# UNIVERSIDAD DE COSTA RICA FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE BIOLOGIA

ESTUDIO DE LA SEMILLA Y DEL DESARROLLO

DEL EMBRION EN Bixa orellana L., Bixaceae (ACHIOTE)

**TESIS DE GRADO** 

Dora Ingrid A. Rivera Luther

# ESTUDIO DE LA SEMILLA Y DEL DESARROLLO DEL EMBRION EN Bixa orellana L., Bixaceae (ACHIOTE)

TESIS:

Presentada en la Escuela de Biología

APROBADA:

Eugenia Ma. Flores V., Ph. D. Directora de Investigación

Miembro Tribunal

Luis A. Fournier O., Ph. D.

Miembro Tribunal

Miembro Tribunal

Miembro Tribunal

Rivera buther

Sustentante

#### SEREDECTMIENTO

Lapreza de la Marmela de Mislogía y Directora de dete Lención, por todos sus consejos, el estículo y apoyo Lención, por todos sus consejos, el estículo y apoyo Len en tedo posento y por la sensiona cavisión del La uniginal y su insatimable ayuns en la japresión del La fotográfico.

Ja Lie. María Engania Sarahuna C., Missbro del Tri-

Lin Lie, Maryania Measur C.; M. No. Julium Carranga

La les de microscopia electrónica, el procedentento

licitate la fotográfico, revoludo e impressón de las fo
les les la obtensión de les fotoga mis padres ejemple-

Un bonel trabajo de microscopia electrónica.

Al amendero Gerardo Rojas Herreta por la venlimeción de las fotogratias de minrospopia de luz.

#### **AGRADECIMIENTO**

Expreso mi agradecimiento a la Dra. Eugenia M. Flores V., Directora de la Escuela de Biología y Directora de ésta Investigación, por todos sus consejos, el estímulo y apoyo brindado en todo momento y por la acuciosa revisión del texto original y su inestimable ayuda en la impresión del material fotográfico.

Universited do Costa Rica, per las familicades en el

A la Lic. María Eugenia Barahona C., Miembro del Tribunal, por sus valiosos consejos y la revisión del texto original.

A la Lie. Maryssia Nassar C.; M. Sc. Julieta Carranza V., Dr. Luis A. Fournier O., Miembros del Tribunal, por sus sugerencias y revisión del texto original.

Al compañero Walter Marín Méndez, por la realización del trabajo de microscopía electrónica, el procesamiento del material fotográfico, revelado e impresión de las fotografías, la obtención de las fotografías de los ejemplares y por toda su valiosa ayuda y apoyo brindado.

A la compañera Alicia L. Chacón Leandro por su ayuda en el trabajo de microscopía electrónica.

Al compañero Gerardo Rojas Herrera por la realización de las fotografías de microscopía de luz.

Al personal de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica, por las facilidades en el uso del equipo y asesoría técnica, en especial al Dr. Osamu Puse.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

Blue orginary to commence of the contract of

A todos muchas gracias

# THE THE REST LES AND LES AND LES THE PROPERTY OF

		Página
ı.	Introducción	1
II.	Revisión de Literatura	2
	A. Descripción del género	3
	B. Estructura de la semilla de	
	las dicotiledóneas	6
	C. Desarrollo de la semilla de	
2 7 7	Bixa orellana	7
III.	Materiales y métodos	9
IV.	Resultados	12
	A. Descripción de la planta	12
	B. Desarrollo del meristema apical	17
	C. Estructura de los cotiledones	21
	D. Desarrollo del hipocotilo	30
	E. Desarrollo de la radícula	35
	F. Cubierta seminal (testa)	40
v.	Discusión	48
	A. Desarrollo de los cotiledones	48
	B. Desarrollo del ápice	51
	C. Desarrollo del hipocotilo	52
	D. Desarrollo de la radicula	53
	E. Cubierta seminal	55
VI.	Resúmen	57
VII	Ribliograffa	ER

ESTUDIO DE LA SEMILLA Y DEL DESARROLLO DEL EMBRION
EN Bixa orellana L., Bixaceae (ACHIOTE)

acia, so decidió reslimar ob presente estudio,

# I. INTRODUCCION

Bixa orellana L. es una planta de creciente importancia económica. El pigmento que se extrae de sus semillas es un buen sustituto de algunos colorantes sintéticos, que potencialmente son tóxicos o carcinogénicos, ya que se ha probado que la bixina, principal componente del pigmento, no produce ninguno de esos efectos. En la actualidad se utiliza a nivel industrial como colorante de quesos, mantequilla y algunos otros productos como cera para pisos y muebles y betún para calzado. Tiene algún uso en la industria de los cosméticos y también uno muy amplio como colorante de diversas comidas (Ingram y Francis, 1969; Kennard y Winters, 1963; Pittier, 1978). Se utiliza muy poco para la tinción de telas porque su color se pierde rápidamente al exponerse a la luz; sin embargo se emplea en la tinción de algunas fibras naturales. Es una buena fuente de carotenos, provitamina A. (Ampiée, 1956) y en algunos lugares se añade a concentrados para gallinas porque le da una coloración amarillo-ámbar a la yema de los huevos (Araya et al, 1977). Con menor frecuencia se utiliza como especie ornamental y para la formación de setos (Dendy, 1966; Ingram y Francis, 1969; Jiménez, 1947; Riel y Gibson, 1958).

En vista de la importancia económica de las semillas de esta especie, se decidió realizar el presente estudio, cuyos tres objetivos básicos son:

- 1) describir la estructura de la semilla;
- 2) estudiar el desarrollo del embrión durante la germinación;
- determinar las capas celulares en que se acumula el pigmento.

Se espera que esta contribución sea de utilidad para otras investigaciones futuras destinadas a mejorar el conocimiento de esta especie.

periode su principal componente la bixina, soluble en

pi mentota en un árhel pequeño, de ramitioneida siso-

resta laviationes con loter de color emerlila-narente. La

Dentimere, regulares, antinomórficas, bisexun-

and there's (proper y hour, 1965). Cade flor stems 4-5 edge-

Tori - Lambo, decidios, concavos y son estructuras same

#### II. REVISION DE LITERATURA

#### A. DESCRIPCION DEL GENERO

Bixa orelliana L. (achiote), es una especie del único género de una pequeña familia tropical, Bixaceae, que se extiende desde México hasta Brasil. Se piensa que su orfgen es amazónico (León, 1968); en la actualidad se encuentra muy distribuido, mayormente en las regiones tropicales (Jiménez, 1947). Se le conoce en todo el mundo por su uso generalizado como colorante para alimentos, tanto en forma doméstica como industrial (Ingram y Francis, 1969; Jiménez, 1947; Kennard y Winters, 1963; Pittier, 1978). El pigmento se encuentra localizado sobre la cubierta seminal siendo su principal componente la bixina, soluble en la mayorfa de los solventes y de coloración rojo-amarillenta.

El achiote es un árbol pequeño, de ramificación dicotómica, hojas simples, estipuladas, alternas, de forma deltoide, con nervadura palmeada. Posee estructuras secretoras y laticíferos con latex de color amarillo-naranja. Las
flores son pentámeras, regulares, actinomórficas, bisexuales, de color rosado o blanco, dependiendo de la variedad,
agrupadas en panículas determinadas con un número variable
de flores (Chopra y Kaur, 1965). Cada flor tiene 4-5 sépalos, imbricados, deciduos, cóncavos y con estructuras seme-

jantes a glándulas en la base; los pétalos son grandes, imbricados, con una escama externa en la base (Hutchinson, La antesis de las flores es escalonada a lo largo 1959). de la inflorescencia, observándose al mismo tiempo, frutos en diferentes fases de desarrollo, flores y primordios flo-El gineceo es de ovario súpero, unilocular, bicarpelar, sincárpico y de placentación parietal. es delgado y recurvado en el brote y el estigma es bilobu-El androceo es polistémono, de desarrollo centrífugo, con filamentos de diferentes longitudes; las anteras son basifijas con forma de herradura (Chopra y Kaur, 1965; Hutchinson, 1969) y de dehiscencia longitudinal. El fruto es una capsula dehiscente, que se abre en dos valvas, exponiendo las semillas que se encuentran sobre dos placentas papiráceas; la forma del fruto es redondeada o alargada y su superficie se encuentra cubierta por numerosas emergencias. Las semillas son piriformes y están cubiertas por un tegumento de color rojizo y contienen endosperma abundante y oleoso (Hutchinson, 1959, 1969; Lawrence, 1951; León, 1968; Standley, 1923, 1937), su número varía de 10 a 50 por fruto.

En el tallo los elementos de los vasos son moderadamente pequeños, con numerosas perforaciones simples y
puntuaciones alternas diminutas. El parenquima es apotraqueal; se encuentran rayos dilatados de 1-3 células de

ancho y fibras cortas con puntuaciones rebordeadas. El floema, en sección transversal, forma cordones separados unos de otros por las terminaciones distales de los rayos medulares; la porción más ancha de cada rayo está en contacto con el esclerénquima del periciclo. El floema es estratificado en capas alternas densas y flojas. El xilema forma un cilindro atravesado por rayos angostos. Hay canales secretores presentes en la médula y células secretoras en la porción externa de la corteza (Metcalfe y Chalk, 1950).

Br.

i

k

La hoja presenta tricomas peltados o pequeños penachos formados por grupos de tricomas unicelulares. La lámina foliar es hipoestomática, con estomas anomocíticos con una densidad de 115 por mm² (Metcalfe y Chalk, 1950). Los peciolos son cilíndricos; en sección transversal tienen una banda contínua de esclerénquima, externa al haz vascular. Este posee un anillo de floema externo que interrumpe el xilema. Dentro del haz vascular hay una masa central de parénquima. Hay células secretoras presentes en el mesofilo de la hoja y en los tejidos periféricos del peciolo y abundantes cristales de oxalato de calcio en hojas, peciolos, corteza y médula del tallo (Metcalfe y Chalk, 1950).

El endosperma de la semilla es nuclear; la formación de paredes se inicia en el extremo micropilar, formando una

masa de tejido celular debido a rápida deposición de paredes. En la madurez, las células del endosperma contienen
abundantes gránulos de almidón, excepto en una o dos de las
capas externas. La embriogenia no ocurre conforme a ningún tipo reconocido (Chopra y Kaur, 1965).

#### B. ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE LAS DICOTILEDONEAS

El embrión consta de un eje, que lleva en un extremo el meristema radical y en el otro los cotiledones y el incipiente epicotilo. Por lo general, se desarrolla una caliptra en el ápice radical. Normalmente se diferencia en el embrión un sistema procambial que se continúa a lo largo del hipocótilo y los cotiledones; algunos elementos vasculares pueden madurar en el embrión antes de que germine la semilla (Esau, 1977). El embrión es de forma espatulada y ocupa una posición central (axil) en la semilla (Esau, 1977), con los cotiledones hacia la porción más ancha.

En la semilla madura se distinguen las siguientes partes: embrión, endosperma y testa, que es la cubierta seminal y se forma de los tegumentos. Los rudimentos seminales de las angiospermas tienen uno o dos tegumentos; todas
las partes de uno o de ambos tegumentos pueden intervenir
en la formación de la testa. La cubierta seminal varía
en estructura en relación con la estructura específica del

rudimento seminal, tal como el número y grosor de los tegumentos, el patrón de vascularización y los cambios en el desarrollo de los tegumentos durante la maduración de la semilla. La cubierta seminal o testa sirve de protección al embrión, pero en algunas semillas también interviene en el control de la germinación. Cuando la testa alcanza su grosor máximo, se evidencian dos cutículas, una situada en el límite entre el tegumento interno y el externo y otra entre el tegumento interno y el tejido nucelar adyacente. También existe una cutícula externa que protege al tegumento externo del ambiente. Cuando la semilla madura, las dos capas de células que representan el tegumento interno se desintegran y las dos cutículas quedan juntas. Como resultado, la testa de la semilla madura consiste de una epidermis con células de paredes gruesas seguida de una zona de arreglo irregular con células de paredes delgadas que derivan del tegumento externo; el límite interno está representado por las dos cutículas (Esau, 1977; Fahn, 1978; Foster y Giford, 1974).

### C. DESARROLLO DE LA SEMILLA DE BIXA ORELLANA

En Bixa, los rudimentos seminales son anátropos y bitégmicos. En general, se diferencia sólo una célula arquespórica. Las tétradas son de tipo lineal y la megáspora calazal es la que forma el saco embrional. La célula

huevo ocupa una posición lateral y los núcleos polares de la célula central se fusionan al mismo tiempo con uno de las células espermáticas. Las antípodas degeneran antes de la fertilización, pero los remanentes persisten hasta que hay formación globular del proembrión. La fertilización se lleva a cabo por porogamia, la singamia y la formación del endosperma ocurren simultáneamente. En la semi-11a madura se pueden encontrar 7-8 capas de tejidos; en la región calazal estas capas están ordenadas de la manera siguiente: el tegumento externo tiene: una epidermis externa, parénquima con numerosas células que contienen pigmento y la capa interna con invaginaciones a lo largo del tegumento interno, formando una estructura en forma de "5"; en el tegumento interno, la capa externa consiste de células de pared gruesa, semejando una empalizada, una capa hipodérmica llena de taninos, 3-4 capas de células de parénquima, otra capa hipodérmica y una capa interna de células llenas de taninos formando un tejido abultado en el extremo distal (Chopra y Kaur, 1965).

di

Mb.

la porte e se invillaré en parefine (Perspiant de ponte de

(1743) y an sections = 12 me en un wierdiene prais-

the area of the section of section of the section o

ins-acets-alcohol (Johanson, 1980),

#### III. MATERIALES Y METODOS

Se colectó frutos maduros de Bixa orellana L. (achiote), en varias localidades escogidas al azar en Alajuela, Heredia, Turrialba y Guanacaste; en todos los casos se escogieron frutos provenientes de plantas indígenas. Las semillas se pusieron a germinar en cajas de Petri, sobre papel de filtro humedecido con agua destilada, previo tratamiento de imbibición de 48 horas. Se hicieron 10 ensayos con 50 semillas cada uno e incubándose a temperatura ambiente. Durante 12 días se fijó diariamente 10 semillas que presentaran crecimiento similar; éste se calculó por la longitud de la radícula. De cada colecta se dejó 5 semillas como testigo y se disectó las otras 5 para extraerles el embrión. De esta manera se obtuvieron 12 estadíos, desde el inicio de la germinación, considerando como inicio de la misma la primera manifestación de la aparición de la radícula, hasta el estadío previo a la emergencia de los cotiledones.

Se fijó en Formalina-Aceto-Alcohol (Johansen, 1940), se deshidrató en una serie ascendente de alcohol butílico terciario y se infiltró en parafina (Paraplast de punto de fusión de 56-57°C). Se tiñó siguiendo la tecnica de Sharman (1943) y se seccionó a 12 um en un micrótomo rotatorio Richter. Se seccionó semillas fijadas sin germinar

y en los primeros estadíos de desarrollo practicándose cortes longitudinales y transversales. Se hizo cortes paradermales, longitudinales y transversales de los embriones; en los estadíos del 3 al 12 se seccionaron en dos, tres o cuatro partes por tener la radícula e hipocotilo muy largos. Se obtuvieron fotografías de algunos de los cortes utilizando película Kodak Panatonic FX-135. Para completar las ilustraciones se utilizó una cámara lúcida Olympus EH-DA adaptada a un microscopio Olympus CHB.

Para el estudio de estructuras con el microscopio electrónico de barrido, se fijó algunas de las semillas y embriones en glutaraldehido al 4% y posteriormente se deshidrataron en una serie de alcohol etílico y acetato de amilo. Las muestras deshidratadas se colocaron en un sonicador Sharp UT-52 durante 3 segundos para eliminar todas las
impurezas de la superficie y luego se llevaron al punto de
secado crítico con CO<sub>2</sub> en un desecador Hitachi HCP-1. Estas fueron cubiertas con una capa de oro durante 6 minutos
en un cobertor iónico EIKO 18-3. Las observaciones se hicieron con un microscopio electrónico de barrido (MEB) Hitachi HHS-2R y se tomaron fotografías empleando película Verichrome Pan Kodak VP-120.

También se obtuvieron fotografías de la planta completa, frutos y flores, utilizando los ejemplares cultivados en la Estación Experimental "Fabio Baudrit", de la Universidad de Costa Rica. Para la obtención de éstas se utilizó película Agfa de 35 mm.

pur portions at an arbel de tella pequena a mediana, pur purce sedir de ) a 3 metros de altura. La ramificamusa del tella en dioctómica, imiciándose desde la base comusa manerente en la figura 1A. La fioración en estalimate, indualidades en la perce inferior, madurando postemerente las fiores de la perce inferior, meta puede obe
merente ciaramente va que en la región superior del árbol
la fruita en diferentes satudos de maduración y en la inmerent, rioras y princerdica fiorales (Figs. 18 y 16). Las
lignas a agrupan en panículas cortas (Fig. 2A), pero la
lignas al ciara trango. En la figura 25 ca abserva una
ligna al ciara trango. En la figura 25 ca abserva una
ligna al ciara trango. En la figura 25 ca abserva una

De l'eremain ocurre entre les artes de junte a cattenpare se pretale observer les érbeles con frates duranles antes les frétas pueden tener abundantes sourles allers de les frétas pueden tener abundantes sourles allers de les cast glabros; su forme varie de cateles allers de les rent le cameral sun debiscentes por media
les valves (rig. %1), sunque bey casus en que pueden heles valves. Les rentlies son piriformes, manoroses y

l'estates pares, planeures partetales (Pig. 501; biden

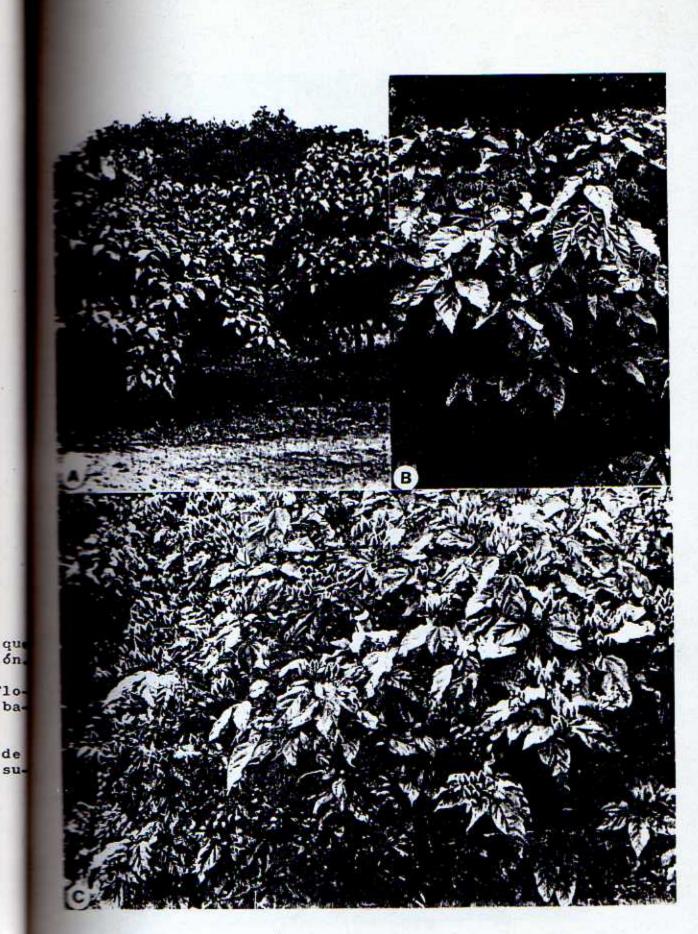
#### IV. RESULTADOS

#### A. DESCRIPCION DE LA PLANTA

Bixa orellana es un árbol de talla pequeña a mediana, que puede medir de 3 a 5 metros de altura. La ramificación del tallo es dicotómica, iniciándose desde la base como puede observarse en la figura 1A. La floración es escalonada, iniciándose en la porción superior, madurando posteriormente las flores de la parte inferior; esto puede observarse claramente ya que en la región superior del árbol hay frutos en diferentes estados de maduración y en la inferior, flores y primordios florales (Figs. 1B y 1C). Las flores se agrupan en panículas cortas (Fig. 2A), pero la antesis no ocurre en forma simultánea, madurando una o dos flores al mismo tiempo. En la figura 2B se observa una flor pentámera con gran cantidad de estambres y un estigma prominente.

La floración ocurre entre los meses de junio a setiembre, pero es posible observar los árboles con frutos durante todo el año. Los frutos pueden tener abundantes emergencias (Fig. 3) o ser casi glabros; su forma varía de esferica a alargada y por lo general son dehiscentes por medio
de dos valvas (Fig. 4A), aunque hay casos en que pueden haber tres valvas. Las semillas son piriformes, numerosas y
se encuentran sobre placentas parietales (Fig. 4B), miden

- A. Vista general de árboles de Bixa orellana (achiote), qui ilustra el tamaño del árbol y el patrón de ramificació
- B. Vista de una sección del árbol que muestra frutos y fl res; nótese que la floración es escalonada en forma b sípeta.
- C. Detalle de una sección que también ilustra el patrón d floración; se observan frutos maduros en la porción a perior.



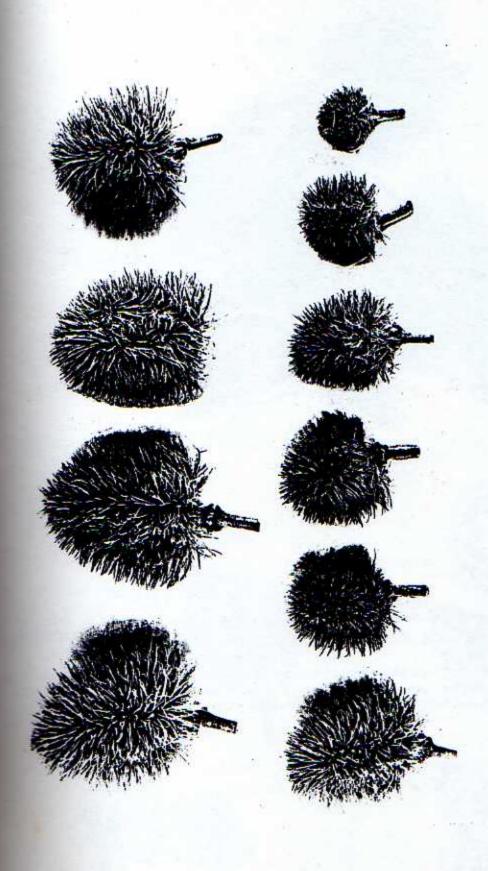
de

- A. Inflorescencia en panícula de B. orellana, con flores, primordios florales y frutos inmaduros.
- B. Flores pentameras de B. orellana; en la flor de perfil se puede observar el estigma prominente.

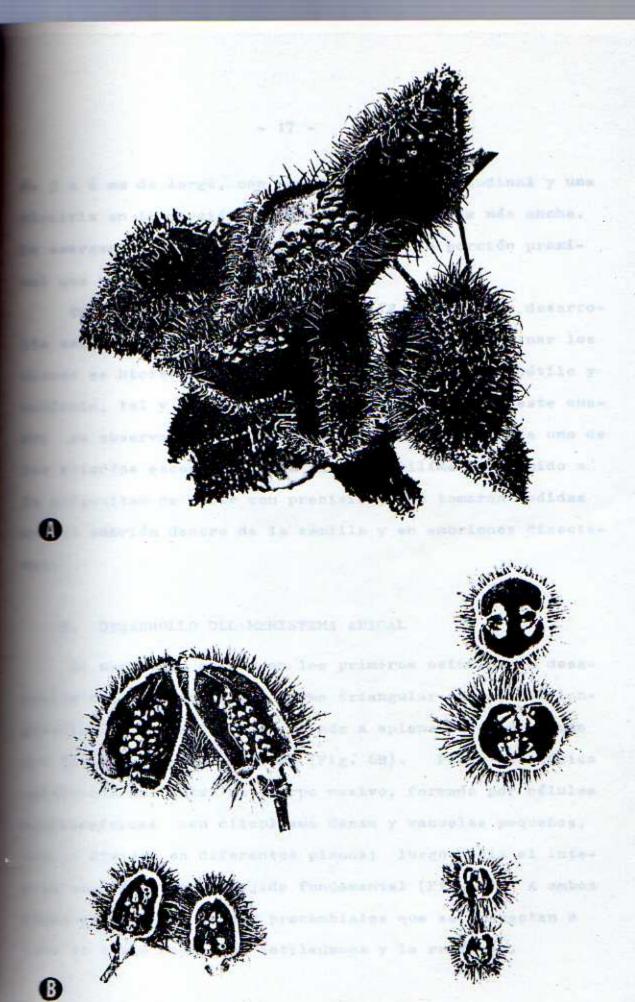


es,

Frutos de B. orellana en diferentes etapas de desarrollo; nótese la gran cantidad de emergencias.



- A. Frutos maduros de B. orellana; se observan las dos valvas de la cápsula y la posición de las semillas.
- B. Cortes longitudinales y transversales de frutos inmaduros de B. orellana; se muestra el tipo de placentación y la posición de las semillas.



a 6 mm de largo, con una depresión longitudinal y una catriz en la porción distal, que es la parte más ancha.

La exergencia de la radícula ocurre por la porción proxique es más angosta (Fig. 5A).

En la figura 5A se observa los 12 estadíos de desarro
seleccionados para este estudio. Para determinar los

senos se hicieron medidas de la longitud del hipocótilo y

secula, tal y como aparece en el cuadro 1. En este cua
se observa que la fluctuación de tamaño en cada uno de

estadíos escogidos varía en pocos milímetros debido a

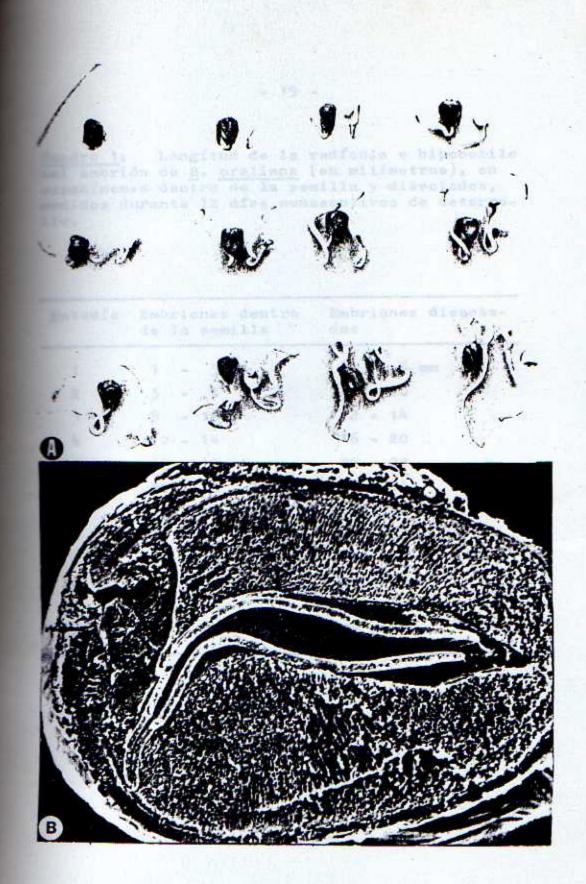
dificultad de medir con precisión; se tomaron medidas

el embrión dentro de la semilla y en embriones disecta-

# B. DESARROLLO DEL MERISTEMA APICAL

El meristema apical en los primeros estadíos de desarello del embrión, tiene forma triangular en sección longitudinal y posteriormente tiende a aplanarse adquiriendo
ma forma biconvexa, de domo (Fig. 6B). Posee una túnica
uniseriada que cubre el cuerpo masivo, formado por células
meristemáticas con citoplasma denso y vacuolas pequeñas,
que se dividen en diferentes planos; luego hacia el interior se encuentra el tejido fundamental (Fig. 7). A ambos
lados se observan bandas procambiales que se proyectan a
todo lo largo hacia los cotiledones y la radícula.

- A. Secuencia de desarrollo de embriones de B. orellana durante 12 días consecutivos; los embriones se encuentran disectados para ilustrar mejor el crecimiento de la radícula e hipocotilo.
- B. Corte longitudinal de una semilla de B. orellana vista al microscopio electrónico de barrido, que muestra la posición del embrión. 20x



Longitud de la radícula e hipocotilo del embrión de B. orellana (en milímetros), en especímenes dentro de la semilla y disectados, edidos durante 12 días consecutivos de desarrollo.

Estadío	Embriones dentro de la semilla	Embriones disecta- dos
1	1 - 3 mm	4 - 6 mm
2	5 - 7	8 - 10
3	8 - 10	12 - 14
4	12 - 14	16 - 20
5	17 - 19	20 - 22
6	20 - 22	24 - 26
7	25 - 26	27 - 28
8	30 - 32	33 - 35
9	35 - 36	37 - 38
10	37 - 38	39 - 40
11	40 - 45	42 - 47
12	50 - 51	52 - 53

- Apice de un embrión de B. orellana de aproximadamente un día de desarrollo; se observa que presen-
- Apice de un embrión de aproximadamente dos días de desarrollo; se observa el primordio de un tricoma ta forma triangular. B.
- Apice de un embrión de aproximadamente 6 días de multicelular.
- Apice de un embrión de aproximadamente 9 días de desarrollo.
- t: túnica; c: cuerpo; tt: tricoma multicelular en corte transversal; tl: tricoma multicelular en desarrollo. D. corte longitudinal.



win colorado en ed contro de la sontilla, cen in paretdo

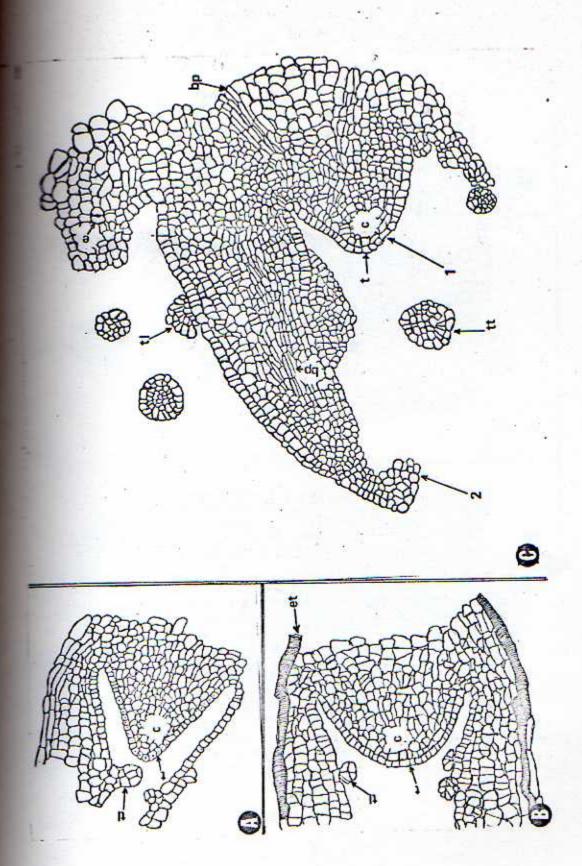
La forma y tamaño del ápice varía con el desarrollo
los primordios foliares (Fig. 7C). Estos se desarrollan muy rápido siguiendo el patrón descrito por Esau
[1977] para dicotiledóneas. En primordios foliares de
días de desarrollo es factible ver laticíferos y eleentos traqueales (Fig. 8A). En primordios foliares con
días se observan tricomas peltados multicelulares (Fig.
B) y elementos traqueales diferenciados. Cerca del ápiese observa una gran cantidad de tricomas peltados multicelulares (Figs. 7 y 8); estos tricomas también pueden
esservarse sobre los primordios foliares.

# C. ESTRUCTURA DE LOS COTILEDONES

Los cotiledones son bastante prominentes, redondeados angostos, de 7 a 10 células de grosor comprendiendo las epidermis y el mesofilo (Figs. 9A y 11). En los embrioses con dos o más días de desarrollo, se nota que las bandas procambiales de los cotiledones ya tienen algunos elementos traqueales diferenciados (Figs. 9B y 9D). En el mesofilo se nota la presencia de células grandes de contemido granular, que aparecen en grupos que aparentemente son células secretoras que formarán posteriormente canales secretores (Figs. 9A y 10).

El embrión es de forma espatulada (Fig. 11A), se en-

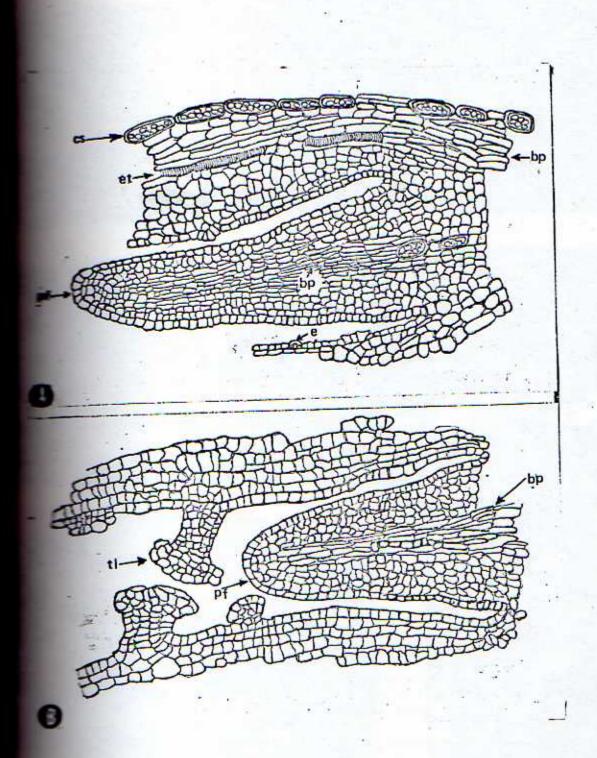
- A. Corte longitudinal del ápice de B. orellana de un embrión con aproximadamente un día de desarrollo.
- B y C: Cortes longitudinales del ápice de un embrión con aproximadamente 4 días de desarrollo. 400x
  - 1. meristema apical; 2: primordio foliar
    t: túnica; c: cuerpo; bp: bandas procambiales
    tt: tricomas multicelulares transversales; t1:
    tricomas multicelulares longitudinales; et: elementos traqueales; e: estoma de un primordio foliar seccionado paradermalmente.



n

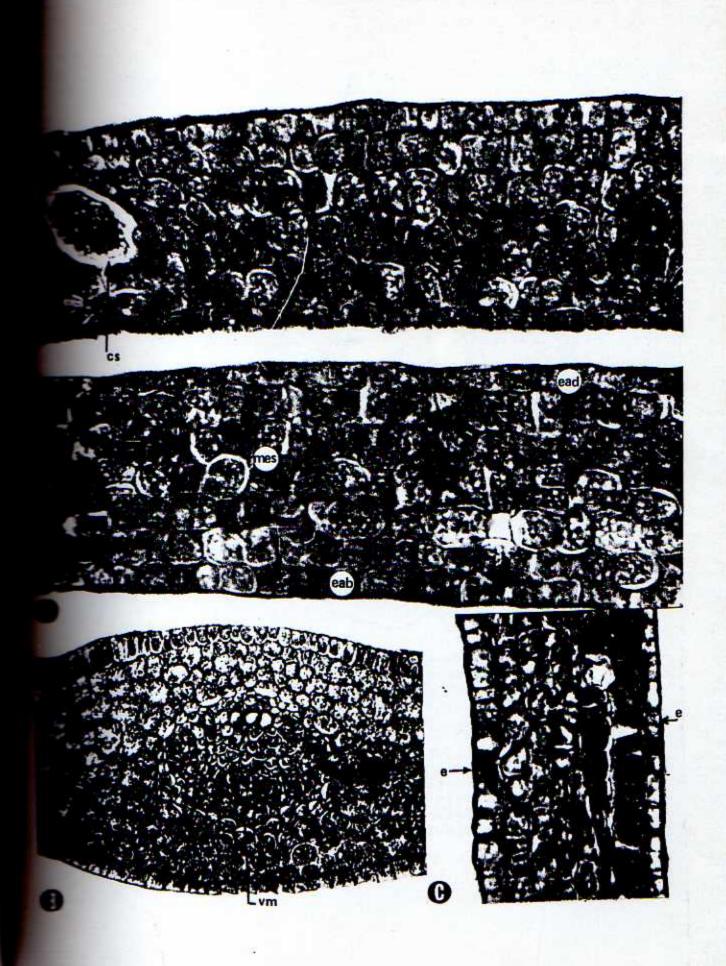
- A. Primordio foliar en un embrión de B. orellana con aproximadamente 4 días de desarrollo. 400x
- B. Primordio foliar de un embrión con aproximadamente 6 días de desarrollo; se observan tricomas multicelulares peltados. 400x

pf: primordio foliar; bp: bandas procambiales; e: estoma; et: elementos traqueales con engrosamientos helicoidales; cs: células secretoras; tl: tricomas multicelulares peltados.



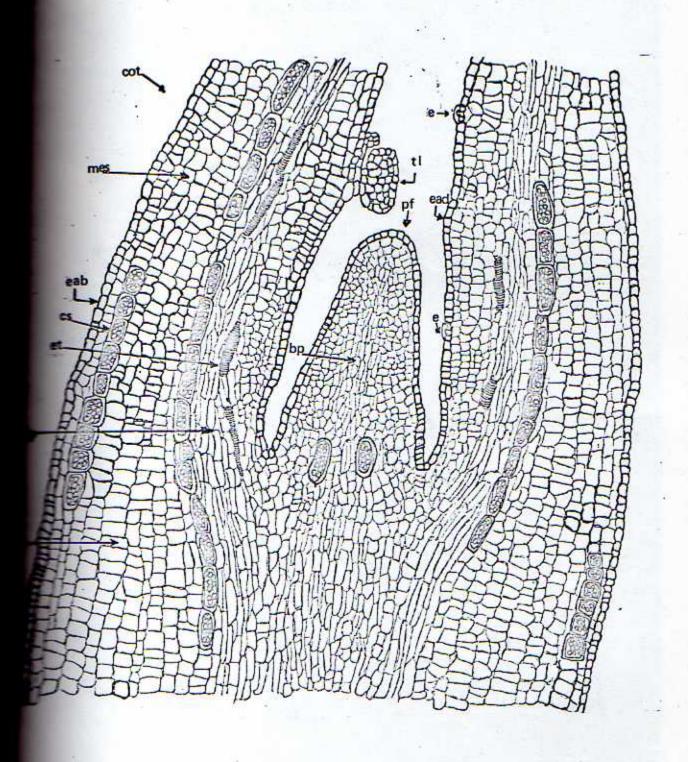
- A. Corte transversal de cotiledón de B. orellana de un embrión de aproximadamente un día de desarro-
- B. Corte transversal a nivel de vena media de un cotiledón con aproximadamente dos días de desarrollo. 400x
- C. Corte longitudinal de un embrión con aproximadamente 12 días de desarrollo; nótese que es anfiestomático. 400x

eab: epidermis abaxial; ead: epidermis adaxial; mes: mesofilo; cs: célula secretora; vm: vena media; e: estoma.



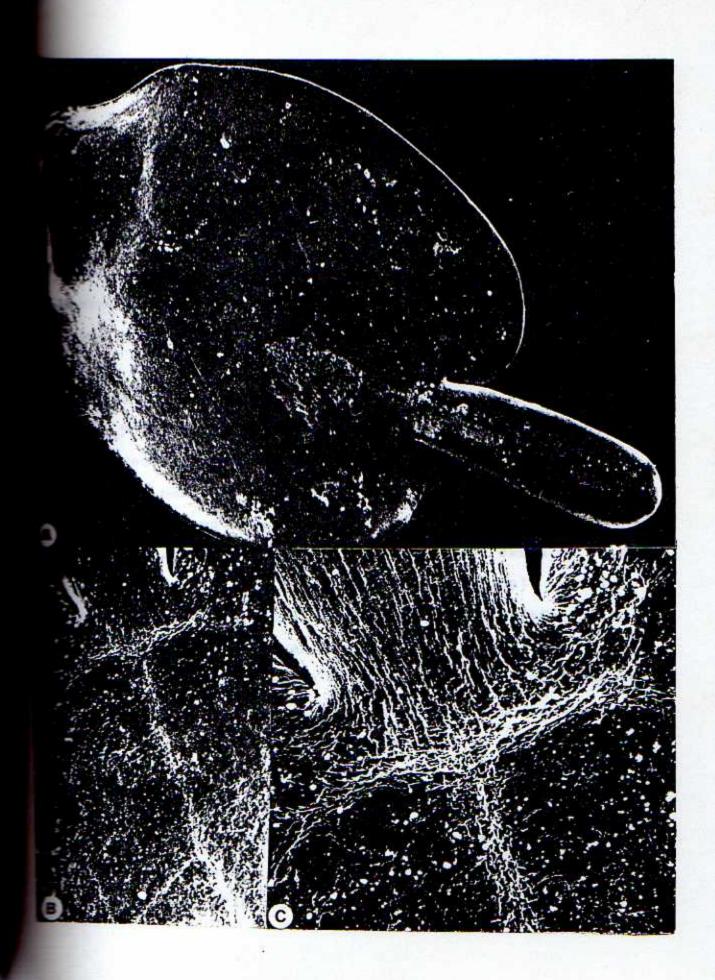
Corte longitudinal de un embrión de B. orellana con aproximadamente 4 días de desarrollo; se observa parte de los cotiledones y del hipocotilo; el ápice está cubierto por el primordio foliar. 400x

cot: cotiledón; hip: hipocotilo; eab: epidermis abaxial; ead: epidermis adaxial; e: estoma; bp: bandas procambiales; et: elemento traqueal con engrosamientos helicoidales; mes: mesofilo; cs: célula secretora; pf: primordio foliar; tl: tricoma multicelular peltado; c: corteza



### Fig 11

- A. Vista panorámica de un embrión de B. orellana de aproximadamente un día de desarrollo, al microscopio electrónico de barrido (MEB). 20x
- B. Base de los cotiledones cerca del hipocotilo; se observa el patrón de ramificación de las venas principales. MEB 40x
- C. Base de los cotiledones que muestra un detalle de la ramificación de las venas principales. MEB 100x

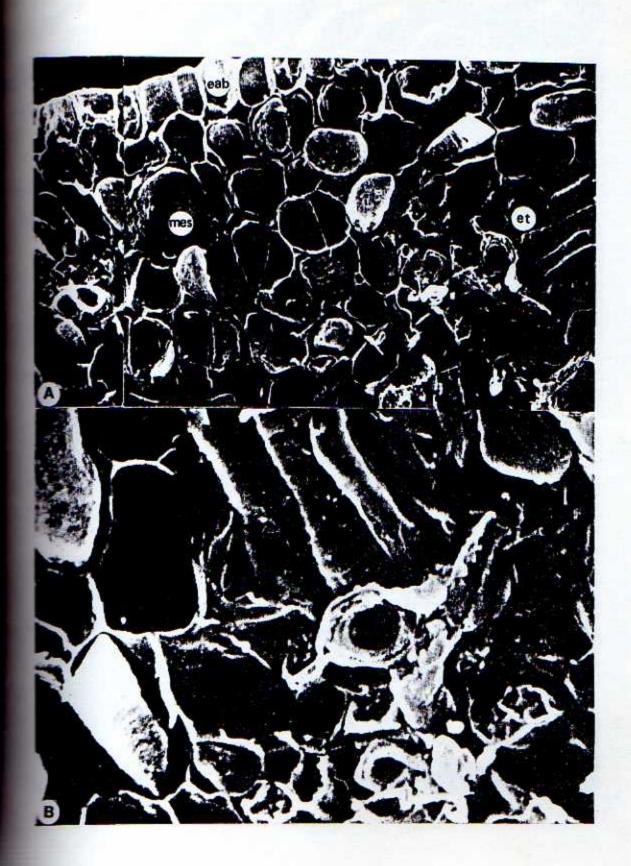


terminal del ápice de los cotiledones doblado hacia uno de los lados (Fig. 5B). En la lámina del cotiledón se observan tres haces vasculares principales que se bifurcan desde la base hacia el ápice, en una central y dos laterales (Fig. 11). La venación es de tipo cerrado. El mesofilo aparece compacto, no diferenciado, con células con citoplasma muy denso y con numerosas inclusiones (Fig. 12). En el estadío 12 parece existir alguna diferenciación ya que se empieza a notar la presencia de un mesofilo de empalizada (Fig. 9C). Este mesofilo compacto se ve interrumpido por los hacecillos vasculares, formados por protoxilema y protofloema, pero en embriones de dos a tres días de desarro-11o empieza a notarse la presencia de elementos traqueales con engrosamientos helicoidales, sobre todo cerca de la base de los cotiledones (Figs. 9B, 9C, 12A y 12B). En la figura 12B se observan elementos traqueales verticales y borizontales con engrosamientos helicoidales.

Las epidermis abaxial y adaxial tienen células que se diferencian en tamaño; las de la adaxial son redondeadas y de mayor tamaño, con cutícula delgada, en tanto que las de la abaxial tienen cutícula gruesa y sus células son pequeñas y alargadas (Fig. 9C). Al microscopio electrónico de barrido se observa que las células de la superficie abarial son redondeadas (Fig. 13A) y que presentan estriaciones sobre la pared (Fig. 13B).

- A. Corte transversal de un cotiledón de B. orellana de aproximadamente tres días de desarrollo, visto al microscopio electrónico de barrido; nótese los haces vasculares. 500x
- B. Detalle del haz vascular ampliada de A; se observa los elementos traqueales con engrosamientos helicoidales en forma vertical y horizontal. MEB

eab: epidermis abaxial; mes: mesofilo; et: elementos traqueales.



- A. Vista al microscopio electrónico de barrido de la epidermis de la superficie abaxial de un cotiledón de B. orellana, con tres días de desarrollo aproximadamente. 1000x
- B. Detalle al MEB de la epidermis abaxial del cotiledón; observense las estriaciones de la pared. 3000x



En los primeros estadíos de desarrollo, en la epidermis de los cotiledones se nota la presencia de meristemoides; éstos maduran rápidamente y en embriones con aproximadamente 6 días de desarrollo ya pueden observarse estomas
bien formados (Fig. 14). Al microscopio electrónico de barrido pueden observarse estomas bien formados en la superficie adaxial en embriones de 6 días de desarrollo, que se
concentran en las cercanías de las venas principales (Fig.
15). En la figura 9C se nota claramente que los cotiledones son anfiestomáticos.

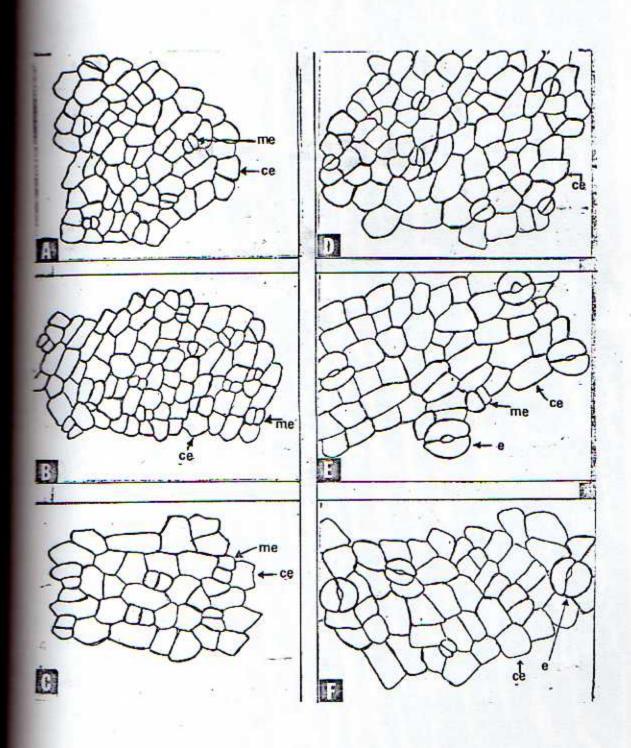
En la figura 16 pueden observarse los tricomas multicelulares peltados; éstos se encuentran concentrados cerca de la base de los cotiledones cubriendo el meristema apical; también pueden observarse en la superficie de los primordios foliares.

# D. DESARROLLO DEL HIPOCOTILO

En el hipocotilo puede observarse que la distribución de las células epidérmicas es muy regular; son rectangulares, lo que las diferencia de las células de los cotiledones que son más o menos polihédricas y de distribución un
tanto irregular. Desde los primeros estadíos de desarrollo se ve la presencia de estomas ya formados un poco más
grandes que los de los cotiledones (Figs. 17A a 17F). La
figura 17G muestra la disposición de estos estomas. La fi-

Secuencia del desarrollo de los estomas de la superficie abaxial de los cotiledones de B. orellana:
A: de aproximadamente un día de desarrollo; B: dos
días; C: tres días; D: cuatro días; E: cinco días;
F: ocho días. 1000x

me: meristemoide; ce: célula epidérmica; e: estoma



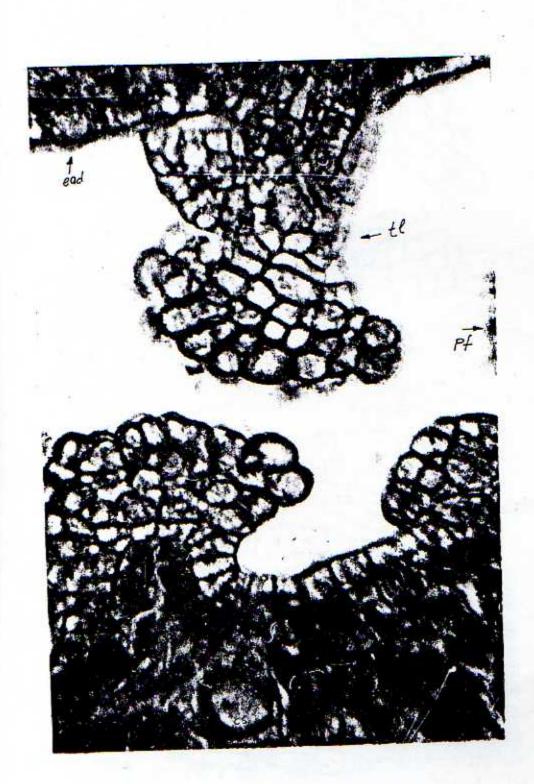
Epidermis y estomas de la superficie adaxial de cotiledón de B. orellana de aproximadamente 6 días de desarrollo, visto al microscopio electrónico de barrido. 550x

e: estoma



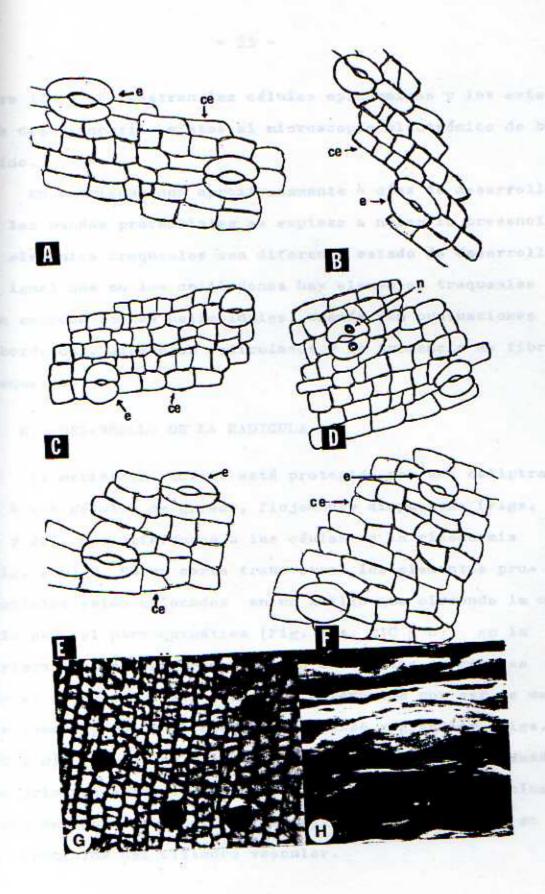
Tricomas multicelulares, peltados, de B. orellana que se desarrollan en la región cercana al ápice, vistos en un corte longitudinal de un embrión con aproximadamente 4 días de desarrollo. 400x

pf: primordio foliar; ead: epidermis adaxial; cs: célula secretora; tl: corte longitudinal de un tricoma multicelular peltado.



De A a F se muestra la secuencia de desarrollo de estomas en el hipocotilo de embriones de: 1, 4, 6, 8, 10 y 12 días de desarrollo respectivamente.

- G. Estomas de la epidermis de hipocotilo de un embrión de B. orellana de aproximadamente 6 días de desarrollo. 200x
- H. Vista al microscopio electrónico de barrido de un estoma del hipocotilo de un embrión con aproximadamente 4 días de desarrollo. 1500x
  - e: estoma; ce: célula epidérmica; n: núcleo



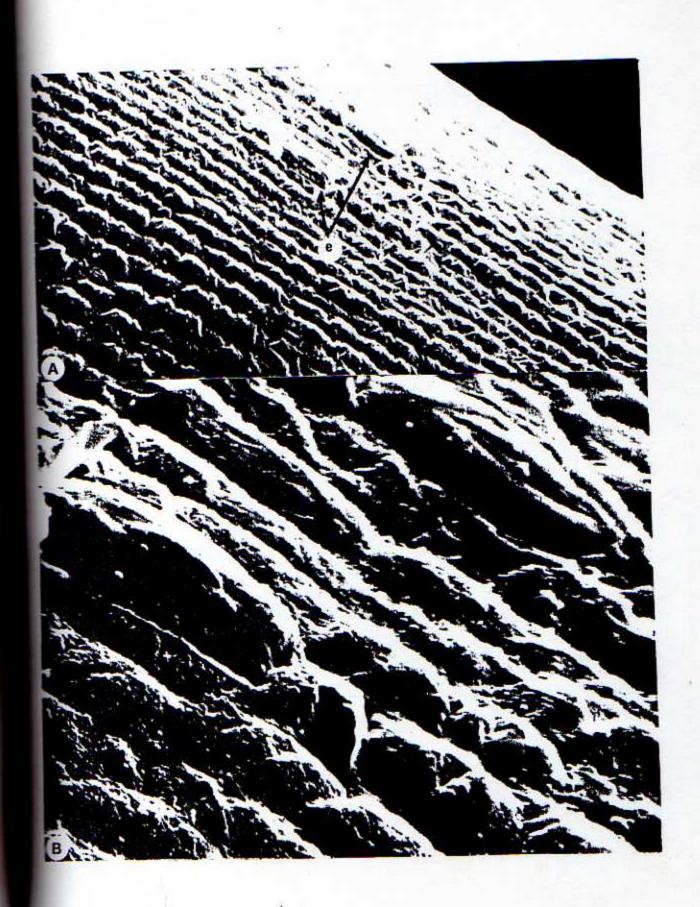
gura 17H y 18 muestran las células epidérmicas y los estomas del hipocotilo vistos al microscopio electrónico de barrido.

En embriones con aproximadamente 4 días de desarrollo, en las bandas procambiales se empieza a notar la presencia de elementos traqueales con diferente estado de desarrollo; al igual que en los cotiledones hay elementos traqueales con engrosamientos helicoidales, además con puntuaciones rebordeadas, elementos reticulados y la presencia de fibrotraqueidas.

#### E. DESARROLLO DE LA RADICULA

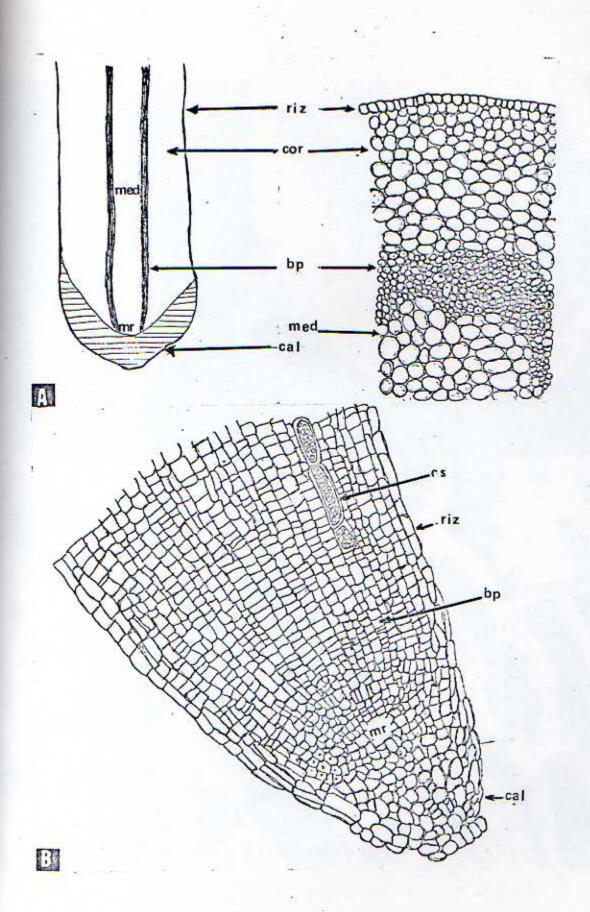
El meristema radical está protegido por una caliptra de 4 a 6 células de grosor, flojamente dispuestas (Figs. 19 y 20), muy diferentes a las céulas de la rizodermis (Fig. 20D). En un corte transversal los elementos procambiales están colocados en un anillo que circunda la médula central parenquimática (Fig. 19A, 21C y D); en la corteza se observan gran cantidad de células secretoras que se diferencian del resto del parénquima por ser de mayor tamaño y con un contenido muy denso y granular (Figs. 21C y D). Estas células secretoras están presentes desde los primeros estadíos de desarrollo, encontrándose incluso cerca del ápice radical (Fig. 21A), en la periferia y en las cercanías del cilindro vascular.

- A. Epidermis de hipocotilo de un embrión de B. orellana de aproximadamente 4 días de desarrollo, vista al microscopio electrónico de barrido; se observan dos estomas. 500x
- B. Detalle de los estomas vistos en A. MEB 2000x
   e: estoma

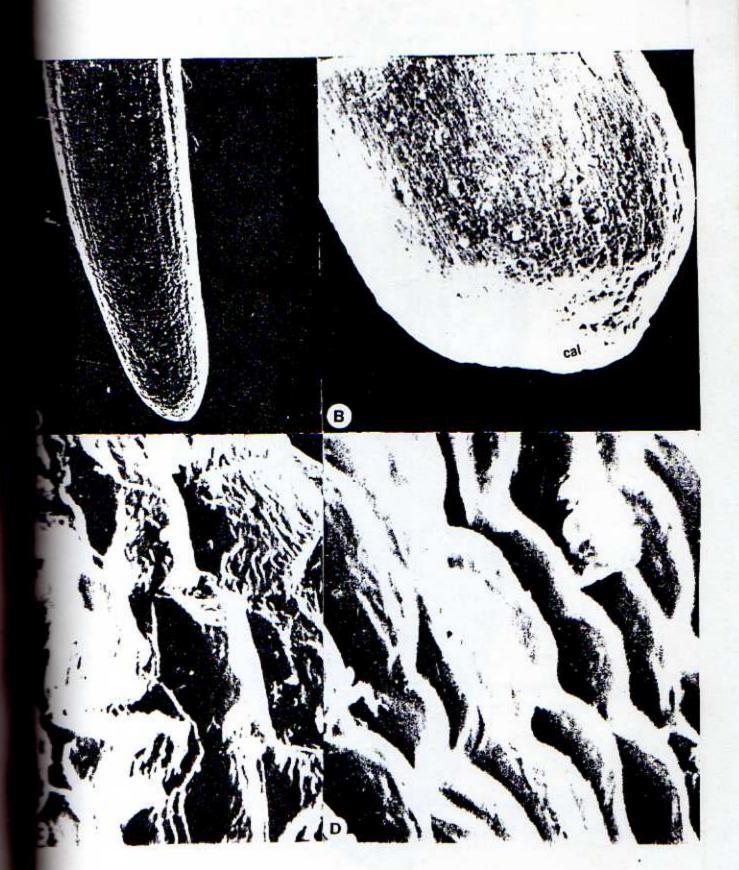


- A. Corte longitudinal y transversal de la radícula de un embrión de E. orellana de aproximadamente 3 días de desarrollo, en donde se observa la distribución de los tejidos. 100x y 400x respectivamente.
- B. Corte longitudinal del estremo de la radicula mostrando el ápice radical cubierto por una caliptra prominente.

cal: caliptra; mr: meristema radical; bp: bandas procambiales; med: médula; cor: corteza; cs: cé-lula secretora; riz: rizodermis;

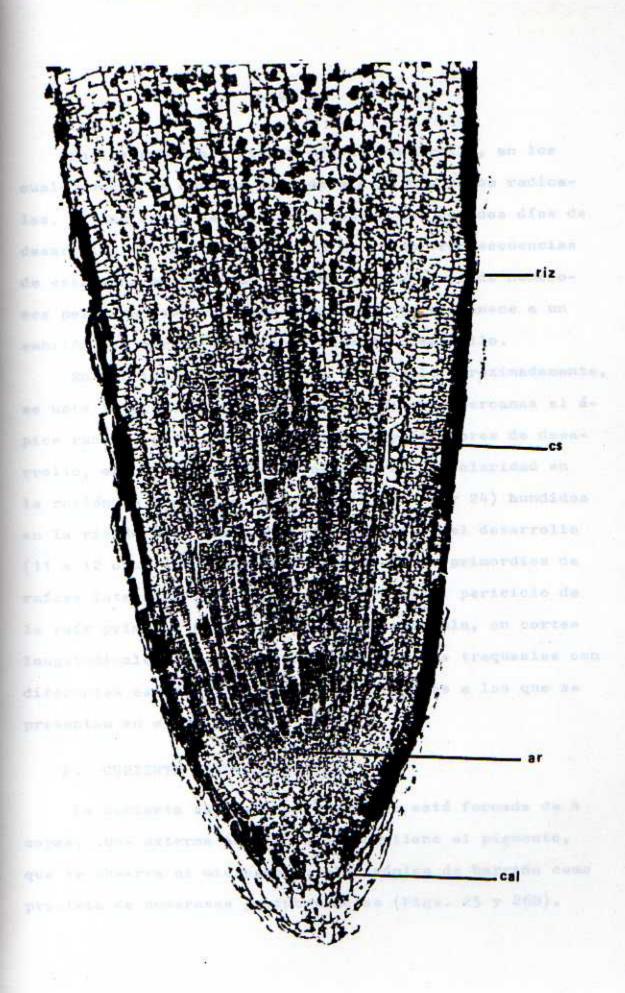


- A. Vista al microscopio electrónico de barrido, del extremo de la radícula de un embrión de B. orellana con aproximadamente 3 días de desarrollo. 40x
- B. Extremo de la radícula en donde se muestra el arreglo de las células de la caliptra. MEB 100x
- C. Detalle de las células de la caliptra. MEB 2500x
- D. Detalle de la rizodermis. MEB 5000x cal: caliptra



Corte longitudinal del extremo de la radícula de un embrión de B. orellana de aproximadamente 3 días de desarrollo, en donde se muestra la distribución de los tejidos. 100x

cal: caliptra ar: apice radical; cs: células secretoras; riz: rizodermis.



En los embriones con un día de desarrollo, en los cuales acaba de emerger la radícula no hay pelos radicales, ya que estos se inician en embriones con dos días de desarrollo. La figura 22 y 23 muestran tres secuencias de esta zona en donde se observa la presencia de numerosos pelos radicales; ésta última figura pertenece a un embrión con aproximadamente 4 días de desarrollo.

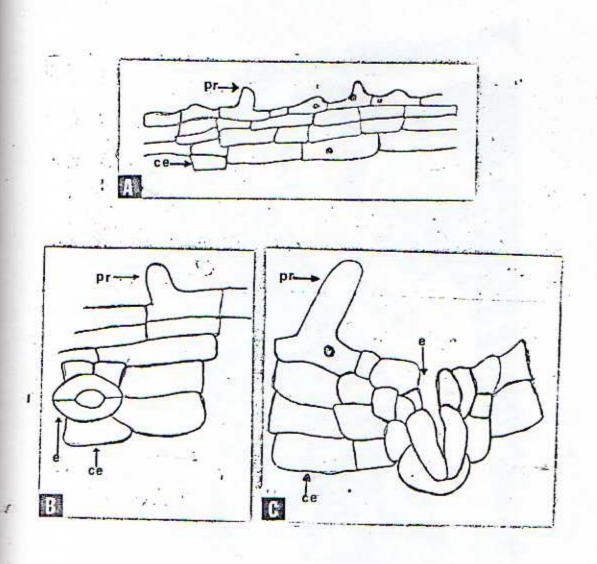
En embriones con un día de desarrollo aproximadamente, se nota la presencia de estomas en regiones cercanas al ápice radical (Fig. 24); en estadíos posteriores de desarrollo, estos estomas pueden observarse con claridad en la región de los pelos radicales (Figs. 22 y 24) hundidos en la rizodermis. En estadíos avanzados del desarrollo (11 a 12 días), se observa la presencia de primordios de raíces laterales que se forman a partir del periciclo de la raíz primaria (radícula). En la radícula, en cortes longitudinales, pueden observarse elementos traqueales con diferentes estados de maduración, similares a los que se presentan en el hipocotilo.

# F. CUBIERTA SEMINAL (TESTA)

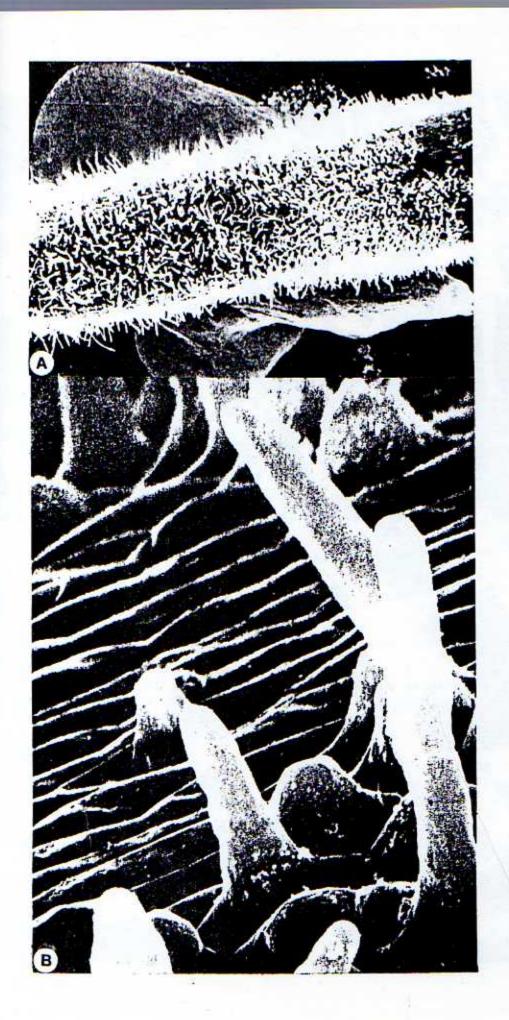
La cubierta seminal aparentemente está formada de 4 capas; una externa que es la que contiene el pigmento, que se observa al microscopio electrónico de barrido como provista de numerosas protuberancias (Figs. 25 y 26B).

- A. Sección de la región de los pelos radicales en donde se muestra el inicio del crecimiento de estos en un embrión de B. orellana de aproximadamente dos días de desarrollo. 400x
- B. Estoma en la región de los pelos radicales en un embrión de aproximadamente 4 días de desarrollo. 1000x
- C. Sección longitudinal de la región de los pelos radicales de un embrión de aproximadamente 8 días de desarrollo. /000⊀

e: estoma; pr: pelo radical; ce: célula de la rizodermis.



- A. Región de los pelos radicales en un embrión de B. orellana de aproximadamente 4 días de desa-rrollo, visto al microscopio electrónico de barrido. 20x
- B. Detalle de la región de los pelos radicales. MEB 800x



- A. Región de los pelos radicales de un embrión de B. orellana, visto al microscopio electrónico de barrido; se observa un estoma hundido en la rizodermis. 150x.
- B. Ampliación de A en donde se observa con mayor detalle el estoma.

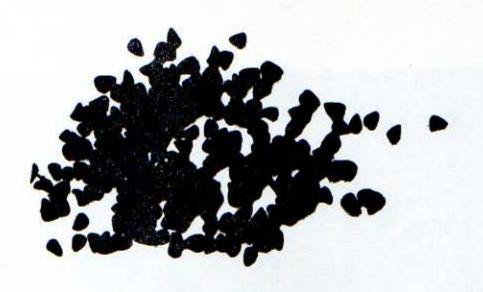
e: estoma

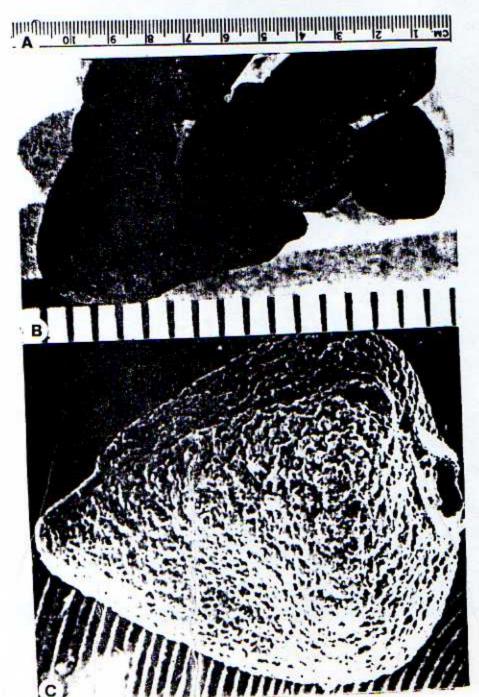


## Fig. 25

## Semillas de B. orellana

- A. Vistas al natural (1x)
- B. Vistas al microscopio estereoscópico (5x)
- C. Vista panorámica al microscopio electrónico de barrido. 20x

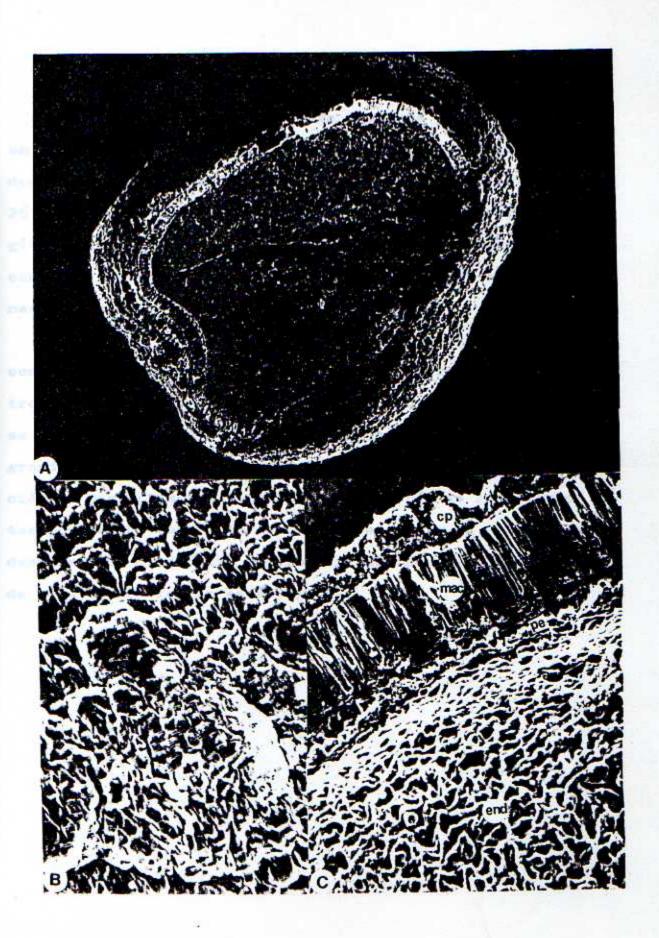




## Fig. 26

- A. Corte longitudinal de una semilla sin germinar de B. orellana, vista al microscopio electrónico de barrido; se observa la gruesa cubierta seminal. 20x
- B. Detalle de la superficie de la cubierta seminal en donde se localizan los pigmentos. MEB 70x
- C. Corte de una semilla en donde se muestra la cubierta seminal; la porción externa es la que contiene los pigmentos. MEB 150x

cp: capa externa con pigmentos; mac: macroesclereidas; pe: parénquima esclerotizado; end: endosperma.



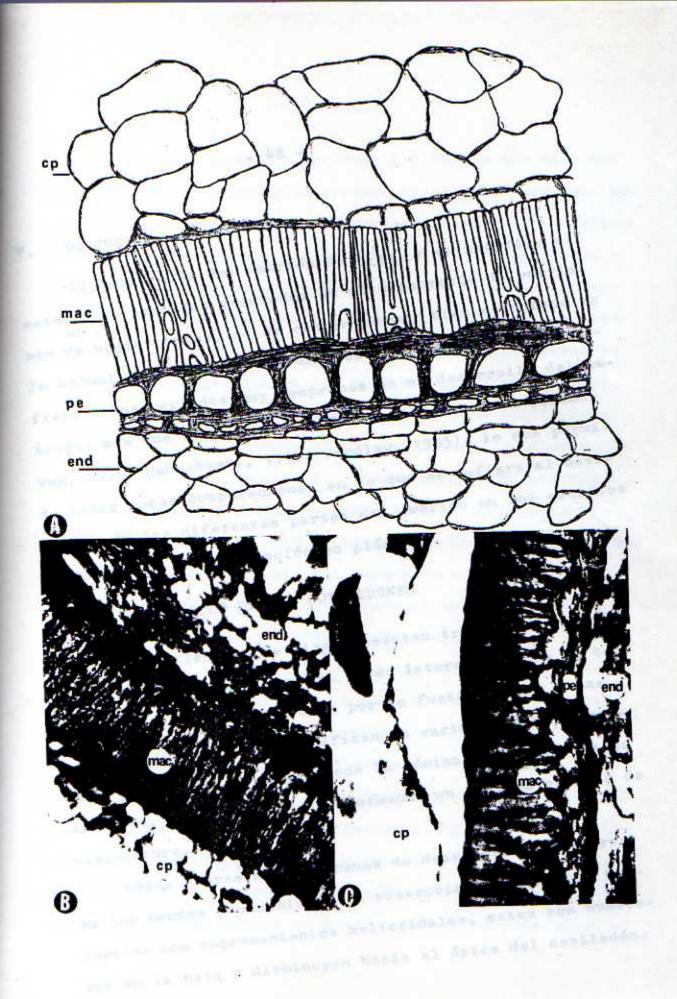
Hacia el interior se observa una capa gruesa, como en empalizada, formada por macroesclereidas, seguida de dos capas de células de parénquima esclerotizado (Figs. 26 y 27). En la figura 26 puede observarse un corte longitudinal de una semilla sin germinar, que presenta gran cantidad de endosperma, este endosperma es rico en almidones y grasas.

Las capas externas que poseen los pigmentos aparecen como una zona compacta al observarse al microscopio electrónico de barrido (Fig. 26). pero al microscopio de luz se observa que está formada por varias capas de células grandes y flojamente dispuestas. El pigmento de esta porción es perfectamente soluble en la mayoría de los solventes por lo que en los cortes hechos a partir de material deshidratado es difícil determinar exactamente las capas de células que forman está región.

## Fig. 27

- A. Diagrama que muestra el arreglo de las capas que constituyen la cubierta seminal de B. orellana. 400x
- By C. Cortes de semillas que muestran la constitución de la cubierta seminal. 200x

cp: capas externas que contienen los pigmentos; mac: macroesclereidas; pe: parénquima esclerotizado; end: endosperma.



## DISCUSION

El desarrollo del embrión de Bixa, y en general, el estudio de periodos avanzados en el desarrollo de embriones de angiospermas, no se encuentra muy bien estudiado en La literatura hasta la fecha, sólo se refiere a los períodos muy tempranos en el desarrollo del emla actualidad. brión, más que todo dentro de la semilla inmadura (Grundwag, 1976; Maheshwari, 1950; Wardlaw, 1955), lo que permite hacer pocas comparaciones en lo que se refiere al desarrollo de las diferentes partes del embrión en los estadios previos a su transformación en plántula.

# A. DESARROLLO DE LOS COTILEDONES

Los cotiledones de Bixa presentan tres haces vasculares principales, uno central y dos laterales, pero el central no parece estar formado por la fusión de dos venas. Además, estas venas se ramifican en varias venas secundarias que se extienden por toda la lámina sin llegar hasta el borde, anastomosándose y formando un sistema cerrado de vasculatura.

Desde etapas muy tempranas de desarrollo se observa en las bandas procambiales la presencia de elementos traqueales con engrosamientos helicoidales, estos son numerosos en la base y disminuyen hacia el ápice del cotiledón.

Esto confirma lo apuntado por Esau (1977), de que algo del sistema vascular puede encontrarse maduro en embriones. De acuerdo con Flores (1975), los engrosamientos helicoidales en los elementos traqueales del xilema primario aparecen en órganos que completan su desarrollo después de diferenciado el xilema. Por ser los cotiledones órganos en crecimiento activo, los elementos traqueales pueden extenderse debido a la elasticidad que confiere la hélice, ya que de otra forma serían estructuras rígidas y no podría ocurrir su elongación durante el crecimiento (E. M. Flores, 1979; comunicación personal). Estos elementos traqueales se observan en etapas muy tempranas de desarrollo y los engrosamientos se pueden observar en las porciones distales de las venas principales aunque no en las ramificaciones terminales; esto indica ya un transporte de agua y minerales muy efectiva a nivel de los cotiledones.

En sección transversal, se observa que el mesofilo está constituido por parénquima compacto, cuyas células tienen un contenido muy denso, granular, posiblemente rico en
sustancias nutritivas. En el estadío 12 se observa ya la
diferenciación en el mesofilo; hacia la superficie adaxial
hay células diferenciadas que forman el mesofilo de empalizada. Estas están colocadas en forma regular a diferencia
de las células que forman el mesofilo esponjoso que son sensiblemente más grandes y de arreglo más irregular.

El mesofilo se encuentra interrumpido por las bandas procambiales y por células de tamaño mayor, cercanas a las bandas, que se encuentran solas o en grupos de hasta cuatro células y cuyo contenido es bastante diferente a las de parénquima, con sustancias varias en el citoplasma. Estas células son el inicio de laticíferos y también pueden ser observadas en otras partes del embrión. Dehgan y Craig (1978), han hecho estudios en Jatropha en donde aparecen varios tipos de laticíferos; de acuerdo a estos autores y a Esau (1977) y Fahn (1978), se puede afirmar que los laticíferos que se forman en Bixa son de tipo articulado porque se observa con claridad la presencia de septos entre las células. En la planta madura estos laticíferos contienen látex de color amarillento.

Las epidermis de ambas superficies difieren en el tamaño de las células; las de la superficie abaxial son de
menor tamaño con paredes algo más gruesas que las de la superficie adaxial. Dentro de la semilla, los cotiledones
se encuentran con las superficies adaxiales en contacto en
tanto que las abaxiales se encuentran en contacto con el
endosperma. En los embriones con un día de desarrollo
ya se observa la presencia de meristemoides en la epidermis de los cotiledones, y ya en embriones con cuatro días
se puede observar meristemoides bastante desarrollados, cuyas células recuerdan la forma del estoma; en los embrio-

nes con cinco días de desarrollo los estomas están formados. Esto indica que los estomas son de desarrollo muy precoz ya que aparecen en etapas muy tempranas del desarrollo. Los cotiledones son anfiestomáticos (Heath y Mansfield, 1969), esto puede observarse claramente en embriones con doce días de desarrollo. En Bixa, los estomas son anomocíticos (Metcalfe y Chalk, 1950) ya que no se observa la presencia de células subsidiarias. Las estrias de la superficie abaxial son parte de la deposición irregular de cutícula sobre estas células epidérmicas.

En los embriones con un día de desarrollo puede observarse la presencia de tricomas multicelulares en la superficie adaxial, pero se encuentran solo en las porciones del
cotiledón más cercanas al ápice, o sea la base del cotiledón; en las etapas más avanzadas de desarrollo se ve que
son peltados, según las definiciones de Esau (1977), Fahn
(1974) y Payne (1978). Su presencia cerca del ápice es
probablemente como de estructura protectora.

#### B. DESARROLLO DEL APICE

El desarrollo del meristema apical parece seguir el patrón general para las angiospermas (Cutter, 1965; Eames, 1961; Gifford, 1954; Gifford y Corson, 1971; Wardlaw, 19-68). En etapas muy tempranas del desarrollo se observa que la forma del épice es cónica. La túnica es uniseria-

da, lo que difiere de la mayoría de lo informado para las angiospermas en donde se afirma que ésta está formada de dos o más capas (Gifford, 1954; Roufa y Gunkel, 1951; Shushany Johnson, 1955; Tolbert, 1961). Reeve (1942), encontró que en algunas plantas inicialmente podían diferenciarse varios estratos en la túnica, pero a medida que avanzaba el desarrollo se reducía a una sola. Flores (1978), informó de la presencia de una túnica uniseriada en Casuarina. En Bixa, todos los estadíos estudiados indican la presencia de una sola capa.

La forma del ápice varía conforme se avanza en el desarrollo, adquiriendo una forma más aplanada, como de domo,
pero es posible observar de nuevo la forma cónica en estadíos más avanzados. Fahn (1978), indica que poco antes de
la formación de cada primordio, el meristema apical se ensancha y que después de la formación de éste se vuelve a
estrechar, siendo éste un fenómeno rítmico; probablemente
es por este motivo que en algunos estadíos se observa el
ápice en forma cónica y en otros en forma de domo.

#### C. DESARROLLO DEL HIPOCOTILO

El hipocotilo tiene forma cilíndrica y se observa que su alargamiento ocurre rápidámente desde los primeros estados de desarrollo. La epidermis está formada por células rectangulares colocadas en forma muy regular, interrumpi-

das por estomas que se encuentran maduros en los embriones con un día de desarrollo. El rápido alargamiento del hipocotilo hace que los elementos traqueales estén desarrollados, encontrándose por ello elementos traqueales con engrosamientos helicoidales, con puntuaciones rebordeadas y reticuladas, también se observan fibrotraqueidas, esto indica que el sistema vascular no es muy avanzado filogenéticamente.

No fue posible identificar el floema (protofloema) en las etapas estudiadas. Según Shushan y Johnson (1955), el protofloema de ciertos embriones puede ser observado hasta en el segundo par de hojas que se forman arriba de los cotiledones; es probable que por esa razón no se pueda diferenciar del resto de células de parénquima en el hipocotilo de Bixa. Dawidowicz-Grzegorzewska y Lewak (1978), han informado sobre una situación similar en embriones de Malus domestica.

## D. DESARROLLO DE LA RADICULA

En la radícula también es posible observar el mismo tipo de elementos traqueales que se observan en el hipocotilo, así como la presencia de laticíferos en la periferia y cerca de las bandas procambiales. El meristema radical se encuentra protegido por una caliptra formada por células grandes flojamente dispuestas. Se ha informado

oce ser immucida par la lor, ya qua la

(Armstrong y Heimsch, 1976; Byrne y Heimsch, 1968; Seago y Heimsch, 1969) de la presencia de una columela a partir de la cual se diferencian todos los tejidos de la radícula; esta diferenciación ocurre de acuerdo a la dirección de las divisiones celulares. En los estadíos estudiados en Bixa se observa que las células se encuentran ordenadas de manera muy uniforme, delimitadas en varias regiones; inmediatamente después de la caliptra se observa el meristema radical con células grandes; casi desde el ápice se observa la diferenciación de las bandas procambiales, pero no parece existir la columela mencionada anteriormente. la rizodermis se puede observar la presencia de estomas, tanto en las regiones cercanas al ápice como en la región de los pelos radicales; aunque no es frecuente la presencia de estomas en este órgano, en algunas ocasiones pueden formarse, sobre todo en las plantas que crecen bajo condiciones de laboratorio (E. M. Flores, 1979; comunicación personal); esto parece ser inducido por la luz, ya que la radícula en todos los estadíos está expuesta y los estomas aparecen en ese primer órgano que emerge. Los pelos radicales aparecen tempranamente, en embriones de dos días de desarrollo lo que indica una actividad de absorción desde estadíos muy tempranos. En estadíos más avanzados, de 11 a 12 días de desarrollo, se puede observar la formación de rafces secundarias a partir de los tejidos internos de

la radicula. 1977 encontraren tempes en eleunes da

## E. CUBIERTA SEMINAL

Chopra y Kaur (1965), en estudios hechos en Bixa, indican que la cubierta seminal está formada por 7-8 estratos, además indican la presencia de taninos en algunos de los estratos. En el presente estudio pudo observarse que la testa está formada por cuatro estratos bien diferenciados entre sí; el más externo es multicelular, formado por células muy grandes que son las que contienen el pigmento (bixina). Es difícil determinar el número exacto de células en esta porción, porque los pigmentos son solubles en casi todos los solventes, lo que hace que algunas de estas capas desaparezcan antes de poder hacer observaciones microscópicas. Los tres estratos restantes son los que proveen la protección, con macroesclereidas ordenadas en forma muy compacta y dos estratos internos de parénquima esclerotizado. No fue posible observar la presencia de taninos en ninguno de los estratos, pero se tratará de hacer una comprobación posterior con reactivos apropiados.

Khaleel (1977), en estudios hechos en varias plantas, observó la presencia de 7 a 8 estratos en el tegumento de los rudimentos seminales e indicó que éstos disminuyen conforme avanza la maduración de la semilla. En otros grupos de plantas, Subramanyam y Narayana (1968, 1976) y

Prakash et al (1977), encontraron taninos en algunos de los estratos de los tegumentos del rudimento seminal, pero éstos no fueron observables en la cubierta seminal madura. Es posible que en <u>Bixa</u> ocurran algunos cambios similares, pero en estadíos previos previos a los estudiados en el presente trabajo.

trans. Luc automos fueros observados en opiderada de

a relegion a hipotophilo y on in renodermia. El únice

yet our chains universalificate y un cuerpo mesivo.

rictors propositial as de deserrello impreso y sec-

tions of the er theatenn latietferos articulados. La-

walter of the country was a former but business of the country of

. ....to (bisine)-

#### VI. RESUMEN

La embriogénesis de <u>Bixa orellana</u> L., Bixaceae, (achiote), desde la germinación hasta la etapa previa a su transformación en plántula, muestran un desarrollo precoz de algunas estructuras como estomas y pelos radicales. Los estomas fueron observados en epidermis de cotiledón e hipocotilo y en la rizodermis. El ápice posee una túnica uniestratificada y un cuerpo masivo. El sistema procambial es de desarrollo temprano y asociado a éste se observan laticíferos articulados. La cubierta seminal está formada por cuatro estratos, el más externo es multicelular y es el que contiene el pigmento (bixina).

and crystals in Jarrophs and their temporalinclications, Ap. J. Box. 55(3):395+352

prollens East African Agr. Forest J.

McGrew-Hall Book Co. Hav Fork. En. 30-37

John Wiley and Sone, New York, 550g.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Ampiée H., Martha. 1956. Investigación cualitativa de vitamina A y provitamina A en el achiote (Bixa orellana L.). Rev. Biol. Trop. 4(2):227-233
- Araya, H.; H. Murillo; E. Vargas y J. Delgado. 1977.

  Composición y empleo del achiote (Bixa orellana L.) en raciones para gallinas ponedoras para la pigmentación de la yema del huevo. Agron.
  Cost. 1(2):143-150.
- Armstrong, J. E. y C. Heimsch. 1976. Ontogenetic reorganization of the root meristem in the Compositae.

  Am. J. Bot. 63(2):212-219
- Byrne, J. M. y C. Heimsch. 1968. The root apex in Linum.
  Am. J. Bot. 55(9):1011-1019
- Chopra, R. N. y H. Kaur. 1965. Embryology of Bixa orellana Linn. Phytomorphology 15:211-214
- Cutter, Elizabeth G. 1965. Recent experimental studies of the shoot apex and shoot morphogenesis.

  Bet. Rev. 31:7-113
- Dawidowicz-Grzegorzewska, Alina y S. T. Lewak. 1978.

  Anatomy, Histochemistry, and Cytology of
  dormant and stratified apple embryos. New
  Phytol. 81:99-103
- Dehgan B. y Mary E. Craig. 1978. Types of laticifers and crystals in <u>Jatropha</u> and their taxonomic implications. Am. J. Bot. 65(3):345-352
- Dendy, D. A. V. 1966. Annatto, the pigment of Bixa orellana. East African Agr. Forest J. 32(2):126-132
- Eames, J. A. 1961. Morphology of the angiosperms.

  McGraw-Hill Book Co. New York. pp.30-37
- Esau, Katherine. 1977. Anatomy of seed plants. 2a ed. John Wiley and Sons. New York. 550p.

- Fahn, A. 1978. Anatomía Vegetal. Trad. F. García Arenal, J. Fernández Casas y J. Fernández Pérez. H. Blume Ediciones. Madrid. 643p.
- Flores, Eugenia M. 1975. Algunos aspectos de anatomía foliar comparada de dos especies de Bromeliaceae (Aechmea mexicana Baker y Hechtia glomerata Zucc.) Rev. Biol. Trop. 23(1):29-52
- 1978. The shoot apex of Casuarina (Casuarinaceae). Rev. Biol. Trop. 26(1):247-260
- Foster, A. S. 1939. Problems of structure, growth, and evolution in the shoot apex of seed plants.
  Bot. Rev. 5(8):454-470
- y E. M. Gifford, Jr. 1974. Comparative morphology of vascular plants. 2a ed. W. H. Freeman and Co. San Francisco. pp. 721-732
- Gifford, Jr., E. M. 1954. The shoot apex in angiosperms.
  Bot. Rev. 20(8):477-529
- y G. E. Corson, Jr. 1971. The shoot apex in seed plants. Bot. Rev. 37(2):143-229
- Grundwag, M. 1976. Embryology and fruit development in four species of Pistacia L. (Anacardiaceae).
  Bot. J. Linn. Soc. 73(4):355-370
- Heath, O. V. S. y T. A. Mansfield. 1969. The movements of stomata. In: Physiology of plant growth and development, Ed. por M. B. Wilkins. McGraw-Hill. New York. pp. 303-332
- Hutchinson, J. 1959. The families of flowering plants.
  Vol. I 2a ed. Oxford University Press. Oxford.
  pp. 205-206
- plants. Academic Press. New York. pp. 166-167
- Ingram, J. S. y B. J. Francis. 1969. The annatto tree cultivation, preparation, and uses. Trop. Sci. 11(2):97-102

- Jiménez, O. 1947. El achiote, <u>Bixa</u> orellana Linn. Fam.
  Bixaceae. Rev. Inst. Def. Café C. R. 18(155156):361-367
- Johansen, D. A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Co. New York. 523 p.
- Kennard, W. C. y H. F. Winters. 1963. Frutas y nueces para el trópico. Trad. por el Centro Regional de Ayuda Técnica (RTAC) y la Agencia para el Desarrollo Internacional (AID). Ed. Limusa Wiley S. A. México. pp. 50-51
- Khaleel, T. F. 1977. Embryology of Trichodesma (Boraginaceae). Bot. Notiser. 130:441-452
- Proc. Montana Acad. Sci. 37:35-53
- and H. strigosum (Boraginaceae). Pl. Syst. Evol.
- Lawrence, G. H. M. 1951. Taxonomy of Vascular Plants.

  MacMillan Publishing Co. New York. pp. 609-610
- León, J. 1968. Fundamentos Botánicos de los Cultivos Tropicales. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. San José, Costa Rica. pp. 448-450
- Maheshwari, P. 1950. An Introduction to the Embryology of Angiosperms. McGraw-Hill Book Co., Inc. New York.
- Metcalfe, C. R. y L. Chalk. 1950. Anatomy of the Dicotiledons. Vol.I. Clarendon Press. Oxford. pp. 112-113
- Payne, W. W. 1978. A glossary of plant hair terminology. Brittonia 30(2):239-255
- Pittier, H. 1978. Plantas Usuales de Costa Rica. 3a ed. Editorial Costa Rica. San José. pp. 67-68

- Prakash, N.; A. L. Lim y R. Manurung. 1977. Embryology of Duku and Langsat varieties of Lansium domesticum. Phytomorphology 27(1):50-59
- Reeve, R. M. 1942. Structure and growth of the vegetative shoot apex of Garria elliptica Dougl. Am. J. Bot. 29(9):697-711
- Riel, R. R. y C. A. Gibson. 1958. Use of annatto for coloring butter. J. Dairy Sci. 41(5):624-629
- Rouffa, A. S. y J. E. Gunkel. 1951. A comparative study of vegetative shoot apices in the Rosaceae.
  Am. J. Bot. 38(4):290-300
- Seago, J. L. y C. Heimsch. 1969. Apical organization in roots of the Convolvulaceae. Am. J. Bot. 56(2): 131-138
- Sharman, B. C. 1943. Tanicc acid and iron alum with safranin and orange G in studies of the shoot apex. Stain Tech. 18:105-111
- Shushan, A. y M. A. Johnson. 1955. The shoot apex and leaf of Dianthus caryophyllus L. Bull. Torrey Bot. Club 82(4):266-283
- Standley, P. C. 1923. Trees and shrubs of México. Contr.
  U. S. Herb. Vol. 23 Part I. Smithsonian Press,
  Washington. pp.834-836
- Nat. Hist. Vol. XVIII Part II. Chicago.
  pp. 712-713
- Subramanyam, K. y L. L. Narayana. 1968. Floral anatomy and embryology of Primula floribunda Wall. Phytomorphology 18(1):105-113
  - to the floral anatomy and embryology in certain members of Primulaceae. J. Indian Bot. Soc. 55(4):274-282

- Tolbert, R. T. 1961. A seasonal study of the vegetative shoot apex and the pattern of pith development in <u>Hibiscus</u> syriacus. Am. J. Bot. 48(3):249-255
- Wardlaw, C. W. 1955. Embryogenesis in Plants. John Wiley & Sons, Inc. New York.

1968. Morphogenesis in Plants. Methuen & Co. Ltd. London. pp. 94-116