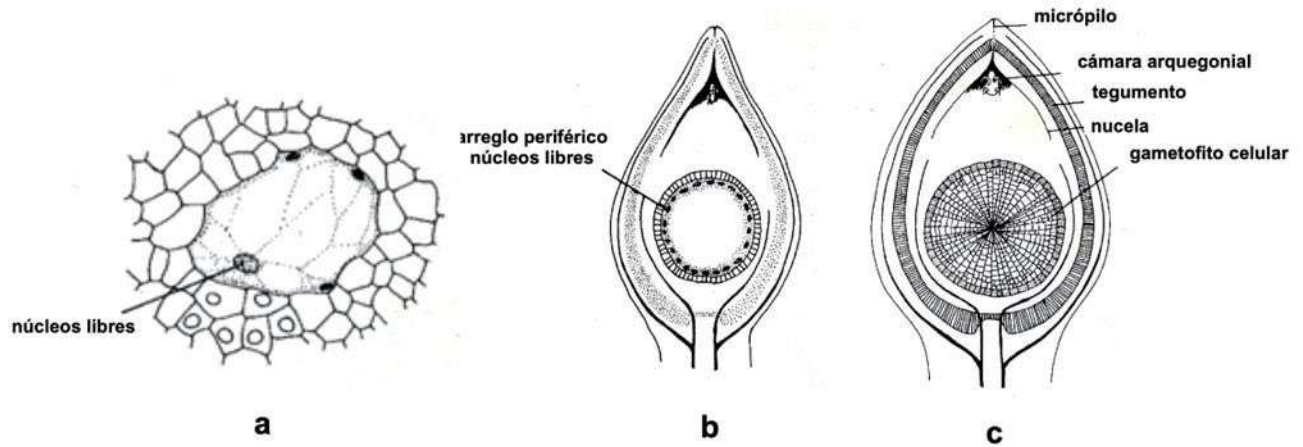
hacia la periferia. Los alveolos según Mauseth (1988), son el resultado de la formación de paredes periféricas que forman cajas abiertas se orientan en radios hacia la vacuola central. La alveolación es un proceso controvertido debido a que no se describieron en los trabajos de Chamberlain (1906, 1935) y Coulter & Chamberlain (1910).

Posteriormente, mediante divisiones irregulares, se forma el gametofito celular (De Sloover, 1963) (Figura 8-c). Una vez completada la celularización, se produce la diferenciación celular a nivel micropilar, iniciándose el desarrollo de los arquegonios (Chamberlain, 1919, 1935; Maheshwari & Singh, 1967).

El citoplasma comienza a dividirse (citocinesis) por la formación de paredes en dirección centrípeta, hasta encerrar todos los núcleos, así se forma el gametofito celular, que después funcionará como tejido nutritivo para el desarrollo del embrión (Sporne, 1965; Singh & Johri, 1972).

Norstog (1990) menciona que el desarrollo del gametofito celular requiere de cinco a seis meses hasta la madurez sexual, más no refiere a partir de qué etapa del desarrollo ni los taxa en los que observó este proceso.

MEGAGAMETOFITOGÉNESIS



FORMACIÓN DEL GAMETOFITO VEGETATIVO

Figura 8. Representación de las etapas iniciales de la megagametofitogénesis. Formación del gametofito vegetativo. a) primeras divisiones celulares, b) arreglo periférico de los núcleos, c) formación de paredes. Modificado de Scigel et al., (1980).

Arquegonios

Al celularizarse el gametofito femenino, algunas células de la superficie micropilar se diferencian como células iniciales de los arquegonios (Figura 9-a). En la mayoría de las cícadas el número de arquegonios que alcanzan la madurez varía de dos a seis; se localizan hacia el extremo micropilar y a veces en la parte media lateral del óvulo (Maheswari & Singh, 1967; Norstog 1990). *Microcycas* presenta varios cientos de arquegonios, que se extienden dentro del gametofito y abarcan un tercio de su volumen, no todos alcanzan su madurez funcional (Norstog, 1990).

Los arquegonios, por lo general, están constituidos de inicio por un par de células del cuello que sobresalen dentro de una depresión circular, llamada cámara arquegonial, localizada entre el gametofito y la nucela libre (Chamberlain, 1935; Norstog, 1990).

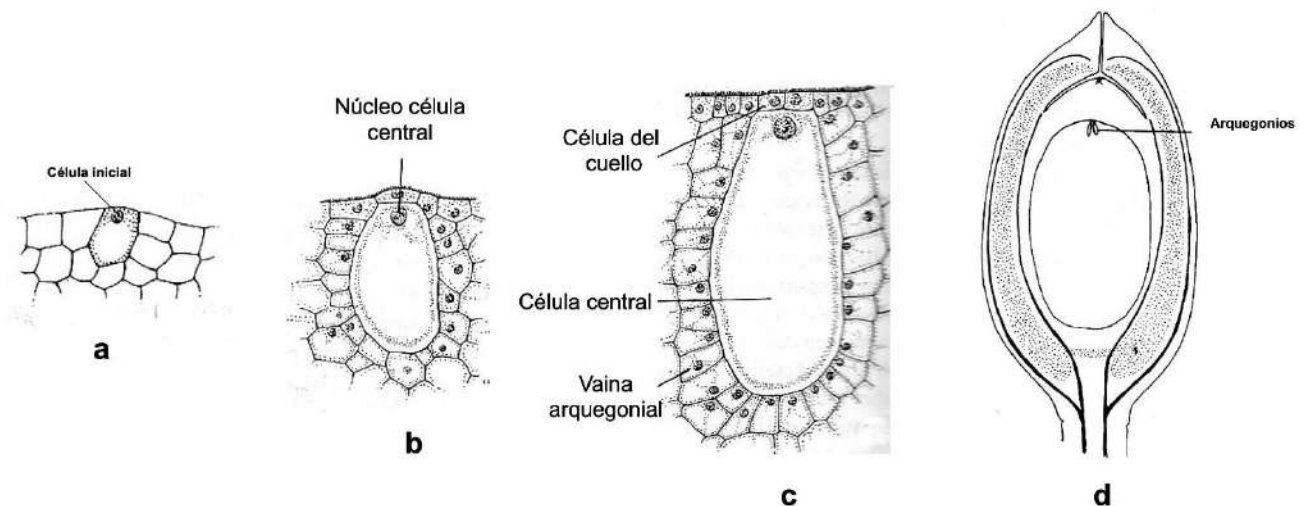
La ontogenia del arquegonio fue observada en *D. edule* por Chamberlain (1919, 1935). Comienza con una división periclinal desigual de la célula arquegonial inicial, que forma una célula micropilar de tamaño menor, la célula inicial del cuello; y otra célula de mayor tamaño o célula central que formará el resto del arquegonio (Figura 9-b).

La célula inicial del cuello forma las dos células del cuello mediante una división anticlinal, al mismo tiempo, la célula central aumenta de tamaño y se vuelve vacuolada (Figura 9-c).

Previo a la fecundación, el núcleo de la célula central se divide y forma dos núcleos de diferente tamaño. El pequeño es el núcleo de la célula ventral del canal y el grande es el núcleo de la ovocélula; no se forma pared entre ambos núcleos. Así es como se diferencia la ovocélula. Las células del gametofito vegetativo adyacentes a la ovocélula forman una envoltura uniestratificada que se ha llamado vaina arquegonial. Sobre su función, se plantea la posibilidad de que intervenga en la translocación de materiales nutritivos del gametofito vegetativo al arquegonio, al respecto se requieren estudios fisiológicos específicos. El núcleo ventral del canal se desorganiza con rapidez, mientras tanto el núcleo de la ovocélula migra hacia el ecuador, adquiriendo un gran tamaño y alcanza hasta 0.5 mm de diámetro. Maheswari & Singh (1967), señalan que la ovocélula en las cícadas es quizá la célula más grande en el reino vegetal.

Cuando el arquegonio está maduro y listo para la fertilización, posee dos células del cuello, un núcleo ventral del canal y un núcleo de la ovocélula (Figura 9-d). Además, el citoplasma de la ovocélula pierde su aspecto vacuolado, y la nucela que se encuentra entre la cámara polínica y la cámara arquegonial se disgrega para formar un paso continuo. Así está preparado el arquegonio para su fecundación (Chamberlain, 1919, 1935).

MEGAGAMETOFITOGÉNESIS



ONTOGENIA DEL ARQUEGONIO

(GAMETOFITO REPRODUCTOR)

Figura 9. Representación de la ontogenia del arquegonio. a) Diferenciación de la célula inicial del arquegonio. b) División periclinal que origina la célula inicial del cuello y la célula central. c) Formación de las dos células del cuello y crecimiento de la célula central, d) óvulo con arquegonios diferenciados. Modificado de Scagel et al., (1980); Chamberlain (1935).

Fertilización

La fertilización en las cícadas ha llamado la atención desde el descubrimiento de los anterozoides móviles en *Cycas revoluta* (Ikeno, 1896). Son células enormes con diámetro aproximado de 230 μm en *D. edule*, su movilidad se debe a bandas ciliadas ubicadas en la mitad distal (Chamberlain 1909; Norstog 1967).

Webber (1901) & Chamberlain (1909), refieren que dentro del tubo polínico hinchado se han observado dos anterozoides. Cuando el tubo polínico se rompe descarga los dos gametos masculinos junto con su citoplasma al interior de la cámara arquegonial (Figura 10).

Al ocurrir la fertilización, las células del cuello se expanden, se rompe la lámina media de sus paredes y crean un canal arquegonial del cuello, a través del cual los anterozoides pueden pasar y fertilizar el núcleo de la ovocélula. Cuando el anterozoide se encuentra dentro del citoplasma de la ovocélula, la banda de cilios se separa, previo a la fecundación, cerca del cuello del arquegonio se ha observado al anterozoide desprovisto de cilios. El núcleo del anterozoide se fusiona con el núcleo de la ovocélula para formar el cigoto (Norstog, 1972, 1990) (Figura 10).

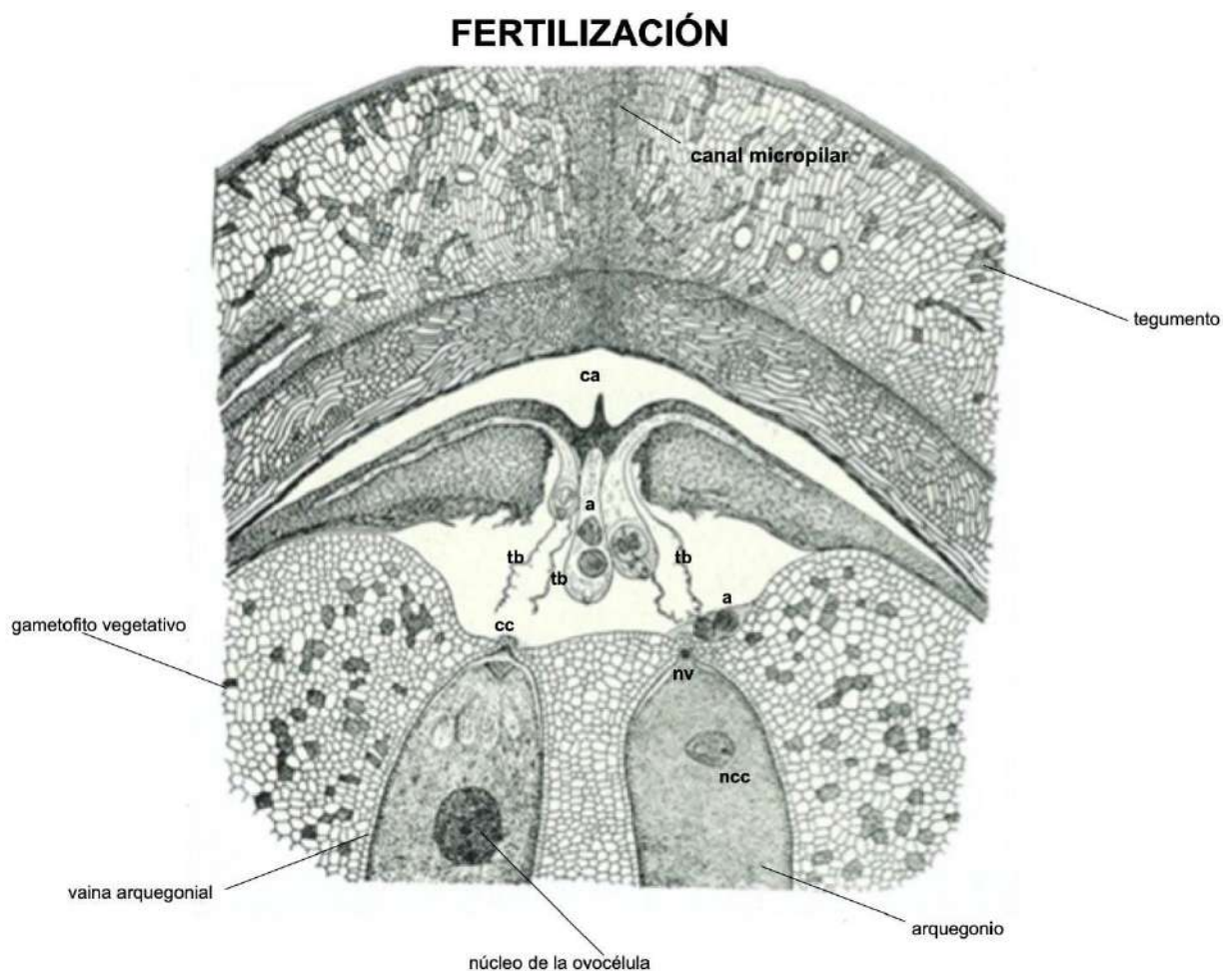


Figura 10. Corte longitudinal del óvulo de *Dioon edule* durante la fertilización. ca. cámara micropilar, tb. tubo polínico, a. anterozoide, cc. células del cuello, nv. núcleo ventral del canal, ncc. núcleo de la célula central. Modificado de Chamberlain (1919).

Embriogénesis

La embriogénesis en las cícadas se conoce para la mayoría de los géneros: *Cycas* (Chamberlain, 1919, 1935, Pant, 1973); *Stangeria* (Chamberlain, 1916); *Dioon* (Chamberlain, 1910); *Ceratozamia* (Chamberlain, 1912); *Zamia* (Coulter & Chamberlain, 1903); *Encephalartos* (De Sloover, 1964); *Macrozamia* (Chamberlain, 1913) y *Bowenia* (Lawson, 1926).

El cigoto después de la fecundación pasa por una etapa de núcleos libres (Figura 11-a). De seis a diez cariocinesis ocurren en el proembrión para dar lugar a un aproximado de 1,024 núcleos libres antes de la formación de las paredes celulares en *D. edule*, *Stangeria paradoxa*, *Encephalartos friderici-guilielmi*, *Cycas circinalis* y *Z. floridana* (Chamberlain, 1910; Dogra, 1992.)

Posteriormente ocurre la formación de paredes y partición del citoplasma (citocinesis). Generalmente comienzan en el extremo calazal del proembrión, y avanzan hacia el extremo micropilar (Figura 11-b). Todos los proembriones tienen dos regiones morfológicas. La primera es el extremo calazal que a su vez formará el cuerpo del embrión. La segunda es el extremo micropilar que presenta citoplasma vacuolado y formará el suspensor (Figura 11-c) (Chamberlain, 1935; Pant, 1973; Dogra 1992).

El extremo calazal da origen a: 1) una zona de intensa actividad meristemática, que formará el eje embrionario y los cotiledones; y 2) una zona de células alargadas arregladas en series verticales, que formarán al gran suspensor típico de los embriones de las cícadas, que alcanzan longitudes de siete a ocho centímetros (Figura 11-c,d) (Dogra, 1992; Sánchez-Tinoco et al., 2018b).

El embrión maduro, por lo general, presenta dos cotiledones (Coulter & Chamberlain, 1910; Norstog, 1990); en *Encephalartos* se han encontrado tres (Saxton, 1910), o puede haber sólo uno, tal como se ha caracterizado en *Ceratozamia* (Worsdell, 1898; Dorety, 1908a, 1908b; Coulter & Chamberlain, 1910).

El embrión de las cícadas presenta una vaina radicular o coleorriza que cubre al meristemo apical de la radícula. El meristemo apical del vástago forma varios primordios de escamas (catáfilos) y es posible que origine el primer primordio de hoja normal (nomófilo) antes que ocurra la germinación (Dorety, 1908a; Chamberlain, 1935; Pant, 1973).

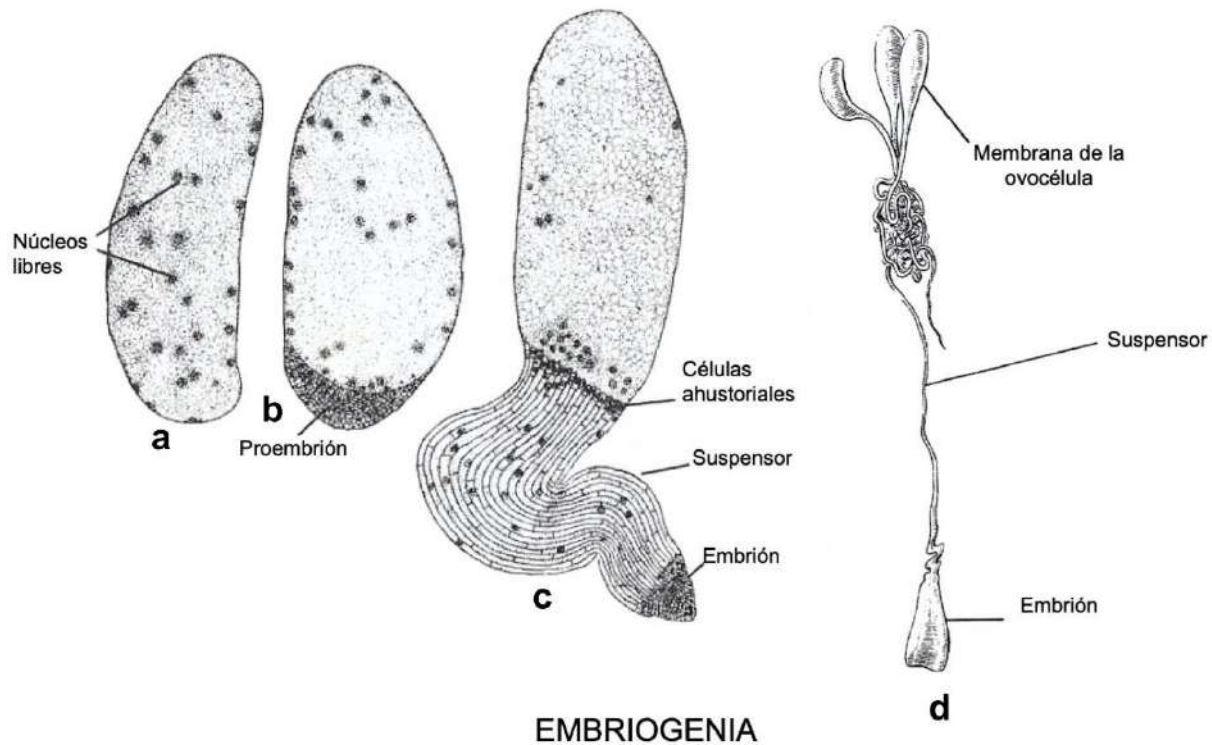


Figura 11. Desarrollo de las primeras etapas del embrión. a. etapa de núcleos libres, b. formación del proembrión, c. desarrollo del suspensor y primeras etapas del cuerpo del embrión, d. embrión joven. Modificado de Scagel et al., (1980); Gifford y Foster (1989).

Localidades de recolecta

La recolecta del material biológico, se dirigió a óvulos, megatróbilos y semillas en diferentes plantas en intervalos de una a doce semanas. Las localidades de muestreo para cada una de las especies se describen a continuación:

Ceratozamia tenuis. Cerro Coacoatzintla, Municipio de Coacoatzintla, Veracruz, a 13 km en línea recta al norte de Xalapa, Veracruz, México. Esta zona se ubica a los 19°39' de latitud Norte y 96°56' de longitud Oeste a una altitud de 1,550 m.s.n.m. La

vegetación corresponde al bosque mesófilo de montaña (Rzedowski, 1978; Gómez-Pompa, 1978) (Figura 13).

Dioon edule. Monte Oscuro, se localiza en el Municipio de Emiliano Zapata en el Estado de Veracruz, México. Se encuentra en las coordenadas 96° 46' 58" de longitud Oeste y 19° 21' 52" latitud Norte a una altitud de 654 m.s.n.m. Su hábitat se inscribe dentro del tipo de vegetación de selva baja caducifolia (Miranda y Hernández, 1963; Rzedowski, 1978) (Figura 14).

Zamia furfuracea. Ejido Punta de Arenas, también conocido como Ciénega del Sur, en el municipio de Alvarado, a 31 km en línea recta al sureste de la ciudad de Alvarado, Veracruz, México. Esta zona se ubica a los 18°69'15" de latitud Norte y 95°52'43" de longitud Oeste a una altitud de 12 m.s.n.m. La vegetación corresponde a dunas costeras (Gómez-Pompa, 1978) (Figura 15).

En estas poblaciones se hicieron recolecciones a intervalos de una a once semanas. Al ocurrir la etapa de dispersión, se recolectaron megatróbilos en proceso de desintegración, así como las semillas. Estos materiales se sembraron en condiciones de jardín para monitorear su desarrollo y, así seguir continuar los muestreos de las etapas ulteriores hasta el desarrollo del cuerpo del embrión. Tanto en el campo como en jardín, los materiales se fijaron después de hacer cortes longitudinales y transversales para facilitar la penetración del fijador FAA compuesto de 37–40% formaldehído, ácido acético glacial, 95% alcohol etílico y agua (10:5:50:35) (Sass, 1958).



Figura 12. Localidad de *C. tenuis*. a. hábito, b. detalles del hábitat, c. localización geográfica (@GoogleEarth).



Figura 13. Localidad de *D. edule*. a. hábito, b. detalles del hábitat, c. localización geográfica (@GoogleEarth).



- 8°69'15" Norte y 95°52'43" Oeste
- Altitud de 12 msnm
- Vegetación de dunas costeras

Figura 14. Localidad de *Z. furfuracea*. a. hábito, b. detalles del hábitat, c. localización geográfica (@GoogleEarth).

CHAPTER I. SALIENT OVULE FEATURES OF *Zamia furfuracea* L. FIL.: EARLY STAGES OF MEGAGAMETOPHYTOGENESIS¹

1.1 ABSTRACT

The anatomy of the megagametophyte of *Zamia furfuracea*, a cycad species with a short reproductive cycle, is described in the first stages of its ontogeny corresponding to the free nuclear and alveolation stages. The way in which the free nuclei are arranged centripetally to later organize themselves into a series of radially elongated hexahedral and short pyramidal trihedral or tetrahedral alveoli, forming rays that converge in the center of the megagametophyte, is noteworthy. In cross section, the hexagon-shaped alveoli together give the megagametophyte the appearance of a honeycomb. A three-layered jacket of transfer cells with dense cytoplasm and prominent nuclei is clearly recognizable and its anatomy is associated with nutrient translation that is compared to a tapetum like jacket. These two stages are continuous and occur within an interval of one week in the summer.

Keywords: Alveoli, Cycadales, Free nuclei, megagametophyte, Ovule, *Zamia*

1.2 INTRODUCTION

The ontogeny of the ovule to seed of an angiosperm, referring to the time that takes place between the ovule initiation until embryo body development, can take month or less. In contrast, in gymnosperms, this process takes between one and three years. (Singh and Johri, 1972). According to Schnarf (1933), Singh (1961, 1978), Dehgan and Johnson (1983), Owens et al. (1997) and Hann-Chung and Yu-Fen (2001), the development cycle is long in temperate climate gymnosperms and short in tropical zones. It determines the time interval in which the different stages of the female reproductive cycle occur, which also are closely related to seasonality. Thus, ovule initiation occurs in

¹ Sánchez-Tinoco, M. Y., Stevenson, D. W., Vovides, A. P., Alejandro, A. L., Hernández-Zárate, G., Iglesias-Andreu, L. G., & Moya, E. G. (2022). Salient ovule features of *Zamia furfuracea* L. fil.: Early stages of megagametophytogenesis. *Flora*, 296, 152-168. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2022.152168>

autumn; megasporogenesis in winter; and pollination in spring upon completion of megasporogenesis. In Cycadales, the free nuclear stage of megagametophytogenesis coincides with pollination and there is an interval that occurs in the summer before fertilization with mature seeds containing an embryo present the following autumn (Singh and Johri, 1972; Norstog and Nicholls, 1997; Sanchez-Tinoco et al., 200). According to and Johri (1972), the development of the ovules within a cone as well as in a population is usually synchronous.

The chronology of ovule and seed development in Zamiaceae has been studied in *Ceratozamia tenuis* (Dyer) D. W. Stev. & Vovides (Vovides et al., 2016), a cloud forest species. Its cycle is completed in two years. During autumn and winter, megasporogenesis and megagametophytogenesis occur. At the end of winter, the gametophyte is in the stage of free nuclei (coenocytic). Cellularization of the gametophyte ends in spring (Sánchez-Tinoco et al., 2000). In contrast, the reproductive cycle of *Zamia furfuracea*, a coastal dune species, develops in one year. Megasporogenesis and megagametophytogenesis occur in summer. The period of cell wall formation or cellularization extends from summer to early autumn (Sánchez-Tinoco et al., 2012; Sánchez-Tinoco et al., 2018). On the other hand, the ovule-to-seed development in *Dioon edule* Lindley, a species from low deciduous forest, has been estimated to take three years (Vovides and Iglesias, 1994).

The initiation of the ovules and the first stages of their development have not been studied in detail in many cycads, due to the difficulty of obtaining reproductive structures or megastrobili in their initial stages (Quisumbing, 1925; Chamberlain, 1935; Norstog, 1990). This is because the megastrobili differentiation takes place within the stem tissue (Stevenson, 2020), and by the time they emerge, a crown of cataphylls and petiole bases tightly surrounds them (Stevenson, 1988).

The classic literature on the first stages of ovule development in cycads dates from the beginning of the 19th century (Coulter and Chamberlain, 1903; Chamberlain, 1906; Smith, 1910). It is fragmented and sometimes contradictory in terms of species studied, morphogenesis, and anatomical descriptions. Histologically, isolated events of the early stages of ovule development such as megasporogenesis or megasporangium ontogeny

and megagametophytogenesis in free nuclear stages, wall formation and archegonium development were described by Chamberlain (1906, 1919, 1935), Smith (1910), DeSloover (1964), Maheshwari and Singh (1967) and Singh, 1978. Their graphic illustrations and descriptions are valuable and provide starting points for more detailed studies on other species. Regarding megagametophytogenesis, it is a process that begins after the differentiation of the functional megaspore within the nucellar tissue. After innumerable karyokineses, further development and differentiation are followed by successive stages that later form the cellular gametophyte, archegonium, egg cell. After fertilization there will be an embryo within the megagametophyte, which supports germination and the seedling in its first years, both in cycads and other gymnosperms (Singh, 1978; Favre-Duchartre, 1957; Sánchez-Tinoco et al., 2000).

With the exception of *Gnetum* and *Welwitschia*, Maheshwari and Singh (1967) described the early stages of megagametophytogenesis in gymnosperms with a uniform pattern consisting of: (i) numerous synchronous nuclear divisions, the resulting number of free nuclei being constant for some species (Favre-Duchartre, 1957); (ii) a large central vacuole in the young gametophyte (Chamberlain, 1935); (iii) formation of anticlinal walls arranged in a centripetal direction that when completed, give the appearance of a honeycomb to the young gametophyte. Each cavity of the honeycomb is an alveolus (Maheshwari and Singh, 1967; Singh, 1978). In the alveoli, the nuclei are arranged in the periphery and by repeated periclinal divisions form rows of cells arranged in rays from the center to the periphery. However, according to Mauseth (1988), alveoli as the result of peripheral wall formations that form open boxes that continue to grow towards the central vacuole is a controversial issue.

Subsequently, by irregular divisions, the cellular gametophyte is formed (De Sloover, 1963). When cellularization is complete, cell differentiation occurs at the micropylar level, initiating the development of the archegonia (Chamberlain, 1919, 1935; Maheshwari and Singh, 1967).

To complement the aforementioned information, we developed the present study whose objective is to describe the anatomy of the ovule of *Zamia furfuracea* L. fil. in the early stages of megagametophyte ontogeny including free nuclei and alveolation.

1.3 MATERIALS AND METHODS

Previous records made in a natural population located in the ejido Ciénega del Sur, Municipality of Alvarado, Veracruz, Mexico, during the years 2004, 2005, 2017 and 2018 allowed the identification of outstanding events of the female reproductive chronology of *Z. furfuracea*. These events correspond to the emergence of megastrobili; free nuclei stage, wall formation, hardening and accumulation of nutrients in the gametophyte, lignification of the sclerotesta, archegonial development, dispersal and development of the suspensor.

These data were used to identify the first stages of megagametophytogenesis. Ovules were collected from plants in reproductive stages from that locality, planted in garden conditions in the city of Xalapa, Veracruz, Mexico, with annual repetitions in the month of June during the years 2020 to 2022. The ovules were collected when 1/3 of the length of the megastrobilus had emerged (Figure 1.1 A). Transverse sections of the megastrobilus (Figure 1.1 B) as well as some ovules were fixed in 37–40% formaldehyde, glacial acetic acid, 95% ethyl alcohol and water (10:5:50:35) (FAA) (Sass, 1958). These sections were washed repeatedly in the laboratory and preserved in glycerin, 96% ethyl alcohol and water (25:50:25) (GAA) (Engleman, *pers. com.*) and then measured under a calibrated stereomicroscope.

Some ovules were sectioned longitudinally while fresh, using razor blades, a technique that facilitates obtaining cutting fresh soft tissues. The thickness of these sectioned ranged from 10 µm at the edges of the cut to 100 µm in the thickest part. The ovules from the GAA were washed in running water and then embedded in wax. Serial sections were obtained in the longitudinal and transverse planes at 12 µm and 14 µm thickness using a rotary microtome, and stained with Safranin-Fast Green (Sass, 1958). The sections were studied under an Axiolab 5 Zeiss photomicroscope and image capture with Axiocam 208 color Zeiss and edited with Zen 3.2 software (blue edition).

1.4 RESULTS

The free nuclei and alveolation stages in the ovules described here for *Zamia furfuracea* occur in the third and fourth week of June. The free nuclear stage was present

during the third week when 1/3 of the megastrobilus had emerged (Figure 1.1 A) and measured on average 2–4 cm long and 1.5–2 cm in diameter. The alveolar stage was present during the fourth week when the ovulate strobilus had completely emerged with a peduncle 5–7 cm in length and 3–4 cm in diameter. The ovules, with a whitish integument, measured 2.0–4.0 mm in diameter and 4.0–5.0 mm in length (Figure 1B, C). Longitudinal sections of the integument had mucilage channels with diameters ranging between 30 and 70 μm (Figure 1.3 D). The integument is adnate to the nucellar tissue for approximately two-thirds of the length of the ovule (Figures 1.2 B, 1.3 B, D).

For both stages, the megastrobili had tightly packed megasporophylls (Figure 1.1 A, B). The ovules were orthotropous, unitegmic (Figure 1.2 B) and the micropyle was oriented towards the megastrobilus axis (Figure 1.1 B) with an already differentiated micropylar canal (Figure 1.2 C).

1.4.1 Free nucleus stage

During the third week in June, the micropylar channel is 243 μm longitudinally and 88 μm in diameter (Figure 1.2 C). Externally, covering the integument there is a thin cuticle of 1.2 μm thick that covers a layer of superficially and anticlinally elongated cells (28 μm anticlinally and 14 μm periclinally). The cuticle extends into the integument and covers the nucellus. The nucellar tissue is formed by flattened cells surrounding the gametophyte each measuring 29 μm periclinally and 20 μm anticlinally with prominent nuclei (8 μm). Tannin cells (each 35 μm periclinally and 14 μm anticlinally) surround the micropylar channel and are seen as amber amorphous bodies containing precipitated particles (Figure 1.2 B, C). A wide pachychalaza is observed as a result of the adnation of the nucellus and the integument for approximately 1/3 of the length of the ovule (Figures. 1.2B, 1.3 B, D).

In longitudinal sections, the nucellar tissue towards the micropylar end elongates forming a nucellar beak (Figure 1.2 C). In the central region, the megagametophyte, measuring approximately 700 μm anticlinally and 510 μm periclinally, is bounded by the megaspore wall 2 μm thick. At this time, free nuclear stage of megagametophytogenesis is taking place. There are three types of nuclei inside the young megagametophyte: 1) those that are more centrally placed in a coenocytic complex, 2) others that have

presumably migrated towards the periphery, and 3) those nuclei that are organized centripetally towards the periphery forming rows adjacent to the wall of the megaspore. That latter contained up to six nuclei on average in a row, each nucleus measuring 8–9 μm diameter (Figure 1.2 D).



Figure 1.1. *Zamia furfuracea*. A. Megastrobilus emerging in June. B. Cross section of megasporophyll showing two ovules each with a young megagametophyte (arrows) per megasporophyll. C. Ovule with whitish-yellowish sarcotesta.

1.4.2 Alveolation stage

One week after the free nuclear stage, when the size of the ovules has increased by 1 mm on average, the micropylar channel measures 353 μm in length and 94 μm in diameter and the megagametophyte has increased in size to 1.87 mm periclinally and 1.52 mm anticlinally. Longitudinal and transverse sections show 12 μm nuclei located at the periphery underlying the megaspore wall whose thickness averages 2 μm (Figure 1.3

F, G, I). There are six-sided polyhedric, hexahedral elongated cells or alveoli each with peripheral nucleus and radially elongated to 174 μm anticlinally and 92 μm periclinally; several elongated alveoli form rays that measure on average 750 μm (Figure 1.3 B, C, D, G). Also, there are other short pyramidal trihedral or tetrahedral alveoli formed by angular anticlinal walls that are formed at short distances that gives them the pyramidal shape measuring 40 μm . In cross section, each side of the hexahedral alveoli is 35 μm on average (Figure 1.3 I, J). The hexagonal shape of the alveoli at this stage gives a honeycomb-like appearance to the megagametophyte in cross section (Figure 1.3 J), which is surrounded by three layers of transfer cells with a dense cytoplasm and prominent nuclei (15 μm). This constitutes a jacket that is surrounded by tangentially elongated nucellus cells (100 μm and 20 μm) and these cells can become compacted in places (Figure 1.3 I).

1.5 DISCUSSION

The relation between the duration of a short reproductive cycle and the different stages of its ontogeny, in a warm climate cycad species such as *Z. furfuracea*, facilitates the finding and description of the stages sequentially; in this case the free nuclear stage and the alveolation stage in the megagametophyte. This is a short process that takes about a week to complete. In contrast, it has taken several years of observation and repetition of collections even after considering previous studies regarding the reproductive chronology for *Z. furfuracea* (Sánchez-Tinoco et al., 2012, 2018).

1.5.1 Free nuclei stage

The arrangement pattern of centripetal nuclei within the megaspore wall described for cycads by Chamberlain (1906), Coulter and Chamberlain (1903), Lawson (1926), De Sloover (1963), Singh (1978), Maheshwari and Singh (1967) (Figure 1.2 A), is confirmed in the present research. Even though there is no information of the species studied when they refer to cycads, what is described here adds information in agreement with what Maheshwari and Singh (1967) refer to as a fairly uniform pattern in the ontogeny of the

megagametophyte in its early stages. Here it was possible to observe the migration of nuclei from the center to the periphery, with some nuclei in mitosis, resulting the consequent arrangement of nuclei rows (Figure 1.2 D).

1.5.2 Alveolation stage

Schnarf (1933) described two types of alveoli, "true and false", which was later considered a misinterpretation by Maheshwari and Singh (1967) and Singh (1978). Maheshwari and Singh (1967) showed schemes of alveolation, based on previous surveys of some species within the gymnosperms. They also clarified the way in which at the end of the free nuclear stage, when the peripheral arrangement of the nuclei occurs, each nucleus is connected to six adjacent nuclei by microtubules, which subsequently, by anticlinal divisions of the wall in a centripetal direction, result in elongated six-sided cells or alveoli. With respect to cycads, De Sloover (1964) reported the occurrence of alveoli in *Encephalartos poggei* Asch. His descriptions show that they are open internally, that the nuclei are located on the open inner face and as they grow are elongated. He also described "pyramidal cells" formed by the precocious closure of walls.

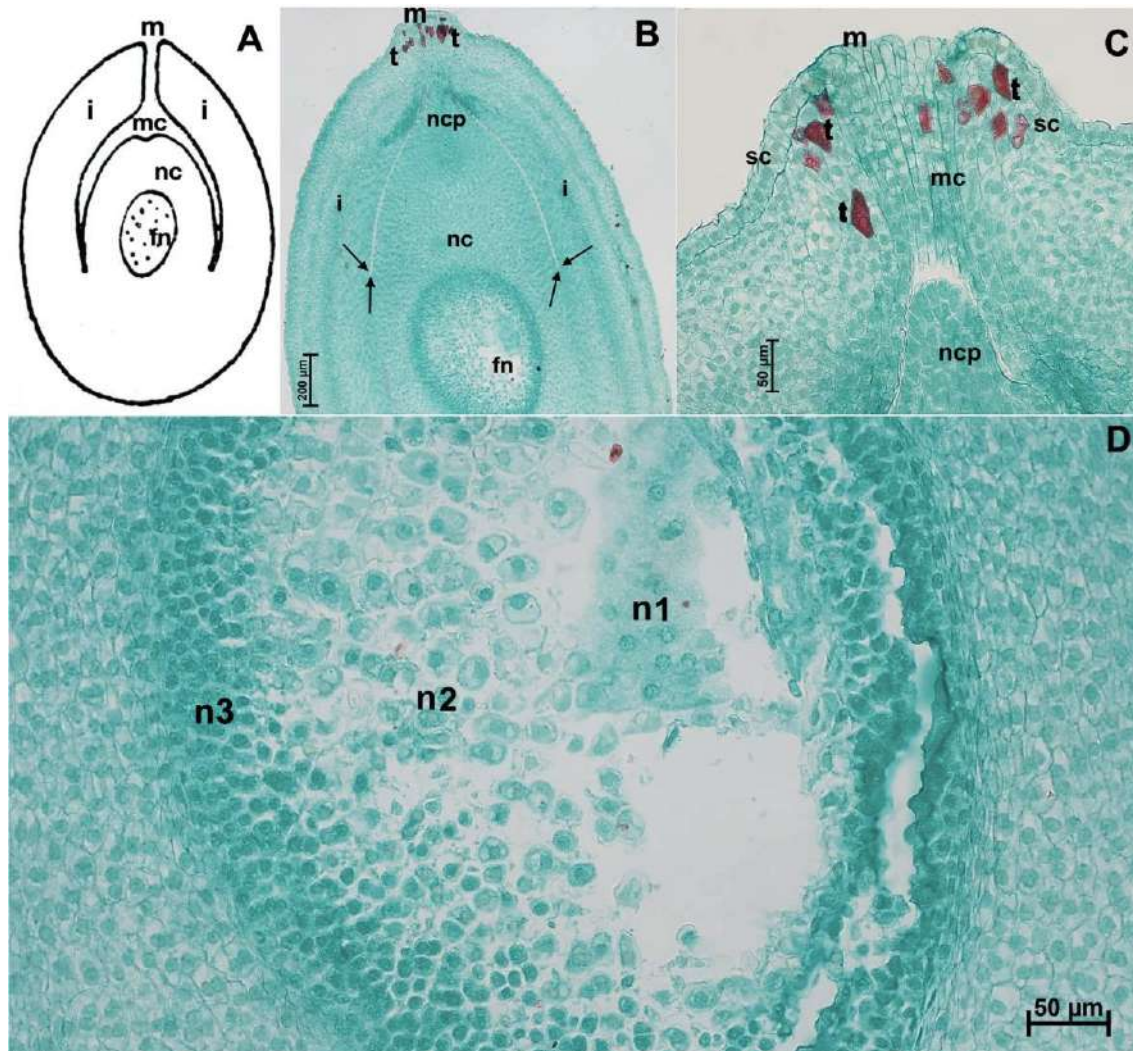


Figure 1.2. A. Schematic representation of ovule showing the formation of the female gametophyte (Modified from Chamberlain; 1919). B-D. *Zamia furfuracea*. B. Longitudinal section of the ovule during the free nuclei stage in the third week of June. C. Longitudinal section of the ovule micropylar end. D. Longitudinal section of the gametophyte in free nuclei stage stained with Safranin-Fast Green. Abbreviations: fn, free nuclei inside the young gametophyte; i, integument; m, micropyle; mc, micropylar channel; n1, nuclei in the coenocytic matrix; n2, nuclei migrating to the periphery; n3, nuclei forming files; nc, megasporangium or nucellus; ncp, nucellar beak; t, tannins as amorphous solid bodies. Arrows delimit the pachychalaza (fusion of tegument and nucellus).

For the free nuclear stage, DeSloover (1964) describes in detail the different layers of the megaspore membrane that encloses the gametophyte both in its free nuclear stage and during alveolation. Although as in several studies related to ovule ontogeny, it is emphasized that observations are needed with more detailed information, particularly on the early stages of megagametophytogenesis in cycads. The works of Swamy (1948), De

Silva & Tambiah (1952) and Rao (1961), although contributing greatly to the knowledge of embryology, do not provide information on the development of the young gametophyte of cycads.

Fortunately, for anatomists studying cycads, the large size of most cells in cycad tissues allows histological studies in some cases without resorting to ultrastructural methods, simple microtome knife cuts or hand sections being the classical techniques used in the present investigation. From longitudinal sections made with razor blades on fresh ovules (Figure 1.3 B, C), the nuclei are described resting on the periphery of elongated hexahedral cells (alveoli) that form radial rows converging towards the center. In cross section, six sides are distinguished (Figure 1.3 J) and the hexagonal alveoli simulate the cavities of a honeycomb (Figure 1.3 H), as depicted by Maheswari & Singh (1967).

In some sections, it was possible to follow the sequences of wall formation. Some walls close anticlinally forming angles that end at short distances and described here as short pyramidal trihedrons or tetrahedron alveoli as named by DeSloover (1964) and referred to Favre-Duchartre (1957) and Maheswari & Singh (1967) as pyramidal cells (Figure 1.3 E, G). As shown in Figure 1.3 A, both types of short pyramidal and long polyhedral alveoli together confer the structure described by Sokolowa (1890).

The three strata of cells with dense cytoplasm and conspicuous nuclei described here are characteristic of transfer cells as defined by Esau (1982). That is, parenchyma cells with wall invaginations that increase the surface area of the plasmalemma, specialized in short-distance solute translocation.

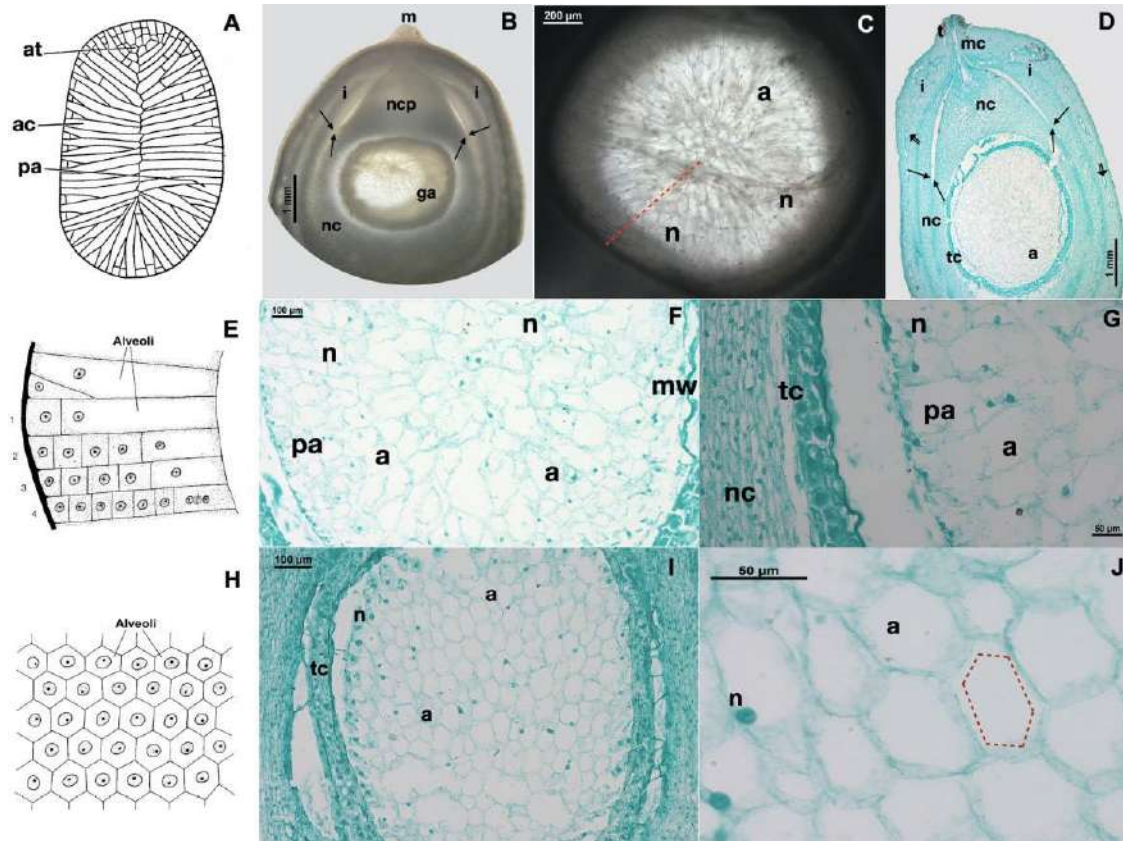


Figure 1.3. A. Schematic representation of complete alveolation in an ovule of *Pinus sylvestris*, (Modified from Maheswari & Singh, 1966). B-D. *Z. furfuracea*. B. Thick longitudinal section of young ovule in the alveolation stage in the fourth week of June. Free-hand section. C. Thick longitudinal section of the young gametophyte showing radii of alveoli (dotted line represents radius). Free-hand section. D. Longitudinal section of the ovule during alveolation. E. Schematic representation of the alveolar partition sequence; precociously formed “pyramidal cell” in *Ginkgo biloba* (Modified from Favre-Duchartre, 1957), F. Longitudinal section of the gametophyte during alveolation showing alveoli in radial files in *Z. furfuracea*. G. Magnification of the alveolar gametophyte boundaries in longitudinal section, showing elongated hexahedral and pyramidal trihedral or tetrahedral alveoli in *Z. furfuracea*. H. Schematic representation of alveoli in cross section in *Ephedra helvetica* with the hexagon sides shown (modified from Maheswari & Sing, 1966). I-J *Z. furfuracea*. I. Cross section of the young gametophyte during alveolation, the sides of the alveoli show the honeycomb shape. J. Greater magnification of the hexahedral alveoli in cross-section the faces of the alveoli show the hexagonal shape (hexagon in dotted lines). Fast Green staining. Abbreviations: a, alveolus; ac, alveolus reaching the center; at, alveolus in cross section; ga, gametophyte; i, integument; m, micropyle; mc, micropylar channel; mw, megaspore wall; n, nucleus; nc, nucellus; ncp, nucellar beak; pa, pyramidal alveolus; t, tannins; tc, transfer cells. Arrows, limits of the pachychalaza (fusion of tegument and nucellus): Bold arrows, mucilage channels.

The observations that these strata were differentiated during alveolation from among the nucellar tissue forming a jacket is comparable to the archegonial jacket whose

cellular characteristics are similar. The participation of both in the nutrition of the young developing gametophyte seems probable. It is comparable to the description of DeSloover (1964) that refers to two layers of cells forming a kind of tapetum jacket that nourishes the gametophyte. The structure of the ovule in these two stages reveals that as the development of the megagametophyte progresses, the cells of the megasporangium or nucellus surrounding it become more compact, giving signs of its future reduction to a papyraceous layer when the megagametophyte continues to enlarge, the archegonium matures and the embryo develops. In the same way, the nucellar beak is reduced as the megagametophyte increases in size. This is not the case for the fusion between the nucellus and integument by more than two-thirds of its length, named by Sánchez-Tinoco & Engleman (2004) and Sánchez-Tinoco et al. (2007) as pachychalaza in mature ovules and seeds; pachychalaza is a term introduced by Corner (1976, 1992) for dicotyledonous angiosperms, which refers to the vascularized zone of the chalazal end of the ovule where there is no difference between the nucellar tissue and the integument (Sánchez-Tinoco et al., 2007; Zumajo-Cardona et al., 2021). Both structures are presumably, congenitally fused. The stages described here, for ovules in their early stages and the newly emergence of the megastrobili, the expression of this adnation tends to clarify the congenital nature of the fusion.

1.6 CONCLUSION

The anatomical description of these two early stages in the development of the megagametophyte allows us to understand how the young gametophyte will later constitute a cellular structure that through cellular differentiation will give rise to the archegonia and the storage tissue for a developing embryo. The stages of free nuclei and alveolation are sequential events that in a short reproductive cycle species such as *Z. furfuracea* are rapid, taking only one week. During the free nuclear stage, nuclei are distinguished within the coenocyte as migrating towards the periphery and arranged in files towards the periphery. These later organize and form radial series of alveoli. Both elongated hexahedrons and short pyramidal trihedrons or tetrahedrons alveoli form radial series. The hexahedral alveoli give the gametophyte the appearance of a honeycomb in cross section. In longitudinal section, the short pyramidal alveoli are triangular in shape. Sheathing the young gametophyte, three layers of transfer cells differentiate during

alveolation, constituting a kind of jacket comparable to the archegonial jacket associated with nutrient translocation from the nucellus.

CHAPTER II. LATE STAGES OF MEGAGAMETOPHYTOGENESIS: ARCHEGONIA DEVELOPMENT IN ZAMIACEAE²

2.1 ABSTRACT

The anatomy of the neck cells and the structure of the archegonium during the central cell growth stage, a stage in the ontogeny of the archegonium that occurs before fertilization in *Ceratozamia tenuis* and *Zamia furfuracea*, is described and compared. Two neck cells are reported for both species with anatomical features suggesting their participation in fertilization. It is postulated that this stage characterized by a profuse vacuolated cytoplasm from which a large central vacuole is prominent plays an important role in pushing the huge nucleus with conspicuous smaller vacuoles of the central cell towards the micropylar region, in the direction of the archegonial chamber, then presses and pushes the two globose neck cells with their respective subtending surface cells, towards the archegonial chamber. There are no significant differences between the structure of these structural complexes in the two species studied.

Keywords: Archegonium, Central cell growth, Central vacuole, Globose cells, Neck cells

2.2 INTRODUCTION

Owing to their long evolutionary history, cycads have important features enabling the study of seed plant evolution (Norstog, 1972; Brenner et al., 2003). Among the ancestral characteristics, the presence of archegonia is an important feature of the ovule, with a decisive role in the evolution of plant life considering that the seed habit represented the liberation of fertilization from dependence of free water as occurs in the lower forms, the case of Cryptogams; since archegonia are enclosed within the seed.

The archegonia constitute the reproductive part of the megagametophyte where at the end of ontogeny the egg cell, female reproductive cell or gamete is positioned.

² Sánchez-Tinoco, M. Y., Stevenson, D. W., Vovides, A. P., Alejandro, A. L., Iglesias-Andreu, L. G., Moya, E. G. & Hernández-Zárata, G. Late stages of Megagametophytogenesis: Archegonia Development in Zamiaceae. *Flora*. Submitted for publication.

Studies on *Ceratozamia tenuis* (Dyer) D. W. Stev. & Vovides, *Dioon edule* Lindley, *Encephalartos poggei* Asch., *Zamia integrifolia* Ait., *Z. amblyphyllidia* D. W. Stev and *Z. furfuracea* L. fil., Sanchez-Tinoco et al. (2022), Maheswari and Singh (1967), DeSloover (1963), Norstog 1972, Zhang (2019), have provided relevant information in understanding some stages of megagametophytogenesis in cycads, complementing Chamberlain's valuable contribution to their reproductive biology. With that information, it is postulated that megagametophytogenesis, begins with the first nuclear division of the functional megaspore. Thereafter numerous karyokinesis events results in the free nuclei stage, formation of alveoli, and consequent cellularization through the formation of irregular walls. These stages correspond to the formation of the vegetative female gametophyte. Subsequently, the development of the reproductive part of the megagametophyte or archegonium occurs. Archegonia according to Chamberlain's (1906, 1910, 1935; Coulter & Chamberlain, 1910) scheme are initiated by the differentiation of a cell from the micropylar end of the vegetative cell gametophyte; however, Chamberlain did not study the alveolation process as later described by Maheswari and Singh (1967), Singh and Johri (1972), Sánchez-Tinoco et al. (2022). As described by Singh and Johri (1972), the differentiation of the archegonia is initiated from some undivided and closed alveoli, situated at the micropylar end. The rest of the alveoli undergo a series of periclinal divisions so that the megagametophyte appears to be formed of a row of radiating cells (Sánchez-Tinoco, et al., 2022). This arrangement of radial series of cells becomes lost in the mature gametophyte due to the formation of new walls in irregular directions (Sánchez-Tinoco, et al., 2022).

The archegonium primordium originating from the differentiation of an alveolus of the closed micropylar end, through a first irregular periclinal division, gives rise to a large cell called central cell and another small cell or initial neck cell, which later, through an anticlinal division forms two neck cells (Figure 2.1 A, B). The central cell is so named because it enlarges rapidly in its location. Its growth is the result of the expansion of a large central vacuole that pushes the cytoplasm towards the cell walls, so that its size is a product of cytoplasmic content but rather to the volume of the large vacuole (Chamberlain, 1906; Coulter & Chamberlain, 1910; Norstog & Nicholls, 1997) (Figure 2.1 C, D). Chamberlain (1906), defined this stage in the ontogeny of the archegonium, as the

stage of growth of the central cell, which is also characterized by smaller cells towards the periphery, a large nucleus of the central cell, two differentiated neck cells, surrounded by a layer of transfer cells. Together they form the archegonial jacket and shortly before fertilization the nucleus of the central cell divides giving rise to both the nucleus of the ovule and the ventral canal. No cell wall is formed between the two nuclei (Gifford & Foster, 1989). The ventral canal nucleus is located near the neck of the archegonium and soon becomes disorganized, while the nucleus of the egg cell is directed towards the center and enlarges. Chamberlain (1906, 1935) and Coulter & Chamberlain (1910) reported that this stage may take up to six months in *D. edule* before the nucleus divides to form the ventral canal nucleus and the nucleus of the egg cell.

Thus, the archegonium consists of a group of cells and nuclei, from which a single functional gamete known as an egg cell is formed (Foster and Gifford, 1974). According to Norstog and Nicholls (1997), the number of neck cells is somewhat controversial, in the archegonium of the genera *Cycas*, *Ceratozamia*, *Encephalartos*, *Macrozamia*, and *Zamia*. Norstog (1972) described four neck cells at the time of fertilization in *Zamia integrifolia* L.f. Other studies reported only two neck cells emerging within the archegonial chamber (Lawson, 1926; Steyn & Strydom, 1993). In the structure of the archegonium, a large central cell and a smaller cell, which is the ventral canal cell, are also reported. The two cells are surrounded by a sheath called the archegonial jacket (Figure 2.1 C). The archegonial jacket consists of a stratum of transfer cells that through cytoplasmic connections allow the passage of nutrients present in the vegetative gametophyte, mainly starch, lipids, proteins and other polysaccharides (Sánchez-Tinoco et al., 2000, 2012, 2018 a, b).

The neck cells protrude within the archegonial chamber (Figure 2.3 A) during the growth stage of the central cell, later, forming the neck canal (Chamberlain, 1935) (Figure 2.1 D).

In some gymnosperms, such as *Ginkgo biloba* L. (Zhang et al., 2013; Wang et al., 2014; Owens et al., 1995) and *Cycas revoluta* Thunb. (von Aderkas et al., 2022), the structure and function of the neck cells has been described. That in relation to the

morphological changes that occur during fertilization and their relation to the fluids secreted to attract the antherozoid to the archegonium.

Although there are studies in some cycad species, such as those mentioned above, some of them have described the occurrence of four neck cells during the fertilization stage. In the present contribution, we focus on a pre-fertilization stage within the ontogeny of the archegonium, the central cell growth stage, and describe and compare the anatomical structure of the neck and archegonium cells in *C. tenuis* and *Z. furfuracea*.

2.3 MATERIALS AND METHODS

Ovules preserved in glycerin, 96% ethyl alcohol and water (25:50:25) (GAA) (Engleman, *pers com*) from the Plant Anatomy Laboratory collection of the Instituto de Investigaciones Biológicas, U.V. were used. For *C. tenuis* collections were made in May 1995 and for *Z. furfuracea* in September 2004. These materials were collected from “Cerro Coacoatzintla” in the municipality of Coacoatzintla, Veracruz, Mexico and “Ciénega del Sur”, municipality of Alvarado, Veracruz respectively.

The ovules were observed under the stereomicroscope to identify the stages under study, i.e., from ovule initiation to before fertilization. Subsequently, dissections were made in the longitudinal and transverse planes of the micropylar portion of the gametophyte where archegonia were visible. Following the reproductive cycle of both species (Sánchez-Tinoco et al., 2000, 2018), new ovule collections were made at the mentioned localities during May 2018 y 2022 for *C. tenuis* and in September 2019 for *Z. furfuracea*. Field-collected ovules were fixed in (FAA) composed of 37-40% formaldehyde, glacial acetic acid, 95% ethyl alcohol and water (10:5:50:35) (Sass, 1958). Both GAA-preserved and FAA-fixed ovules were washed in running water for processing by standard microtechnique of inclusion in paraffin, rotary microtome sections (12 µm) and staining with Safranin O and fast green (Sass, 1958).

Also, hand cross sections were also taken between 10 to 50 µm thick using disposable razorblades. The sections were studied under an Axiolab 5 Zeiss

photomicroscope and image capture with Axiocam 208 color Zeiss and edited with Zen 3.2 software (blue edition).

2.4 RESULTS

2.4.1 The central cell growth stage

The growth stage of the central cell in archegonia of *C. tenuis* occurs ten months after ovule initiation in May and in *Z. furfuracea* this occurs five months later (September), coinciding with the cellularization process of the gametophyte.

In general, for both species, the anatomical structure of this stage is described as follows. The archegonia are located towards the micropylar end within the vegetative gametophyte, which is covered by a layer of superficial cells, the rest being the storage parenchyma, where starch grains predominate (Figures 2.2 B, 3 C). The gametophyte towards the micropylar end forms a depression called the archegonial chamber (Figures 2.2 A, 2.3 A), towards the interior of this chamber, a single cell protrudes into the archegonium that occupies the entire dimensions of the archegonium, the central cell that is characterized by a profuse vacuolar cytoplasm (Figures. 2.2 B, 2.3 B), vacuoles of different diameters seen in longitudinal section surround a large vacuole that in trans-median section is observed in its maximum dimension, this vacuole occupies approximately 50% of the cytoplasm of the central cell (Figures. 2.2 G, 2.3 C). In relation to the large size of the central cell there is also a large nucleus visible to the naked eye in a cross section in fresh material (Figures. 2.2 B, C, 2.3 C, D). The nucleus is immersed within the vacuolated cytoplasm directed towards the micropylar end. Vacuoles can be observed in the direction of the archegonial chamber, within the nucleus (Figures. 2.2 C, 2.3 C) and using Safranin O the conspicuous nucleoli stain bright red (Figures. 2.3 C, 2.4 C).

The central cell is the result of the first periclinal division of the initial cell of the archegonium (Figure 2.1 B), which gives rise to the initial cell of the neck towards the micropyle and which is underlain by the central cell.

Later, as a result of the anticlinal division of the primary neck cell within the archegonial chamber, there are two protruding globose neck cells with prominent nuclei

and nucleoli, as well as a reticulated cytoplasm present in both species (Figures. 2.2 D-E, 2.3 C-F). Each of the neck cells is observed separate from each other and the superficial basal cells underlying the neck cells in *C. tenuis* are differentiated from the rest of the superficial cells of the gametophyte by being anticlinally elongated, and in *Z. furfuracea* these cells are similar to the rest of the superficial cells (Figures 2.2 C, E, 2.3 E, F).

In the sequence of repeated observations of sections from several ovules at this stage, only two neck cells were observed.

There is a correlation, observable in median section between the position of the neck cells, central cell nucleus and the large central vacuole (Figures. 2.2 B, C, 2.3 B, C,). The nucleus of the central cell that is located towards the micropylar region, in different sequences of sections was observed from a very close position towards the proximal end of the neck cells, to form a peak protruding from the vacuolated cytoplasm (Figure 2.3 C).

Surrounding the central cell is a layer of transfer cells with prominent nuclei and reticulate cytoplasm, these cells form the archegonial jacket (Figures 2.2 B, G, 2.3 B, D). Towards the interior of the jacket, the central cell wall shows pitting. Cords of cytoplasm from the central cell were observed crossing these pits.

2.4.2. Anatomy of *C. tenuis* ovules during the central cell growth stage

The ovules of *C. tenuis* in May measure 27-33 mm in length and 15- 20 mm in diameter (Figure 2.2 A), 2-6 archegonia were counted, with two neck cells protruding into the archegonial chamber. In May, the gametophyte can be found from precellularized to fully cellularized stages, at these stages the archegonia have already differentiated. The archegonial chamber differentiates as a depression towards the micropylar end of the gametophyte (Figure 2.2 A).

In longitudinal section, the following can be distinguished at the micropylar end of the gametophyte: the archegonial chamber, the neck cells, the central cell surrounded by the archegonial jacket formed by transfer cells; this archegonial apparatus is immersed within the parenchymal reserve tissue constituted mainly by starch grains (Figure 2.2 B).

In cross section, the archegonia are observed in radial arrangement in relation to the archegonial chamber (Figure 2.2 F). Two neck cells protrude into the archegonial chamber with a diameter of 1.0 mm. These globose cells measure 54 μm periclinally and 64 μm anticlinally, have 23 μm nuclei diameter and 4 μm nucleoli diameter. Their wall is 0.94 μm thick. Each globose cell is underlain by an anticlinally elongated superficial basal cell measuring 36 μm anticlinally and 23 μm tangentially. These cells differ in size from the rest of the surface cells of the vegetative gametophyte, which are isodiametric and measure 23 μm (Figure 2.2 B, E).

In median section surrounding the central cell there is a layer of transfer cells elongated tangentially and forming the archegonial jacket, measuring 64 μm tangentially and 50 μm anticlinally. These transfer cells have scarce cytoplasm and prominent nuclei measuring 41 μm diameter, within the nuclei up to five nucleoli measuring 7 μm in diameter were counted (Figure 2.2 G, H). The nucleoli, stained bright red with Safranin O staining. Their wall is 2.5 μm thick.

Towards the jacket's inner side, the central cell is located; it is large, 3 mm anticlinally and 1.20 mm periclinally. Its cytoplasm is profusely vacuolated. The vacuoles are of different sizes, the largest are 38 μm in diameter, whilst the smallest measure 2.5 μm in diameter. Towards the micropyle and in median section, the large central vacuole is observed, measuring 1.6 mm anticlinal and 0.80 mm periclinal. This vacuole occupies approximately 50% of the cytoplasm of the central cell and underlies a prominent nucleus whose contents are highly reticulate (Figure 2.3 A, B, H). The nucleus measures approximately 75 μm in diameter and its nucleolus measures 15 μm in diameter, vacuoles are observed within the nucleus (Figure 2.3 A, G). The wall of the central cell is 0.94 μm thick and has pits averaging 11 μm in diameter; through these passes the cytoplasmic cords of the central cell and connect with the cytoplasm of the transfer cells.

In medium longitudinal sections, an alignment between the neck cells, the nucleus of the central cell and the large central vacuole is observable (Figure 2.2 B, C).

2.4.3. Anatomy of *Z. furfuracea* ovules during the central cell growth stage

During the central cell growth stage in *Z. furfuracea* that occurs during September when the archegonia are beginning to differentiate, the ovules are 17-24 mm in length and the archegonia 3 mm in length and 1.5 mm in diameter. There are commonly four archegonia per ovule (Figure 2.3 A).

The neck cells within the archegonial chamber are globose in appearance and measure 50 μm periclinally and 59 μm anticlinally. Their nuclei are 15 μm and the nucleoli are 2.5 μm in diameter. The wall is 0.60 μm thick. In early September, up to two superficial basal cells are observed subtending the neck cells at the end of the month only one superficial basal cell supports the globose neck cell. The superficial basal cell is isodiametric, 20 μm (Figure 2.3 C, G).

In early September, the alignment of the neck cells, the nucleus of the central cell measuring 0.6 mm anticlinally and the large central vacuole measuring 1.8 mm in length and 0.5 mm in width are observed. The nucleus also has prominent nucleoli up to 85 μm in diameter and conspicuous micropyle directed vacuoles measuring 135 μm anticlinally. The nucleus at this stage is observed forming a peak which supports the superficial basal cells that subtend the globose cells or neck cells. The location of the central vacuole is proximal to the nucleus. The central cell measures 2.5 mm anticlinally and 1.2 mm periclinally (Figure 2.3 C, D).

There is a stratum of transfer cells surrounding the central cell, the transfer cells measure 20 μm and have prominent nuclei up to 15 μm and scarce cytoplasm. Within the nuclei, up to eight nucleoli measuring 6 μm in diameter were counted. The nucleoli had a deep red staining in response to Safranin O staining (Figure 2.3 C, D).

In the second week of September, in repeated series of sections, it was possible to record the alignment of the central cell nucleus forming a peak, the large vacuole subtending the nucleus, and the exposure of globose cells subtended by superficial basal cells within the archegonial chamber (Figure 2.3 C, D).

2.5 DISCUSSION

In general, there are no significant differences in the anatomical structure of the neck cells at this stage in *C. tenuis* and *Z. furfuracea*. However, as expressed by their

anatomy, there are features such as position within the archegonial chamber, globose shape, cell wall aspect, prominent nucleus and granular or reticular appearance of the cytoplasm, suggest an important role prior to fertilization.

Chamberlain (1910), Norstog (1972, 1990) and Norstog & Nicholls (1997) reported the importance of the neck cells in the passage of the antherozoid from the archegonial chamber to fertilize the nucleus of the egg cell. On the other hand, there are studies that refer to the participation of secreted fluids by the globose cells that have been interpreted as osmotic mechanisms that intervene in the rupture of the walls between the two globose cells. The swelling of these cells and the pressure that these cells exert allow the passage of the antherozoid and also removes flagellar apparatus (Lawson, 1926; Brough & Taylor, 1940; Norstog, 1972; Ikeno, 1986; Takaso et al., 2013; Little et al., 2014; von Aderkas et al., 2022). Contributions on *Ginkgo biloba* by Zhang et al., (2013) and Wang et al., (2014) provide information on secretory organelles, that is antherozoid attracting fluids, as well as antherozoid structural changes during fertilization.

Although there is information regarding the structure and participation of the neck cells during fertilization, in the present work we take up the importance that Chamberlain (1910, 1919, 1935) and Coulter & Chamberlain (1903) gave to the pre-fertilization stage, that is, the growth stage of the cell, highlighting a profusely vacuolated cytoplasm and where a large central vacuole protrudes. We add information on the alignment of the nucleus of the central cell forming a peak directed towards micropyle, where prominent vacuoles also within the nucleus and the large central vacuole seem to indicate that their respective tonoplasts play an important role pushing the globose cells towards the pollen chamber; along with them a pair of surface cells subtending the globose cells is ejected. This information is in addition to the osmotic mechanism mentioned by Lawson (1926), Brough & Taylor (1940) and Norstog (1972), which could be the factor contributing to the rupture of the wall between the two globose cells, we found traces of wall in the archegonial chamber detached from the globose cells (Figures 2.2 E, 2.3 E).

A repeated series of sections led us to clarify that the cells subtending the globose cells, the superficial basal cells, are not transfer cells that are part of the archegonial

jacket. And that these superficial cells are pushed together with the globose cells into the archegonial chamber.

Other studies related to the reproductive ontogeny of *Z. furfuracea* have highlighted the feasibility of finding important stages of reproductive ontogeny in those cycad species with short life-cycle (Sánchez-Tinoco et al., 2000, 2012, 2018). Here, we have recorded the alignment of structures more easily in *Z. furfuracea* (a short life-cycle species), while in *C. tenuis* it was necessary to make repetition observations with materials from 1995, 2018 and 2022.

We emphasize that during the growth stage of the central cell, prior to fertilization, the traditional concept of neck cells refers to a pair of globose cells with prominent nuclei and granular or reticulate cytoplasm that are very similar to the superficial basal cells that subtend them. However, Norstog & Nicholls (1997), describe the process of globose cells dividing to form a quartet of cells just prior to fertilization.

Thus, the stage of central cell growth named by Chamberlain (1919, 1935) and Coulter & Chamberlain (1903), is possibly due to the expansion of the central cell by the profuse vacuolized cytoplasm and characterized by an anatomical arrangement that will favor fertilization involving the secretion of fluids. It should be added that it is the stage in which the globose cells are expelled after the second anticlinal division that formed them. Associated with the cell complex (globose cells and superficial basal cells), vacuoles of the nucleus of the central cell and the large central vacuole as well as the rest of the cells allow an arrangement that will favor the passage of the antherozoids leading to the consequent fertilization. That is, at this stage of growth of the central cell, structural characteristics that favor the protrusion of the globose cells into the archegonial chamber are present.

2.6 CONCLUSION

Thus, it is concluded that the growth stage of the central cell, in both species, there is a similar anatomical structure where within the scarce cytoplasm and predominate vacuoles of different sizes among which stands out a large central vacuole that occupies almost 50% of the cytoplasmic content. At this stage there are features such as the

alignment of the nucleus of the central cell with its corresponding vacuoles and the large central vacuole that participate in the expulsion of the globose cells together with the superficial basal cells into the archegonial chamber. At this stage there are two globose cells each subtended by a superficial basal cell for both species. A complex of cells, nuclei and vacuoles is recognized, which we assume complements the physiological processes that take place in each of the globose cells to favor the attraction of the antherozoids and consequent fertilization.

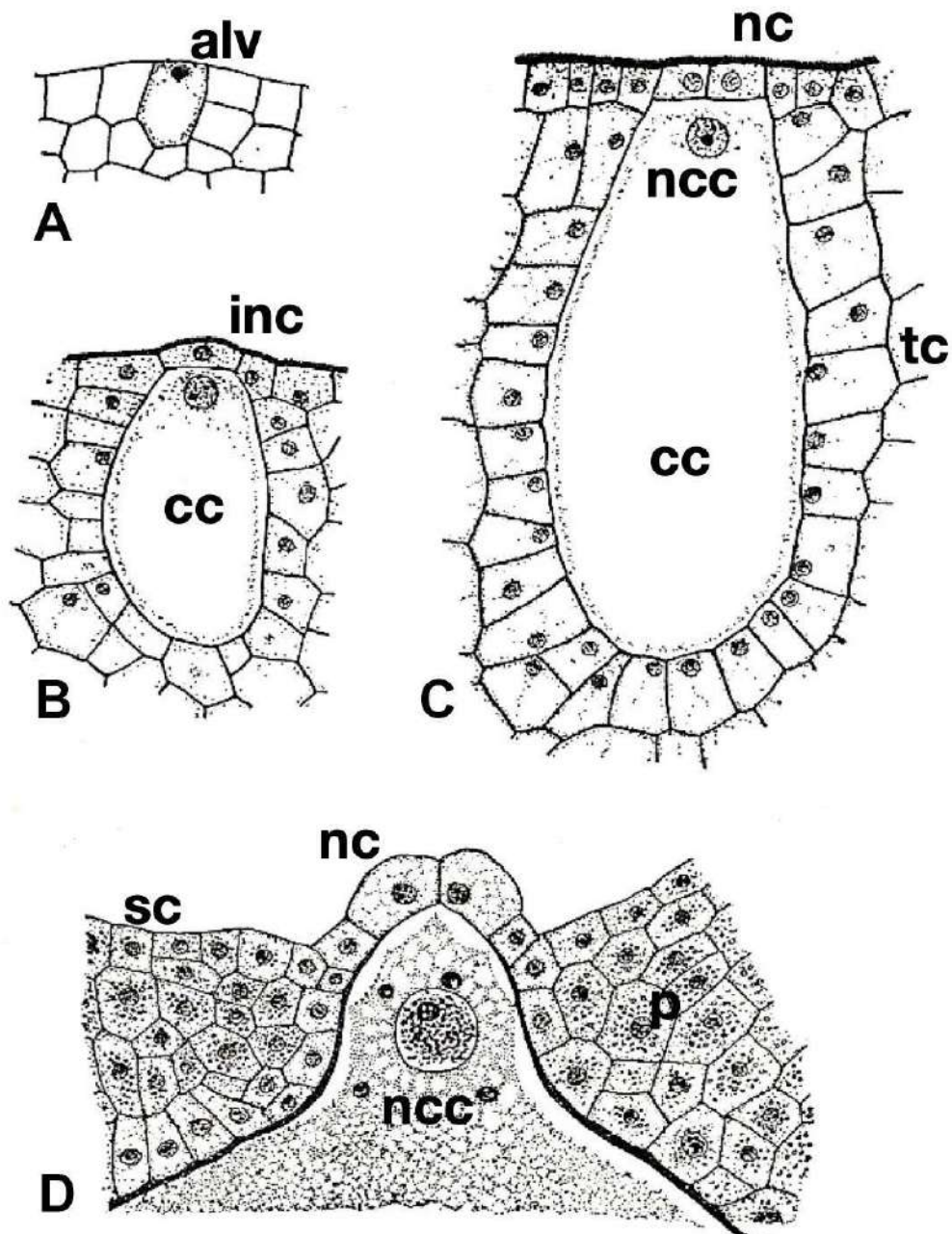


Figure 2.1. Development of the archegonium in *Dioon edule*. A. archegonium primordium; B. neck cell and central cell; C. archegonium with two neck cells; D. micropylar region of the archegonium with two neck cells in the expulsion process to the archegonial chamber. Abbreviations: alv, alveolus; inc, initial neck cell; cc, central cell; nc, neck cell; ncc, central cell nucleus; tc, transfer cell; sc, superficial cell. (Modified from Coulter & Chamberlain, 1910).

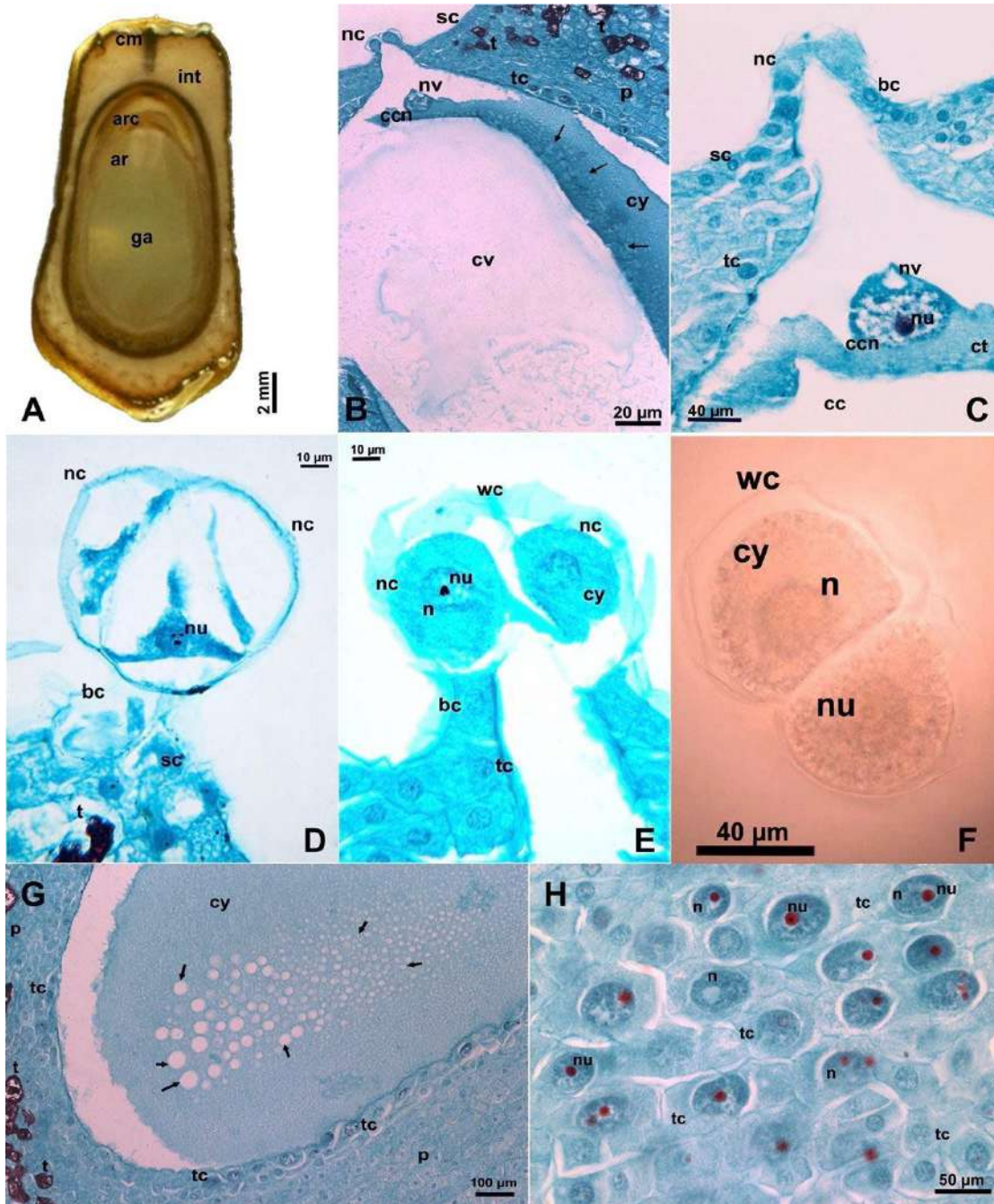


Figure 2.2. A. *C. tenuis* ovule in May during the central cell growth stage. B. Longitudinal section of the archegonium. C. Longitudinal section of the micropilar region of the archegonium. D. Longitudinal view of the globose neck cells. E. Longitudinal section of the neck cells. F. Cross section of the neck cells embedded in the vegetative gametophyte. G. Longitudinal section of the central cell. H. Tangential section of the archegonial jacket. Abbreviations: ar, archegonium; arc, archegonial chamber; bc, basal superficial cell; cc, central cell; cv, large central vacuole; cy, cytoplasm; int, integument; ga, gametophyte; mc, micropillar channel; n, nucleus; nc, neck cells; nu, nucleolus; nv, nucleus vacuoles; p, parenchyma; sc, superficial cells; t, tannins; tc, transfer cell; wc, wall cell; †, vacuoles.

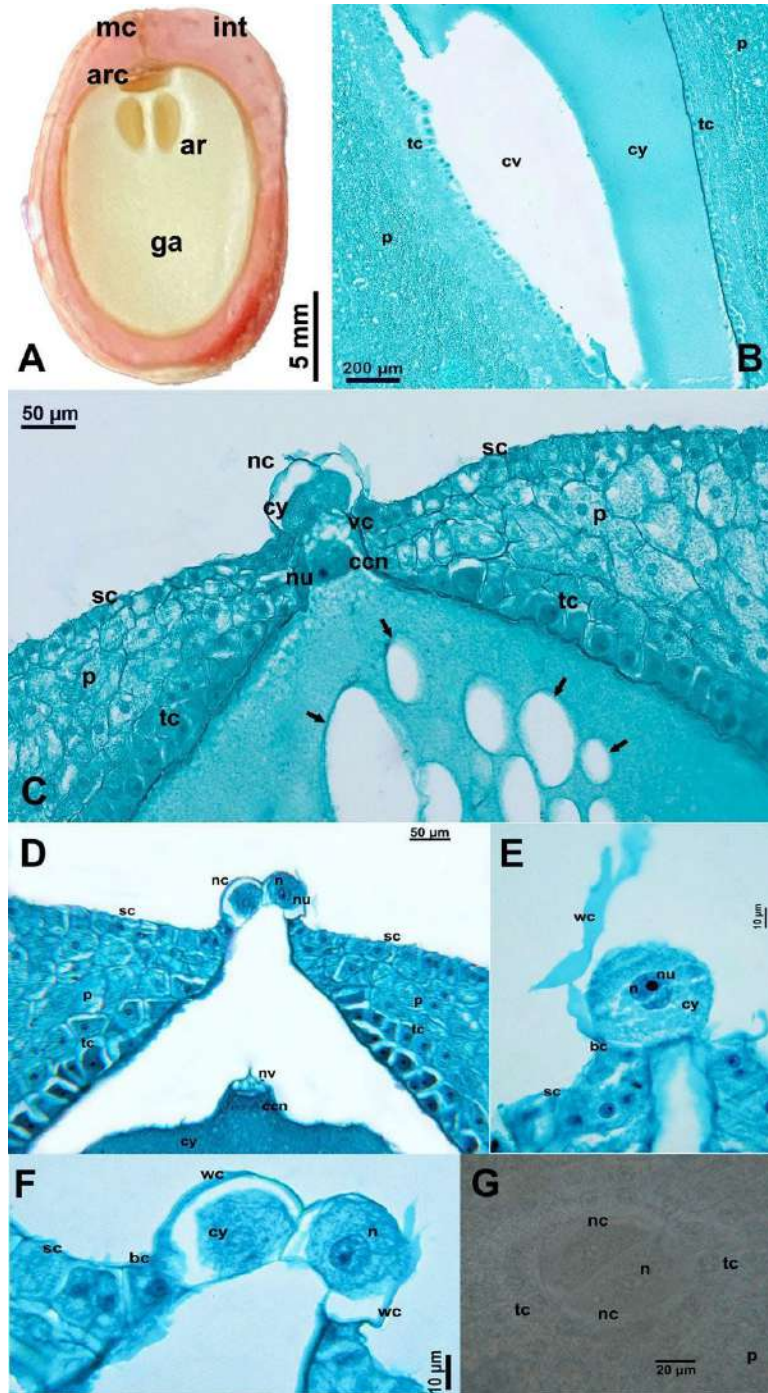


Figure 2.3. A. *Z. furfuracea* ovule in September during the central cell growth stage. B. Longitudinal section of the archegonium. C. Longitudinal section of the micropylar region of the archegonium. D. Longitudinal section in the micropylar region shows the alignment of the nucleus of the central cell and the neck cells. E. Longitudinal section of the neck cells. F. Longitudinal section of the neck cells. G. Cross section of the neck cells embedded in the vegetative gametophyte. Abbreviations: ar, archegonium; arc, archegonial chamber; bc, basal superficial cell; cc, central cell; ccn, central cell nucleus; cv, large central vacuole; cy, cytoplasm; int, integument; ga, gametophyte; mc, micropillar channel; n, nucleus; nc, neck cells; nu, nucleolus; nv, nucleus vacuoles; p, parenchyma; sc, superficial cells; t, tannins; tc, transfer cell; wc, wall cell; †, vacuoles.

DISCUSIÓN GENERAL

Diversas discusiones emergen al cabo de la presente investigación, mismas que no sólo se circunscriben a las características estructurales de las células, de los tejidos, de los aparatos; sino que permite interpretar la relación estructura-función; los tiempos en que ocurren las diferentes etapas de la megagametofitogénesis mediante la construcción de los ciclos reproductores de las tres especies estudiadas, y del mismo modo delimitar y comprender cada una de las fases en la ontogenia. Del mismo modo se ha esclarecido y demostrado la manera en que ocurren algunos procesos de diferenciación celular que permiten un mejor entendimiento de la biología reproductora de este grupo de plantas, aspectos que se discutirán de manera separada a continuación.

Ciclos reproductores

Para definir el tiempo en que ocurre la megagametofitogénesis en las tres especies, se hicieron recolectas sistematizadas de óvulos y semillas en el campo, desde la iniciación de los óvulos hasta el desarrollo del cuerpo del embrión, es decir, hasta conseguir semillas. Se contaba con algunos muestreos previos reportados para *C. tenuis* y *Z. furfuracea* (Sánchez-Tinoco, et al., 2000, 2004, 2012, 2018b), así como información de la fenología para *C. tenuis* (Alejandre et al., 1990), no obstante, el seguimiento de las etapas de la ontogenia reproductora, requirió más muestreos aún más detallados. Se efectuaron repetidas series de cortes, en varias ocasiones fallidas; pero finalmente permitieron construir los diagramas de los respectivos ciclos (Anexos A, B, C). Con tales resultados se determina que los ciclos de desarrollo son de dos años para *C. tenuis*, de tres años para *D. edule* y un año para *Z. furfuracea*; lo cual confirma lo reportado por Sánchez-Tinoco et al., (2000), Pérez-Farrera y Vovides (1997) y Sánchez-Tinoco et al., (2018b). Con respecto a *C. tenuis*, especie de bosque mesófilo, y *Z. furfuracea*, especie de dunas costeras, la información obtenida soporta los reportes previos sobre la duración de los ciclos con relación al clima, siendo más prolongados en ambientes templados y lo opuesto en zonas tropicales según las conclusiones de diversos autores (Singh, 1961; Smith, 1978; Dehgan & Johnson, 1983; Owens et al., 1997; Hann-Chung & Yu-Fen, 2001). Con respecto a *D. edule*, especie de selva baja caducifolia, una posible

explicación a su prolongado ciclo reproductor podría estar relacionada a las contrastantes condiciones de disponibilidad de humedad que marcan las épocas secas y húmedas (Miranda & Hernández, 1963; Rzedowski 1978; Trejo-Vázquez, 1999).

Las etapas en la ontogenia reproductora, no difieren entre las tres especies, solo hay diferencias de celeridad asociadas a lo prolongado de sus ciclos. En relación al tiempo en que ocurre la megagametofitogénesis, que inicia con la etapa de núcleos libres, alveolación, formación de paredes, diferenciación y maduración de los arquegonios, para *C. tenuis* dura ocho meses, para *D. edule* aproximadamente dos años y para *Z. furfuracea* seis meses. Respecto de la estacionalidad, inicia la etapa de núcleos libres en el invierno, otoño y verano, respectivamente. La diferenciación de los arquegonios ocurre once, tres y seis meses posteriores a la emergencia de los megatróbilos en cada una de las especies (Anexos A, B, C).

La información representada en los anexos referidos constituye una contribución a la biología general de estas especies; permite además entender las etapas en las que se encuentran los óvulos o semillas durante el año, entre otros, para propósitos de conservación mediante propagación mediante semilla, cultivo *in vitro* o para una mejor comprensión de la fisiología de la germinación.

Este trabajo permitió reconocer en las etapas iniciales de la megagametofitogénesis: la organización centrípeta de los núcleos libres que sucede al estado cenocítico del gametofito, la formación de los alveolos largos hexaédricos y los cortos piramidales arreglados formando radios, para dar lugar a la posterior formación de paredes en planos irregulares y formar al gametofito celular que está constituido por parénquima de reserva y constituye la parte vegetativa del gametofito. Y en las etapas tardías de la megagametofitogénesis, referida a la diferenciación de los arquegonios y el complejo de células que los forman, se reporta el número constante de dos células del cuello previo a la fecundación, la constitución vacuolar del citoplasma de la célula central, y el arreglo lineal de la gran vacuola de la célula central, así como de su núcleo que juegan un papel importante en el despliegue de las células del cuello hacia el interior de la cámara arquegonial. Así mismo, se registró la liberación de la pared de las células

globosas que constituyen las células del cuello a través de las cuales pasan los anterozoides a fecundar a la ovocélula.

Etapas iniciales de la megagametofitogénesis

Núcleos libres

Las ventajas que ofrece un ciclo reproductor corto, como en *Z. furfuracea*, especie de clima cálido, es que permite estudiar las diferentes etapas de su ontogenia con ciertas facilidades ya que un ciclo corto facilita el hallazgo y la descripción de las etapas. Es decir, si se requieren repeticiones porque los procesos en el laboratorio fueron tórpidos, o el evento es breve y no se registra, es cuestión de esperar un año para repetir las recolectas de los materiales; esto contrasta con las otras dos especies estudiadas, en las que es necesario esperar más tiempo. Es el caso de la etapa de núcleos libres y la etapa de alveolación en el megagametofito. Se trata de un proceso breve que se completa en aproximadamente una semana. Sin embargo, determinar el tiempo en que ocurren estas dos etapas consecutivas ha llevado varios años de observación y repetición de colectas, incluso teniendo en cuenta estudios previos sobre la cronología reproductiva de *C. tenuis* y *Z. furfuracea* (Sánchez-Tinoco et al., 2000, 2012, 2018b). En contraposición, en *D. edule*, la especie cuyo ciclo es el más prolongado de las tres estudiadas, no fue posible evidenciar mediante cortes histológicos estas etapas. La información en el Anexo B se completó por los reportes de Chamberlain (1906), cuyas recolectas y observaciones fueron realizadas en los alrededores de la localidad de estudio.

Sobre el patrón de organización centrípeta de los núcleos dentro de la pared de la megaspóra descrito para las cícadadas por Chamberlain (1906), Coulter & Chamberlain (1903, 1910), Lawson (1926), De Sloover (1963), Singh (1978), Maheshwari & Singh (1967) (Figura 2A), se confirma en la presente investigación. Aunque dichos autores no proporcionan información de las especies estudiadas cuando se refieren a cícadadas, lo que aquí se describe soporta lo que Maheshwari & Singh (1967) refieren como un patrón bastante uniforme en la ontogenia del megagametofito en sus etapas tempranas. En adición, en la presente investigación, fue posible observar la migración de núcleos desde

el centro hacia la periferia, con algunos núcleos en mitosis, resultando la consecuente disposición de hileras de núcleos.

Alveolación

La etapa de alveolación en la ontogenia del gametofito ha causado controversia desde que Chamberlain (1906, 1910, 1919, 1935) y Coulter & Chamberlain (1903, 1910), no la consignan en sus detalladas descripciones de la ontogenia del óvulo en las cícadas; y describirla en este trabajo permite una mejor comprensión del proceso de la celularización. Representa una etapa decisiva previa a la formación de paredes. Otras autoridades, como Schnarf (1933), reportan dos tipos de alveolos, "verdaderos y falsos", mismos que fueron consignados como un error de interpretación por Maheshwari & Singh (1967) y Singh (1978). Maheshwari & Singh (1967) mostraron esquemas de la organización de panal de abejas durante la alveolación, basados en estudios previos en *Ephedra helvetica* C.A. Mey, orden Ephedrales, en *Pinus sylvestris* L., y en *Cephalotaxus drupacea* Siebold & Zucc., orden Pinales. También aclararon la forma en que al final de la etapa de núcleos libres, cuando se produce la disposición periférica de los núcleos, cada núcleo está conectado a seis núcleos adyacentes por microtúbulos, que posteriormente, por divisiones anticlinales de la pared en dirección centripeta, dan lugar a células alargadas de seis lados o alveolos. Con respecto a las cícadas, De Sloover (1964) informó de la existencia de alveolos en *Encephalartos poggei*. Sus descripciones muestran que están abiertos internamente, que los núcleos están situados en la cara interna abierta y que a medida que crecen se alargan. También describió "células piramidales" formadas por el cierre precoz de las paredes.

Para la etapa de núcleos libres, DeSloover (1964) describe en detalle las diferentes capas de la membrana de la megaspora que encierra al gametofito tanto en la etapa de núcleos libres como durante la alveolación. Aunque como en varios estudios relacionados con la ontogenia del óvulo, se enfatiza que se necesitan observaciones con información más detallada, particularmente sobre los primeros estadios de la megagametofitogénesis en cícadas. Los trabajos de Swamy (1948), De Silva & Tambiah (1952) y Rao (1961), aunque contribuyen en gran medida al

conocimiento de la embriología, no proporcionan información sobre el desarrollo del gametofito joven de las cícadas.

Mediante cortes con navaja de rasurar a mano alzada se lograron secciones longitudinales en óvulos frescos, y se reportan los núcleos localizados en la periferia de células alargadas, son alveolos hexaédricos que forman filas radiales que convergen hacia el centro. En sección transversal se distinguen seis lados en cada alveolo que en conjunto simulan las cavidades de un panal de abejas, lo que coincide con las ilustraciones de Maheswari & Singh (1967).

En algunas secciones fue posible seguir las secuencias de formación de las paredes. Algunas paredes se cierran anticlinalmente formando ángulos que terminan a distancias cortas y que aquí se describen como triedros piramidales cortos o alveolos tetraédricos, añadiendo información al concepto DeSloover (1964) y a lo que refieren Favre-Duchartre (1957) y Maheswari & Singh (1967) como células piramidales.

Durante esta etapa se diferencian tres estratos de células con citoplasma denso y núcleos conspicuos descritos aquí son característicos de las células de transferencia según la definición de Esau (1982). Es decir, células de parénquima con invaginaciones en la pared que aumentan la superficie del plasmalema, especializadas en la translocación de solutos a corta distancia. Estos estratos se diferencian de entre el tejido nucelar formando una especie de vaina comparable a la vaina arquegonial cuyas características celulares son similares. La participación de ambas en la nutrición del joven gametofito en desarrollo parece probable. Es comparable a la descripción de DeSloover (1964) que se refiere a dos capas de células formando una especie de tapetum que nutre al gametofito. La estructura del óvulo en estos dos estadios revela que, a medida que avanza el desarrollo del megagametofito, las células del megasporangio o nucela que lo rodean se hacen más compactas, dando señales de su futura reducción a una capa papirácea cuando el megagametofito continúe agrandándose, el arquegonio madura y el embrión se desarrolle. Del mismo modo, el pico nucelar se reduce a medida que el megagametofito aumenta de tamaño. No ocurre lo mismo con la fusión entre el nucela y el tegumento en más de dos tercios de su longitud, denominada por Sánchez-Tinoco & Engleman (2004) y Sánchez-Tinoco et al.,

(2007) como paquicálaza en óvulos y semillas maduras; paquicálaza es un término introducido por Corner (1976, 1992) para angiospermas dicotiledóneas, que se refiere a la zona vascularizada del extremo calazal del óvulo donde no hay diferencia entre el tejido nucelar y el tegumento (Sánchez-Tinoco et al., 2007; Zumajo-Cardona et al., 2021). Ambas estructuras están presumiblemente fusionadas de forma congénita. Las etapas aquí descritas, que refieren a óvulos en sus primeros estadios, durante el inicio de la emergencia de megatróbilos, permiten esclarecer el carácter congénito de la fusión entre la nucela y el tegumento.

Etapa tardía de la megagametofitogénesis

Las células del cuello durante la etapa de crecimiento de la célula central

Las descripciones de la estructura anatómica de las células del cuello durante la etapa de crecimiento de la célula central para *C. tenuis* y *Z. furfuracea*, revelan que no existen diferencias significativas, éstas están asociadas a las dimensiones celulares que corresponden también al tamaño de los óvulos, de 27-33 mm en *C. tenuis* y de 17-24 mm *Z. furfuracea*. Desafortunadamente, en *D. edule* no fue posible registrar esta etapa, los repetidos muestreos con sus correspondientes procesamientos histológicos, no fueron exitosos; considerando que el ciclo reproductor es de tres años, se hicieron intentos de conseguir muestras dejando pasar dos ciclos de tres años, esto es, después de seis años no se logró conseguir el material requerido.

Para las especies estudiadas, la anatomía de las células del cuello reporta características como su posición dentro de la cámara arquegonial, la forma globosa, el aspecto de la pared celular, el núcleo prominente y el aspecto granular o reticular del citoplasma, que sugieren que juegan un papel importante previo a la fecundación.

Chamberlain (1910), Norstog (1972, 1990) y Norstog & Nicholls (1997) informaron sobre la importancia de las células del cuello en el paso del anterozoide desde la cámara arquegonial para fecundar el núcleo de la ovocélula. Por otro lado, existen estudios que refieren a la participación de fluidos secretados por las células globosas que han sido interpretados como mecanismos osmóticos que intervienen, entre otros aspectos, en la ruptura de las paredes entre las dos células globosas; su turgencia, al ejercer presión,

favorece el desprendimiento de los cilios que le proporcionan motilidad a los anterozoides (Lawson, 1926; Brough & Taylor, 1940; Norstog, 1972; Ikeno, 1986, Takaso et al., 2013; Little et al., 2014; von Aderkas et al., 2022).

Las contribuciones en *Ginkgo biloba* de Zhang et al., (2013) y Wang et al., (2014) aportan información sobre los organelos secretores, es decir, sobre los fluidos que atraen a los anterozoides, así también, describen los cambios estructurales de los anterozoides durante la fecundación.

Aunque existe información sobre la estructura y participación de las células del cuello durante la fecundación, en el presente trabajo se retoma la importancia que Chamberlain (1910, 1919, 1935) y Coulter & Chamberlain (1910) dieron a la etapa de previa a la fertilización, es decir, la etapa de crecimiento de la célula, destacando un citoplasma profusamente vacuolado, donde sobresale una gran vacuola central. Se adiciona información sobre la alineación del núcleo de la célula central formando un pico dirigido hacia el micrópilo, donde vacuolas prominentes también dentro del núcleo y la gran vacuola central parecen indicar que sus respectivos tonoplastos juegan un papel importante empujando a las células globosas hacia la cámara arquegonial; junto con ellas se expulsa un par de células superficiales que subtienden a las células globosas. Además del mecanismo osmótico mencionado por Lawson (1926), Brough & Taylor (1940) y Norstog (1972), que podría ser el factor que contribuye a la ruptura de la pared entre las dos células globosas, en la presente investigación se reportan restos de pared desprendida y/o en proceso de desprendimiento de las células globosas en la cámara arquegonial.

Repeticiones seriadas de cortes histológicos permitieron aclarar que las células que subtienden a las células globosas, son células superficiales basales, y no son células de transferencia las cuales constituyen la estructura de la vaina arquegonial. Y que estas células superficiales son empujadas junto con las células globosas hacia la cámara arquegonial.

Otros estudios relacionados con la ontogenia reproductora de *Z. furfuracea* han puesto de manifiesto la viabilidad de encontrar etapas importantes de la ontogenia reproductora en aquellas especies de cícadas con ciclo de vida corto (Sánchez-Tinoco

et al., 2000, 2012, 2018b). La alineación de los núcleos y vacuolas, se evidenció en las primeras secuencias de cortes y sus comprobaciones en *Z. furfuracea* (especie de ciclo de vida corto), mientras que en *C. tenuis* fue necesario hacer varias repeticiones con materiales recolectados en 1995, 2018 y 2022.

Es pertinente destacar que, durante la etapa de crecimiento de la célula central, que es previa a la fecundación, las células del cuello se caracterizan por apariencia globosa, núcleos prominentes y citoplasma granular o reticulado; con excepción del carácter globoso, la estructura de las células superficiales basales que las subtienden es similar. Norstog & Nicholls (1997), describen el proceso de división de las células globosas para formar un cuarteto de células justo antes de la fecundación.

Así, la etapa de crecimiento de la célula central nombrada por Chamberlain (1906, 1935) y Coulter & Chamberlain (1910), se explica por la expansión de la célula central caracterizada por presentar un profuso citoplasma vacuolado y un arreglo anatómico que favorecerá la fecundación, involucrando la secreción de fluidos. Cabe añadir que es la etapa en el que las células globosas son expulsadas tras la segunda división anticlinal que las formó. Asociado al complejo celular (células globosas y células superficiales basales), las vacuolas del núcleo de la célula central y la gran vacuola central, así como el resto de las vacuolas que dominan el citoplasma, se organizan para favorecer el paso de los anterozoides y conseguir la fecundación. Es decir, en esta fase de crecimiento de la célula central se presentan características estructurales que favorecen la protrusión de las células globosas hacia la cámara arquegonial.

CONCLUSIONES GENERALES

Para conseguir el objetivo de describir la megagametofitogénesis en tres especies de Zamiaceae del estado Veracruz, *C. tenuis*, *D. edule* y *Z. furfuracea*, inicialmente fue necesario integrar la información de la fenología reproductora, analizar las etapas del desarrollo de los óvulos y semilla al nivel de la estereomicroscopía y construir los ciclos reproductores con repeticiones tanto de muestreos como de cortes histológicos, así como de apoyo bibliográfico. Se hicieron recolectas sistematizadas y procesamientos histológicos durante casi diez años, tiempo que no ha sido suficiente para completar la ontogenia del óvulo y semilla de *D. edule* y que aún deja algunas incógnitas en algunas etapas como la megasporógenesis y la embriogénesis en las tres especies. No obstante, se logró conjuntar, interpretar y representar gráficamente los ciclos reproductores para cada una de las especies, los cuales se cumplen en dos años para *C. tenuis*, tres para *D. edule* y uno para *Z. furfuracea* (Anexos A-C).

Pese a lo anterior, los resultados de esta investigación permiten concluir que la megagametofitogénesis, es una etapa decisiva en la ontogenia del óvulo, en donde se constituye el gametofito vegetativo y el gametofito reproductor. Se reportan tres etapas en la formación del gametofito vegetativo: núcleos libres, alveolación y formación de paredes. El gametofito vegetativo es una estructura que almacena almidón, lípidos y proteínas y mediante conexiones citoplasmáticas nutre a la ovocélula, el cigoto, el embrión y a la plántula en sus tres primeros años de desarrollo, de acuerdo con Sánchez-Tinoco et al., (1998, 2012, 2018b).

En el aspecto estructural se destaca la descripción de los núcleos que le confieren el carácter cenocítico al gametofito, pero también se comprobó la manera en que migran hacia la periferia, es decir, se comprobó el arreglo centrípeto descrito por Chamberlain (1935) y De Sloover (1964). Se esclareció que la formación de alveolos o alveolación es una etapa previa a la celularización. La alveolación es una etapa que Chamberlain (1906, 1910, 1919, 1935) y Coulter & Chamberlain (1910), no describieron en sus destacados aportes a la biología de este grupo de plantas y que en lo que respecta a la organización de panal, trabajos previos proporcionan información para los ordenes Ephedrales y Pinales. Se reporta aquí que los alveolos pueden ser de dos tipos, largos hexaédricos y

cortos triédricos o tetraédricos; estos últimos se asocian con las “células piramidales” nombradas por DeSloover (1964) y los refieren Favre-Duchartre (1957), Maheswari & Singh (1967) y Singh & Johri (1972).

En corte longitudinal se observan los alveolos largos y cortos organizados en series de radios que convergen hacia el centro del gametofito. En corte transversal se observan cavidades hexagonales que simulan un panal de abejas, lo que comprueba lo que ilustran Maheswari & Singh (1967) y describen Singh & Johri (1972) para tres especies pertenecientes a los ordenes Ephedrales y Pinales, es decir, para las Cycadales no se encontraron reportes de la mencionada organización de panal en corte transversal.

Las etapas de núcleos libres y alveolación son eventos secuenciales que, en una especie de ciclo reproductor corto, como *Z. furfuracea*, pueden ocurrir en una semana, lo que se puede considerar tiempo corto. En *C. mexicana* esto ocurre quince días o un mes.

En lo que respecta a la porción reproductora del gametofito, es importante destacar que después de la diferenciación del alveolo que originará el primordio del arquegonio, y las consecuentes divisiones celulares que originarán a los primordios de las células del cuello y a la célula central, no fueron consignadas en este estudio. Las múltiples series de cortes que se realizaron fueron insuficientes para conseguir información al respecto. Es posible que esta división sea tan fugaz o que la diferenciación celular sea imperceptible bajo microscopía fotónica, aun considerando los múltiples arquegonios se diferencian.

Sobresale de esta investigación la identificación, descripción y esclarecimiento de los detalles de la etapa de crecimiento de la célula central nombrada por Chamberlain (1906, 1935) y Coulter & Chamberlain (1910).

La estructura del arquegonio durante la etapa de crecimiento de la célula central, para *C. tenuis* y *Z. furfuracea*, es similar. En la descripción de esta célula de gran tamaño, perceptible a simple vista, mide 3 mm en *C. tenuis* y 2.5 en *Z. furfuracea*, se percibe un citoplasma escaso donde predominan vacuolas de diferentes tamaños entre las que

destaca una gran vacuola central que ocupa casi el 50% del contenido citoplasmático y su correspondiente núcleo dentro del que se perciben vacuolas y hasta 5 nucleolos. Un hallazgo relevante de este estudio es reportar la alineación del núcleo de la célula central con sus correspondientes vacuolas y la gran vacuola central que participan en la expulsión de las células globosas junto con las células superficiales basales hacia la cámara arquegonial. Aquí se introduce el término globoso, para describir a las células que constituyen el complejo celular del cuello, tradicionalmente nombrado como “células del cuello”. También, se hace énfasis en que solo hay dos células globosas subtendidas por una célula basal superficial en ambas especies durante la etapa de crecimiento de la célula central. Se reconoce un complejo de células, núcleos y vacuolas que se presume que complementan los procesos fisiológicos que tienen lugar en cada una de las células globosas para favorecer la atracción de los anterozoides y la consiguiente fecundación.

Dentro de la estructura del arquegonio se describieron el estrato de células de transferencia con núcleos prominentes y escaso citoplasma. La estructura de estas células favorece la función de translocación de nutrientes desde el gametofito vegetativo a través de punteaduras de la célula pared de la célula central por las que pasan cordones de citoplasma, lo que comprueba lo descrito por Sánchez-Tinoco et al., (1918b). Dichas células constituyen la vaina arquegonial.

Otro hallazgo fue la determinación de la ontogenia de las células que subtienden a las células globosas. Se trata de células superficiales que son expulsadas junto con las células globosas hacia la cámara arquegonial. Las células superficiales conforman un estrato de células que rodean al gametofito vegetativo, las cuales son células isodiámtricas, que funcionan como una epidermis.

Sobre las células globosas cuyo origen es la segunda división anticlinal del primordio del arquegonio, si bien no se registró esta división, se comprobó cómo es que estas células pierden su pared para favorecer con su turgencia al paso del anterozoide.

Finalmente, se concluye que estudiar la ontogenia de estas plantas requiere al menos multiplicar los años que dura su ciclo por las etapas de la ontogenia y por la necesidad de repetir muestreos cuando un evento no se registra en un corte histológico. Además, es imperativo recordar que se trata de plantas de lento crecimiento, con ciclos

de vida prolongados y cuyas poblaciones se encuentran diezmadas principalmente por la destrucción del hábitat y por el saqueo indiscriminado con fines comerciales. Todo esto confirma las aseveraciones de Quisumbing (1925), Chamberlain (1935) y Norstog (1990) sobre las dificultades de llevar a cabo estudios ontogenéticos en estas plantas. No obstante, los resultados conseguidos son alentadores y cumplen con el propósito de aportar conocimiento a la biología de estas plantas relictos sobrevivientes del pasado.

LITERATURA CITADA

- Alejandro Rosas, J. A., Sánchez Tinoco, M. Y., & Vázquez Torres, S. M. (1990). Estructura poblacional de *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae) en un bosque del centro de Veracruz. *La Ciencia y el Hombre*, 5,93-111.
- Andrews, H. N. Jr. (1961). *Studies in Paleobotany*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Bierhorst, D. W. (1971). *Morphology of Vascular Plants*. New York: The Macmillan Company.
- Bold, H. C. (1973). *Morphology of Plants*. New York: Harper & Row Publishers.
- Brenner, E. D., Stevenson, D. W. & Twigg, R. W. (2003). Cycads: evolutionary innovations and the role of plant-derived neurotoxins. *Trends in Plant Science*, 8(9), 446-452.
- Brough, P. & Taylor, M. H. (1940). An investigation of the life cycle of *Macrozamia spiralis* Miq. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 65, 494-524.
- Calonje M, Stevenson D. W. & Osborne R. The World List of Cycads, online edition [Internet]. (2013-2023). <http://www.cycadlist.org>. (Consultada el 18 de febrero de 2023).
- Chamberlain, C. J. (1906). The ovule and female gametophyte of *Dioon*. *Botanical Gazette*, 27, 321-358.
- Chamberlain, C. J. (1909). Spermatogenesis in *Dioon edule*. *Botanical Gazette*, 47, 215-236.
- Chamberlain, C. J. (1910). Fertilization and embryogeny in *Dioon edule*. *Botanical Gazette*, 50, 415-429.
- Chamberlain, C. J. (1912). Morphology of *Ceratozamia*. *Botanical Gazette*, 53, 1-19.
- Chamberlain, C. J. (1913). *Macrozamia moorei*, a connecting link between living and fossil cycads. *Botanical Gazette*, 55, 141-154.
- Chamberlain, C. J. (1916). *Stangeria paradoxa*. *Botanical Gazette*, 61, 353-372.
- Chamberlain, C. J. (1919). *The Living Cycads*. New York: Hafner Publishing Co.
- Chamberlain, C. J. (1935). *Gymnosperms. Structure and Evolution*. Chicago Illinois: The University of Chicago Press.
- Christenhusz, M., Reveal, J., Farjon, A., Gardner, M. F., Mill, R. R. & Chase, M. (2011). A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa*, 19, 55–70.
- Coulter, J. M. & Chamberlain, C. J. (1903). The embryogeny of *Zamia*. *Botanical Gazette*, 35,184-194.

- Coulter, J. M. & Chamberlain, C. J. (1910). *Morphology of Gymnosperms*. Chicago. Illinois: University of Chicago Press.
- Corner, E. J. H. (1976). *The Seeds of the Dicotyledons*. Vol 2. London: Cambridge University Press.
- Corner, E. J. H. (1992). The pachychalaza in dicotyledons: primitive or advanced? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 108 (1), 15–19.
- Crane, P. R. (1985). Phylogenetic relationships in seed plants. *Cladistics*, 1(4), 329-348.
- Crane, P. R. (1988). Major clades and relationships in the "higher" gymnosperms. In Beck C. B. (Ed.), *Origin and Evolution of Gymnosperms* (pp. 218-271). New York: Columbia University Press,
- Cronquist, A. (1977). *Introducción a la Botánica*. México: C.E.C.S.A.,
- De Silva, B. L. T. & Tambiah, M.S. (1952). A contribution to the life history of *Cycas rumphii* Miq. *The Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*, 12,1-22.
- De Sloover, J. L. (1961). Études sur les Cycadales I. Méiose et mégasporogénèse chez *Encephalartos poggei* Asch. *Cellule*, 52, 105-116.
- De Sloover, J. L. (1963). Etudes sur les Cycadales – III. Nucelli, gametophyte femelle et embryon chez *Encephalartos poggei* Asch. *Cellule*, 64, 149–
- De Sloover, J. L. (1964). Études sur les Cycadales. III. Nucelle, gamétophyte femelle et embryon chez *Encephalartos poggei* Asch. *Cellule*, 64, 149-200.
- Dehgan, B. & Johnson, C. R. (1983). Improved seed germination of *Zamia floridana* (sensu lato) with H₂SO₄ and GA₃. *Scientia Horticulturae*, 19, 357-361.
- Dogra, P. D. (1992). Embryogeny of primitive Gymnosperms *Ginkgo* and Cycads Proembryo-basal plan and evolutionary trends. *Phytomorphology*, 42(3,4), 157-184.
- Dorety, H. A. (1908a). The embryo of *Ceratozamia*: A physiological study. *Botanical Gazette*, 45(6), 412-416.
- Dorety, H. A. (1908b) The seedling of *Ceratozamia*. *Botanical Gazette*, 46, 203-220.
- Doyle, J. (1963). Proembryogeny in *Pinus* in relation to that in other conifers -a survey. *Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B*, 62, 181-216.
- Doyle, J. A. & Donoghue, M. J. (1986). Seed plant phylogeny and the origin of angiosperms: An experimental cladistic approach. *Botanical Review*, 52, 321-431.
- Erdtman, G. (1965). *Pollen and Spore Morphology /Plant Taxonomy: Gymnospermae, Pteridophyta and Bryophyta*. Stockholm and New York: Almqvist and Wiksells.
- Esau, K. (1982). *Anatomía de las Plantas con Semilla*. Buenos Aires: Hemisferio Sur.

- Favre-Duchartre, M. (1957). Contribution à l'étude de la reproduction chez *Cephalotaxus drupacea*. *Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales*, 18, 305–343.
- Foster A. S. & E. M. Gifford. (1974). *Comparative Morphology of Vascular Plants*. 2nd Edition. New York: W. H. Freeman and Company.
- Gifford, E. M. & Foster, A. S. (1989). *Morphology and Evolution of Vascular Plants*. 3rd edn. New York: W. H. Freeman and Company.
- Graham, L. E. (1985). The Origin of the Life Cycle of Land Plants: A simple modification in the life cycle of an extinct green alga is the likely origin of the first land plants. *American Scientist*, 73(2), 178–186. <http://www.jstor.org/stable/27853160>
- González-Astorga J., Medina-Villarreal A., y Espinosa de los Monteros, A. (2018). El ritmo de la evolución de las cícadas del género *Ceratozamia*. *Desde el Herbario CICY* 11, 148–155.
- Gómez-Pompa, A. (1978). *Ecología de la vegetación de Veracruz*. México: C.E.C.S.A.
- Google (s.f.). [Localizador de Google Earth para ubicar las localidades de Coacotzintla, Monte Oscuro y Ciénega del Sur, Veracruz, México].
- Grilli Caiola, M. (1990). Structural arrangement of phycobionts in coralloid roots of Cycads. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 57, 94-103.
- Hann-Chung, L. & Yu-Fen, W. (2001). Development of ovulate cones from initiation of reproductive buds to fertilization in *Cephalotaxus wilsoniana* Hay. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China*, (B) 25, 97-118.
- Ikeno, S. (1896). Spermatozoiden von *Cycas revoluta*. *Botanical Magazine-Tokyo*, 10, 367-368.
- Kenrick, P. & Crane, P. R. (1997). *The Origin and Early Diversification of Land Plants: a Cladistic Study*. Washington: Smithsonian Institution Press.
- Lawson, A. A. (1926). A contribution to the life history of *Bowenia*. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 54, 357-394.
- Lindblad, P. & Bergman B. (1990). The cycad-cyanobacterial symbiosis. In Raid, A. N. (Ed.), *CRC Handbook of Symbiotic Cyanobacteria* (pp. 137-159). Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Lindstrom, A. J. (2009). Typification of some species names in *Zamia* L. (Zamiaceae), with an assessment of the status of *Chigua* D. Stev. *Taxon*, 58(1), 265-270.
- Little, S. A., Prior, N., Pirone, C., & P. von Aderkas, P. (2014). Pollen-ovule interactions in gymnosperms. In Ramatt, K., Mérillon, J., & Shivanna, K. (Eds.), *Reproductive Biology of Plants* (pp. 97-111). Boca Raton: CRC Press.

- Loconte, H. & Stevenson, D. W. (1990). Cladistic of the spermatophyta. *Brittonia*, 42, 197-211.
- Maheshwari, P. & Singh, H. (1967). The female gametophyte of gymnosperms. *Biological Review*, 42, 88-130.
- Mauseth, J. D. (1988). *Plant Anatomy*. The Benjamin/Cummings Publishing, Company, Inc.
- Meeuse, A. D. J. (1974). Megasporangium, nucellus, ovule and premen: their nomenclature and homology. *Acta Botanica Neerlandica*, 23(4), 493-503.
- Meeuse, A. D. J. & Bouman, F. (1974). The inner integument its probable origin and homology. *Acta Botanica Neerlandica*, 23(3), 237-249.
- Miranda, F., & Hernández-X, E. (1963). Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Botanical Sciences*, (28), 29-179.
- Nagalingum, N. S., Marshall, C. R., Quental, T. B., Rai, H. S., Little, D.P. & Mathews, S. (2011). Recent synchronous radiation of the living fossil. *Science*, 334, 796-799.
- Niklas, K. J. & Norstog, K. (1984). Aerodynamics and pollen grain depositional patterns of *cycad megastrobili*: implications on the reproduction on three *cycad genera* (*Cycas*, *Dioon*, *Zamia*). *Botanical Gazette*, 145, 92-104.
- Norstog, K. (1967). Fine structure of the spermatozoid of *Zamia* with special reference to the flagellar apparatus. *American Journal of Botany*, 54, 831-840.
- Norstog, K. (1972). Role of archegonial neck cells of *Zamia* and other cycads. *Phytomorphology*, 22, 125-130.
- Norstog, K. (1977). The spermatozoid of *Zamia chigua* Seem. *Botanical Gazette*, 138 (4), 409-412.
- Norstog, K. (1986). The blepharoplast of *Zamia pumila* L. *Botanical Gazette*, 147, 40-46.
- Norstog, K. (1990). Studies of cycad reproduction at Fairchild Tropical Garden. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 57, 63-81.
- Norstog, K., & Stevenson, W. D. (1980). Wind? Or insects? The pollination of cycads. *Fairchild Tropical Garden Bulletin*, 35(1), 29-30.
- Norstog, K. J. & Nicholls, T. J. (1997). *The Biology of the Cycads*. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Ogura, Y. (1967). History of the discovery of spermatozoids of *Ginkgo biloba* and *Cycas revoluta*. *Phytomorphology*, 17, 109-114.
- Ordóñez-Balderas, J. R. (2011). Histoquímica del gametofito femenino de *Zamia furfuracea* L. f. (Cycadales). [Tesis Licenciatura, Universidad Veracruzana].

- Osborne, R., Calonje, M. A., Hill, K. D., Stanberg, L. & Stevenson, D. W. (2012). The world list of cycads. *Memoirs of the New York Botanical Gardens*, 106, 480-510.
- Owens, J. N., Catalano, G. L. & Aitken -Christie, J. (1997). The reproductive biology of kauri (*Agathis australis*). IV. Late embryogeny, histochemistry, cone and seed morphology. *International Journal of Plant Sciences*, 158(4), 395-407.
- Pant, D. D. (1973). *Cycas and Cycadales*. Allahabad: Central Book Depot.
- Pérez-Farrera, M. A. & Vovides, A. P. (1997). *Manual para el cultivo y propagación de cycadas*. México, D.F.: INE SEMARNAP.
- Pérez-Farrera, M. A., Vovides, A. P., Octavio-Aguilar, P., González-Astorga, J., Cruz-Rodríguez, J., Hernández-Jonapá, R. & Villalobos-Méndez, S. (2006). Demography of the cycad *Ceratozamia mirandae* (Zamiaceae) under disturbed and undisturbed conditions in a biosphere reserve of México. *Plant Ecology*, 187, 97-108.
- Quisumbing, E. (1925). Stony layer in seeds of gymnosperms. *Botanical Gazette*, 59, 121-195.
- Rzedowski, J. (1978). *Vegetación de México*. México: Editorial Limusa
- Sánchez-Tinoco, M. Y. (1988). *Estudio morfológico de una población de Ceratozamia mexicana Brongn.* (Zamiaceae). [Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana].
- Sánchez-Tinoco, M. Y. (1998). *Aspectos anatómicos de la semilla de Ceratozamia mexicana (Cycadales)*. [Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados].
- Sánchez-Tinoco, M. Y., Engleman, E. M. & Vovides, A. P. (2000). Cronología reproductora de *Ceratozamia mexicana* (Cycadales). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 66, 15-23.
- Sánchez-Tinoco, M. Y. & Engleman, E. M. (2004). Seed coat anatomy of *Ceratozamia mexicana* (Cycadales). *The Botanical Review*, 70(1), 24-38.
- Sánchez-Tinoco, M. Y., Engleman, E.M. & Koch, S.D. (2007). The vascularization of the Seed of *Ceratozamia mexicana* (Zamiaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 97, 223–235.
- Sánchez-Tinoco, M. Y., Ordóñez-Balderas, J. R. & Engleman, E. M. (2012). Starch accumulation in the megagametophyte of *Ceratozamia mexicana* Brongn. and *Zamia furfuracea* L. f. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 106, 251-262.
- Sánchez-Tinoco, M. Y., Engleman E. M. & Vovides, A. P. (2018a). Anatomical description of the cytoplasmic connections between the central cell and transfer cells in *Ceratozamia mexicana* Brongn., and *Zamia furfuracea* L.f. (Cycadales). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 117, 32-43.

- Sánchez-Tinoco, M. Y., Engleman, E. M. & Vovides, A. P. (2018b). Development cycle of the ovule and seed of *Zamia furfuracea* L. f. (Cycadales). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 117, 43-53.
- Sánchez-Tinoco, M. Y., Stevenson, D. W., Vovides, A. P., Alonso, A. L., Hernández-Zárate, G., Iglesias-Andreu, L. G. & García-Moya, E. (2022). Salient ovule features of *Zamia furfuracea* L. fil.: Early stages of megagametophytogenesis. *Flora*, 296, 152-168.
- Sass, J. E. (1958). *Botanical Microtechnique*. 3rd Ed. Ames, Iowa: State University.
- Saxton, W. T. (1910). The development of the embryo of *Encephalartos*. *Botanical Gazette* 49, 13-18.
- Scagel, R., Bandoni, J., Rouse, G. E., Schofield, W. B., Stein, J. R., & Taylor, T. M. C. (1987). *El Reino Vegetal*. Barcelona, España: Editorial Omega.
- Schnarf, K. (1933). *Embryologie Der Gymnospermen*. Vol.10. Berlin:Gebrüder Borntraeger.
- Singh, H. (1961). The life history and systematic position of *Cephalotaxus drupacea* Sieb. et Zucc. *Phytomorphology*, 11, 153-197.
- Singh, H. (1978). Embryology of Gymnosperms. *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Spezieller Teil. Band X. Te Borntraeger, Berlin, 302, 230-241. 262-287.
- Singh, H. & Johri B. M. (1972). Development of gymnosperm seeds. In Kozłowski T.T. (Ed.), *Seed Biology* (pp. 22-69), Vol 1. New York and London: Academic Press.
- Smith, F. G. (1910). Development of the ovulate strobilus and young ovule of *Zamia floridana*. *Botanical Gazette*, 50, 128-141.
- Smith, G. M. (1955). *Cryptogamic botany. 2. Bryophytes and pteridophytes*. 2nd. Ed. New York: McGraw-Hill.
- Smith, G. S. (1978). Seed scarification to speed germination of ornamental cycads (*Zamia* spp.). *HortScience*, 13(4), 436-438.
- Sokolowa, C. (1890). Naissance De L'endosperme Dans Le Sac Embryonnaire De Quelques Gymnospermes. *Byulleten Moskovskogo Obshechestva Ispytatelei Prirody*. N.S, 4, 446-447.
- Sporne, K. R. (1965). *The morphology of gymnosperms*. 2nd. Ed. London: Hutchinson University Library.
- Stevenson, D. W. (1980). Radial growth in the Cycadales. *American Journal of Botany*, 67(4), 465-478.
- Stevenson, D. W. (1981). Observations on ptyxis, phenology, and trichomes in the Cycadales and their systematic implications. *American Journal of Botany*, 68(8), 1104-1114.

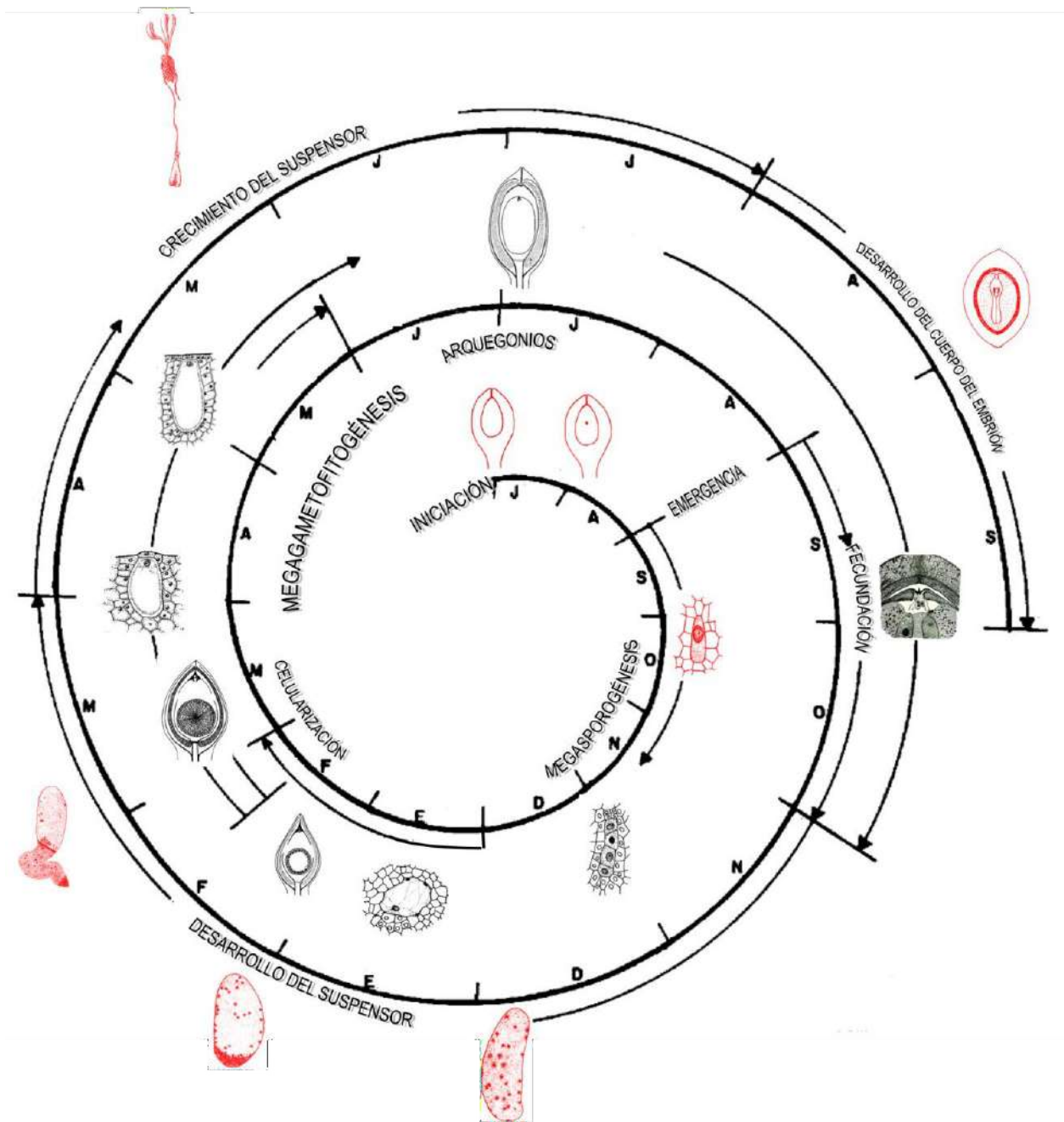
- Stevenson, D. W. (1988). Strobilar ontogeny in the Cycadales. In Leins, P., Tucker, S. & Endress, P. K. (Eds.), *Aspects of floral development* (pp 205-224). Berlin: J. Cramer.
- Stevenson, D. W. (1990). Morphology and systematics of the Cycadales. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 57, 8-55.
- Stevenson, D. W., Norstog, K. J., & Molsen, D. V. (1996). Midribs of cycad pinnae. *Brittonia*, 48, 67-74.
- Stevenson, D. W. (2020). Observations on vegetative branching in cycads. *International Journal of Plant Sciences*. 18, 564–580.
- Steyn, E. M. A., & Strydom, D. J. F. (1993). The nucellus: Its position and function in the ovule of *Encephalartos*. *Encephalartos* 35, 14-18.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., & Schimper, A. F. W. (1994). *Tratado de Botánica*. 8va. Edición. Barcelona, España: Editorial Omega.
- Swamy, B. G. L. (1948). Contribution to the life history of a *Cycas* from Mysore (India). *American Journal of Botany*. 35, 77–88.
- Takhtajan, A. L. (1981). *Flowering Plants. Origin and Dispersal*. (Translated from the Russian). Bishen Singh Mahendra Pal Singh & Otto Koeltz Science Publishers.
- Tang, W. (1987). Insect pollination in the cycad *Zamia pumila* (*Zamiaceae*). *American Journal of Botany*, 74(1), 90-99.
- Tang, W., Skelley, P. & Pérez-Farrera M. A. (2018). *Ceratophila*, a new genus of erotylid beetles (*Erotylidae: Pharaxonothinae*) inhabiting male cones of the cycad *Ceratozamia* (Cycadales: *Zamiaceae*). *Zootaxa* 4508, 151–178.
- Trejo-Vázquez, I. (1999). El clima de la selva baja caducifolia en México. *Investigaciones geográficas*, (39), 40-52.
- von Aderkas, P., Little, S., Nepi, M., Guarnieri, M., Antony, M., & Takaso, T. (2022). Composition of sexual fluids in *Cycas revoluta* ovules during pollination and fertilization. *Botanical Review*, 88, 453-484.
- Vovides, A. P. (1991). Cone idioblasts of eleven cycad genera: morphology, distribution, and significance. *Botanical Gazette*, 152(1), 91-99.
- Vovides, A. P. (2000). México: segundo lugar mundial en diversidad de cícadas. *Biodiversitas*, 6(31), 6-10.
- Vovides, A. P., Rees, J. D., & Vázquez Torres, M. (1983). *Zamiaceae. Flora de Veracruz*, Fascículo 26.
- Vovides, A. P. & Peters, C. (1987). *Dioon edule*: La planta más antigua de México. *Ciencia y Desarrollo*, 13 (73), 19-24.

- Vovides, A. P. & Iglesias, C. G. (1994). An integrated conservation strategy for the cycad *Dioon edule* Lindl. *Biodiversity & Conservation*, 3(2), 137-141.
- Vovides A. P., Iglesias, C. G., Pérez-Farrera, M. A.; Vázquez, M. & Schippman, U. (2002). Peasant nurseries: a concept for an integrated conservation strategy for cycads in Mexico. In Maunder, M., Clubbe, C., Hankamer, C. & Groves, M. (Eds.), *Plant conservation in the tropics: perspectives and practice* (421-444). Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Vovides, A. P., Pérez-Farrera, M. A. & Iglesias, C. G. (2010). Cycad propagation by rural nurseries in Mexico as an alternative conservation strategy: 20 years on. The Board Trustees of the Royal Botanic Gardens. *Kew Bulletin*, 7(65), 603-611.
- Vovides, A. P., Stevenson, D. W., Pérez-Farrera, M. A., López, S., & Avendaño, S. (2016). What is *Ceratozamia mexicana* (Zamiaceae)? *Botanical Sciences*, 94(2), 419–429.
- Wang, D., Lu, Y., Zhang, M., Lu, Z., Luo, K., Cheng, F., & Wang, L. (2014). Structure and function of the neck cell during fertilization in *Ginkgo biloba* L. *Trees*, 28, 995-1005.
- Webber, H. J. (1901). Spermatogenesis and fecundation of *Zamia*. *United States Department of Agriculture Bureau of Plant Industry Bulletin*, 2, 1-100.
- Whitelock, L. M. (2002). *The cycads*. Portland, Oregon: Timber Press.
- Worsdell, W. C. (1898). The comparative anatomy of certain genera of the Cycadaceae. *The Journal of the Linnean Society*, 33, 437-456.
- Zhang, X. (2019). Ovule development in Cycads: observation on anatomy and nucellus morphology in *Zamia* and *Cycas*. *bioRxiv*, 735-837.
- Zhang, Z., Clayton, S.C., Cui, K., & Lee, C. (2013). Developmental synchronization of male and female gametophytes in *Ginkgo biloba* and its neck mother cell division before fertilization. *Physiologia Plantarum*, 147, 541-552.
- Zhifeng, G., & Thomas, B. A. (1989). A review of fossil cycad megasporophylls, with new evidence of *Crossozamia* Pomel and its associated leaves from the Lower Permian of Taiyuan, China. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 60(3-4), 205-223.
- Zumajo-Cardona, C., Frangos, S., & Stevenson, D. W. (2021). Seed anatomy and development in cycads and *Ginkgo*, keys for understanding the evolution of seeds. *Flora*, 285, 151951.

ANEXOS

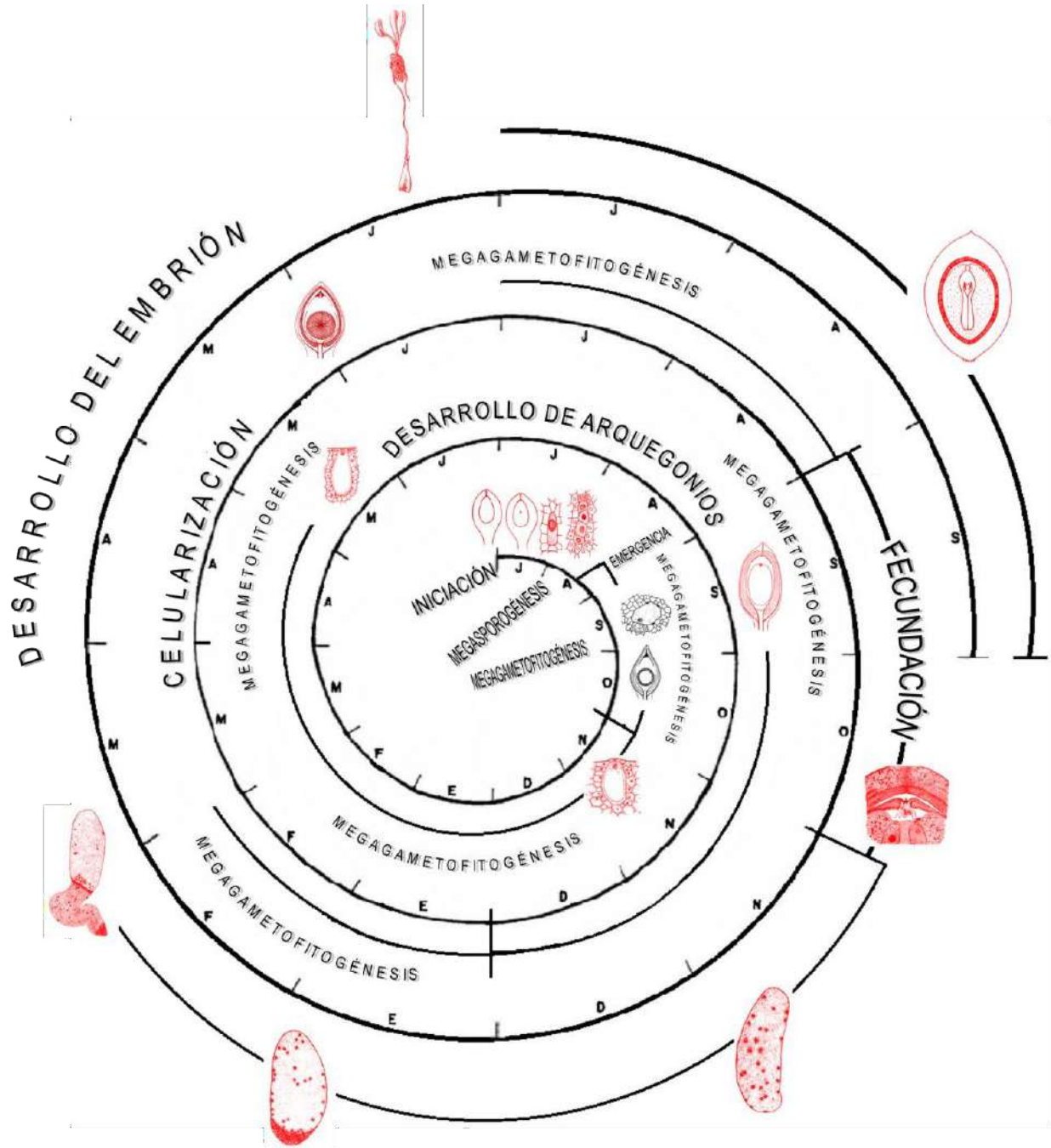
Anexo A

Representación gráfica del ciclo reproductor de *C. tenuis*.



Anexo B

Representación gráfica del ciclo reproductor de *D. edule*.



Anexo C

Representación gráfica del ciclo reproductor de *Z. furfuracea*

