

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Esterilidad masculina en *Opuntia stenopetala*  
(Cactaceae)**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

**Lluvia Hilda Flores Rentería**

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Sonia Vázquez Santana

México, D. F.

Noviembre, 2005



m. 352185



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Lluvia Hilda Flores

Rentería

FECHA: 25-NOV-05

FIRMA: PA 

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de marzo del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) FLORES RENTERÍA LLUVIA HILDA, con número de cuenta 94341555 con la tesis titulada: "Esterilidad masculina en *Opuntia stenopetala* (Cactaceae)", bajo la dirección del(a) Dra. Sonia Vázquez Santana.

Presidente: Dr. César Augusto Domínguez Pérez-Tejada  
Vocal: Dr. Joseph Dubrovsky  
Secretario: Dra. Sonia Vázquez Santana  
Suplente: Dr. Felipe Cruz García  
Suplente: Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria D.F., a 21 de noviembre del 2005

  
Dr. Juan Muñoz Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Sonia Vázquez Santana en el laboratorio de Desarrollo en plantas de la UNAM.

Adicionalmente se contó con la supervisión de los miembros del comité tutorial los cuales son: Dr. César A. Domínguez Pérez-Tejada, Dra. Elena Álvarez Buylia y Dr. Felipe Cruz García.

La investigación fue apoyada por el proyecto de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT) IN216105 "Análisis molecular del desarrollo de los órganos reproductivos en plantas unisexuales de *Opuntia stenopetala* como un camino para entender la evolución del dioicismo.

Durante la realización de la presente tesis se contó con el financiamiento por parte de CONACyT y DGEP para la realización de estudios de Posgrado.

Dedico esta tesis a mis padres por haberme dado la oportunidad de vivir y enseñarme las cosas más hermosas de la vida, por defenderme cuando más frágil he estado y por alentarme a ser fuerte cuando hay problemas. Quiero expresarles mi infinito agradecimiento y respeto por estos años de amor y comprensión, por enseñarme a ver el mundo con asombro, sorpresa y curiosidad, cosas fundamentales para cuestionarme sobre los fenómenos que me rodean.

También dedico este esfuerzo y trabajo a todas las personas que me han dado parte de su pasión por la biología, muchos profesores que me formaron entre los que se encuentran Judith, Mague y César entre muchos más, ya que sin su entusiasmo esta tesis no hubiera tenido tanto impacto en mi formación.

## Agradecimientos

- A mi familia por todo el amor y cariño que siempre me han dado y por que me han permitido, la mayoría de las veces expresarme libremente y han soportado mis locuras y mis histerias.
- A Sony y Felipe por todo lo que hemos pasado para terminar este trabajo, por su amistad y por todo el conocimiento que me han brindado.
- A los miembros del comité Dr. César Domínguez y Dra. Elena Álvarez por todos los comentarios tan acertados que me hicieron durante el desarrollo del proyecto.
- Al Dr. Eduardo Campos, miembro del jurado, por tener la disposición en revisar la tesis.
- Al Dr. Joseph Dubrovsky y Dra. Svetlana Shinkova por apoyarme en la parte de muerte celular programada y por todas las atenciones que tuvieron conmigo.
- Al labo de desarrollo en plantas que han sido parte de mi familia ya por varios años, teniendo siempre la misma solidez como grupo, a todos sus miembros les agradezco de manera muy especial.
- A todos los chavos del laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica, pero especialmente a Grethel, Goyo, Vale y Vane muchas gracias por el tiempo que invirtieron en enseñarme lo que ahora sé, por sus abrazos y sonrisas en los momentos más pesados.
- A la Dra. Irma Bernal por sus comentarios pero particularmente por su amistad y cariño.
- A mis amigo del alma Arte, Julio, Vladis, Vero, Edith, Flo (especialmente por su ayuda en la traducción del resumen), Rafa, Rafita, Irak, Sergio, Karen, Perlita, Diana, Alejandra, Leonardo, Uriel por todas las platicas, los viajes, los llantos, los abrazos, los besos y los innumerables recuerdos.
- A la persona que me ha dado la fuerza para seguir, gracias por todo tu cariño Sergio.

## CONTENIDO

|  |     |
|--|-----|
| Abreviaturas   | I   |
| Resumen  | II  |
| Summary  | III |
| Introducción   | 1   |
| Antecedentes   | 3   |
| Sistemas de reproducción sexual en angiospermas        | 3   |
| Diocismo   | 4   |
| Evolución del sistema reproductivo dioico              | 5   |
| Bases moleculares de la esterilidad masculina          | 8   |
| Cromosomas sexuales                                    | 8   |
| Esterilidad masculina                                  | 10  |
| Esterilidad masculina nuclear                          | 10  |
| Esterilidad masculina citoplásmica                     | 13  |
| Muerte celular programada en plantas                   | 15  |
| La PCD y las hormonas                                  | 16  |
| PCD de las microsporas                                 | 17  |
| PCD del tapete   | 17  |
| PCD y la dehiscencia                                   | 18  |
| PCD y la esterilidad masculina citoplásmica            | 18  |
| Desarrollo de la antera de la familia Cactaceae        | 20  |
| Sistemas sexuales de la familia Cactaceae              | 20  |
| Sistemas de reproducción de <i>Opuntia stenopetala</i> | 23  |
| Hipótesis  | 24  |
| Objetivo general                                       | 24  |
| Objetivos Particulares                                 | 24  |
| Material y métodos                                     | 25  |
| Resultados   | 36  |
| Discusión  | 65  |
| Conclusiones   | 75  |
| Perspectivas   | 76  |
| Literatura citada                                      | 77  |
| Apéndices  | 88  |

## Lista de abreviaturas

|             |   |
|-------------|---|
| AFLP's      | Amplified Fragment Length Polimorphism                                |
| ALDH        | Aldehído deshidrogenasa   |
| AN1 y AN 2  | <i>ANTHER-EAR1</i> y 2  |
| AP          | <i>APETALA</i>  |
| ATATM       | <i>ARABIDOPSIS THALIANA ATAXIA TELANGIECTASIA MUTANT</i>              |
| ATMYB26     | Factor de transcripción de la familia MYB                             |
| CMMi        | Células Madres de las Microsporas                                     |
| CMS         | Cytoplasmic Male Sterility  |
| D2-D5       | <i>DWARF</i>  |
| DAD1        | <i>DEFECTIVE IN ANTHOR DEHISCENCE</i>                                 |
| DAPI        | 4', 6-diamino 2-fenilindol dihidrocloruro                             |
| DDE2-2      | <i>DELAYED DEHISCENCE2-2</i>  |
| DUET/MMD1   | <i>DUET/MALE MEIOCYTE DEATH1</i>                                      |
| DYAD/SWI1   | <i>DYAD/SWITCH1</i>   |
| FICT        | Fluorescein isothiocyanate  |
| MS1         | <i>MALE STERILITY1</i>  |
| NZZ         | <i>NOZZLE</i>   |
| PBS         | Phosphate Buffer Solution   |
| PCD         | Programmed Cell Death   |
| PI          | <i>PISTILATA</i>  |
| pvs         | Phaseolus vulgaris sterility sequence                                 |
| rf          | Restaurador de la fertilidad  |
| RT-PCR      | Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction                       |
| SLY1 y SLYX | <i>SILENE LATIFOLIA Y y X-CHROMOSOMA</i>                              |
| SUP         | <i>SUPERMAN</i>   |
| tdt         | Terminal deoxinucleotidyl transferase                                 |
| TGMS        | Thermosensitive genetic male sterility                                |
| TS2         | <i>TASSELSEED2</i>  |
| TUNEL       | Terminal Deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling |



## RESUMEN

*Opuntia stenopetala* es una cactácea que posee un sistema reproductivo funcionalmente dioico (individuos con flores estaminadas e individuos con flores pistiladas). Se realizaron diferentes estrategias para conocer los mecanismos que conducen a la esterilidad masculina de las flores pistiladas de *O. stenopetala*, una de ellas consistió en estudiar los cambios estructurales durante el desarrollo de las anteras de las flores pistiladas y estaminadas de dicha especie, encontrándose que en las flores pistiladas el desarrollo de las células madres de las microsporas comienza a alterarse presentando signos de muerte celular programada, tales como la compactación de la cromatina, compactación del citoplasma, alta vacuolización celular, así como algunas alteraciones del núcleo. Se observó que algunas células madres de las microsporas entran a meiosis (Profase I). Las capas de la pared de la antera de las flores pistiladas también presentan alteraciones. El tapete se hipertrofia, tiene una alta vacuolización y citoplasma colapsado. La capa media persiste y se hipertrofia y el endotecio no forma engrosamientos celulares. Finalmente todas las capas de la antera degeneran, sólo algunas células de la epidermis permanecen en la madurez. La muerte celular de las células madres de las microsporas y de las capas de la pared de la antera fue corroborada por la técnica de TUNEL. La longitud de los estambres de las flores pistiladas es menor que la de los estambres de las flores estaminadas. En estas últimas el desarrollo de la antera es similar a lo reportado para la familia Cactaceae, generando granos de polen funcionales.

Otra estrategia para conocer los mecanismos que llevan a esterilidad masculina fue analizar los cambios en la expresión genética entre las anteras de las flores pistiladas y estaminadas, para ello se realizó una búsqueda de mutantes en otras especies de angiospermas que coincidieran con las alteraciones encontradas en *O. stenopetala*. La mutante que comparte las alteraciones de los estratos de la pared de la antera es *fat tapetum* de *Arabidopsis thaliana*, sin embargo, no se ha publicado la secuencia del gen. Otras mutantes que comparten las alteraciones que presentan las células madres de las microsporas de *O. stenopetala* fueron *duet* o también llamada *mmd1*, en ellas comienza la meiosis deteniéndose alrededor de la etapa de profase I, presentando también muerte celular programada. en esta etapa. A partir de la secuencia de *DUET/MMD1* se realizaron "primers" para amplificar cDNA de *O. stenopetala*, sin embargo, no se detectó ninguna banda. También se compararon los genes expresados diferencialmente por medio de la técnica AFLP's, de todos los candidatos a ser genes expresados diferencialmente, se lograron clonar y secuenciar

cuatro fragmentos, los cuales no tiene homología con ninguna secuencia publicada en las bases de datos existentes.

Debido a los datos arrojados de este estudio se propone que la muerte celular programada atemporal o errónea en anteras de flores pistiladas puede originar esterilidad masculina. Esto sugiere que la muerte celular programada quizás este involucrada en la generación de flores unisexuales en *O. stenopetala*. Además, es posible que las alteraciones del pistilo de las flores estaminadas de *O. stenopetala* y de otras especies dioicas estén relacionadas a la muerte celular programada de algunos estratos decisivos para la funcionalidad del órgano. Estudios al respecto ayudarían a comprender el papel de la muerte celular programada en plantas y la importancia que tiene en la generación de sistemas de reproducción unisexuales.

## SUMMARY

*Opuntia stenopetala* is a cactaceae with a functionally dioecious reproductive system (individuals possess either staminate or pistillate flowers). Different strategies were followed in order to learn about the mechanisms that lead to male sterility in this species. A first approach consisted in studying the structural changes that occur in the anthers during their development both in pistillate and staminate flowers; it was found that in pistillate flowers the development of the microspore mother cells becomes altered, showing signs of programmed cell death, such as chromatin condensation, cytoplasmic compaction and high vacuolation, as well as some alterations of the nucleus. It was observed that some microspore mother cells enter meiosis (prophase I). In later stages, different layers of the anther cell wall of pistillate flowers show alterations; initially, the tapetum hypertrophied, became highly vacuolated and presented a collapsed cytoplasm, and the middle layer persisted although hypertrophied. In the final stages the tapetum, middle layer and endotecium degenerate, while only a few cells from the epidermis persist to maturity. Stamen in pistillate flowers were shorter than in staminate flowers. In the latter, anther development is similar to what has been reported in the Cactaceae family, generating functional pollen grains. Cell death in microspore mother cells was corroborated using the TUNEL technique.

The second approach consisted in analyzing changes in gene expression in the anthers of both pistillate and staminate flowers. A search for *Arabidopsis* mutants with alterations similar to those observed for *O. stenopetala* led to the identification of two mutants: *fat tapetum*, which shows similar alterations in the anther wall cell layers, although its sequence remains unknown; and *duet*, also known as *mmd1*, that shows alterations in the microspore mother cells which lead to the arrest of meiosis during prophase I and programmed cell death. The DUET/MMD1 gene codes for a homeodomain PHD- finger protein involved in chromosomal organization and meiosis in microspore mother cells. From the DUET/MMD1 sequence, primers were designed in order to amplify cDNA from *O. stenopetala*; however, its presence could not be detected. Differentially expressed genes were compared using AFLP's and of these, four were cloned and sequenced.

The results from this study suggest that the atemporal or erroneous induction of programmed cell death in the anther could originate male sterility. If so, this process may be involved in the generation of species with unisexual reproductive systems. It is also possible that the alterations in the pistil of staminate *O. stenopetala* flowers, or of

other dioecious species, could also be related to the programmed cell death of cells in layers decisive for organ function. Studies in this regard would help understand the role of programmed cell death in plants and its importance in the generation of unisexual reproductive systems.

## INTRODUCCIÓN

Los programas de desarrollo de los órganos femeninos y masculinos son en parte independientes uno del otro. Esta independencia en el desarrollo permite la disección génica de los procesos de fertilidad. De tal manera que se pueden tener especies con flores portando un órgano sexual estéril y el otro fértil sin que se altere éste último.

La fertilidad masculina requiere de diferentes eventos coordinados durante el desarrollo (Mc Cormick, 1993), que incluyen: la formación de anteras a partir de los meristemas florales; el desarrollo y maduración de granos de polen dentro de los lóculos de la antera; cambios en la antera que permitan la liberación de los granos de polen maduros en el tiempo correcto; reconocimiento del grano de polen con el estigma; y la polinización e interacción de los gametos femeninos y masculinos. Por lo tanto, cualquier mutación que perturbe uno o más de estos eventos causará alteraciones en la función masculina, es decir, provocará esterilidad masculina.

Algunas mutantes estructurales con esterilidad masculina carecen de todo el órgano (Coen y Meyerowitz, 1991), otras tienen estambres bien desarrollados pero no producen polen (Kaul, 1988) o éste no es funcional. Las mutantes con esterilidad masculina muestran rangos con diferentes fenotipos, incluyendo aberraciones estructurales como filamentos cortos (Mulligan *et al.*, 1994), ausencia de dehiscencia (Dawson *et al.*, 1999), defectos asociados a la gametogénesis, específicamente con la meiosis (Glover *et al.*, 1998; Sanders *et al.*, 1999).

Se ha sugerido que la esterilidad masculina es el "primer" paso en la generación de sistemas de reproducción con flores unisexuales. Esta esterilidad se ocasiona por mutaciones que afectan genes nucleares (Chaudhury, 1993) o por mutaciones que recaen sobre genes de origen mitocondrial causando esterilidad masculina citoplásmica (Gorman y McCormick, 1997).

Pocas especies dioicas poseen cromosomas sexuales que determinan la formación y fertilidad de los órganos sexuales. Se piensa que en las plantas los cromosomas sexuales son de reciente aparición, lo cual permite conocer los eventos que conducen a la evolución de los mismos (Charlesworth, 2002).

Otro mecanismo que genera esterilidad masculina en algunas especies se da por la prematura muerte de algunas células de la antera (Noodén, 2004). En otros casos, células del androceo de flores bisexuales entran a muerte celular programada cuando normalmente no deberían morir, con la consecuente formación de flores pistiladas (Coimbra *et al.*, 2004).

Para originar especies con flores unisexuales es menos frecuente que no se desarrolle un órgano sexual como sucede en algunas especies dioicas como *Populus trichocarpa* (Sheppard *et al.*, 2000) o especies monoicas del género *Cucumber* (Kater *et al.*, 2001). La mayoría de las especies dioicas forman inicialmente órganos femeninos y masculinos y más tarde bloquean el desarrollo de sus óvulos o granos de polen. Este es el caso de *Opuntia stenopetala*, la cual posee un sistema reproductor funcionalmente dioico, es decir, posee flores que aparentemente son hermafroditas pero en las cuales se altera la funcionalidad de un órgano sexual, mientras que el otro se desarrolla hasta llegar a la madurez, teniendo entonces individuos que portan flores pistiladas (femeninas) e individuos que portan flores estaminadas (masculinas). De acuerdo con Orozco (2002), en *O. stenopetala* el desarrollo de la antera de las flores pistiladas se detiene en etapa de célula madre de las microsporas (no entra a meiosis), además de que el tapete es anormal, mientras que el órgano femenino se desarrolla completamente; las flores estaminadas poseen estilodios que no desarrollan lóbulos estigmáticos, los ovarios están poco desarrollados y contienen un bajo número de óvulos que no completan su desarrollo u ovarios que carecen de óvulos y en algunos casos no hay formación de la cavidad del ovario.

El presente trabajo consistió en estudiar los cambios estructurales que conducen a la esterilidad masculina en *O. stenopetala*, así como analizar los cambios en la expresión génica entre las anteras de las flores pistiladas y estaminadas. Se sabe de estudios previos (Orozco, 2002) que en *O. stenopetala* al inicio del desarrollo ontogenético de las flores pistiladas se aprecia la formación de los dos verticilos sexuales, sin embargo, se producen alteraciones en el desarrollo que generan esterilidad masculina.

Existe en la literatura una serie de reportes de mutantes responsables de la esterilidad masculina, entre ellas se encuentra la mutante artificial *fat tapetum* (Sanders *et al.*, 1999) comparte características fenotípicas (estructurales) similares a las que presenta *O. stenopetala*. Adicionalmente, *O. stenopetala* entra al programa de muerte celular para generar esterilidad masculina, mecanismo que se comparte con algunas especies que presentan esterilidad masculina.

Las alteraciones en la expresión del programa genético durante el desarrollo de la antera de *O. stenopetala* se ve reflejada en la carente formación de granos de polen en las flores pistiladas así como en el desarrollo de la pared de la antera.

## ANTECEDENTES

### SISTEMAS DE REPRODUCCIÓN SEXUAL EN ANGIOSPERMAS

La mayoría de las especies de angiospermas tienen un sistema de reproducción hermafrodita en el cual se presentan flores perfectas, es decir, flores que presentan tanto estambres como carpelos (Ainsworth, 2000). El sistema sexual hermafrodita se distribuye en todas las familias de plantas con flores como un carácter conservado.

Además del sistema de reproducción hermafrodita, las angiospermas poseen una amplia variedad de sistemas sexuales donde se ven involucrados mecanismos temporales como el dicogámico (protandria y protoginia) y mecanismos morfológicos, tales como: heterostílico, monoico, andromonoico, ginomonoico, dioico, androdioico, ginodioico, entre otros (Charlesworth y Charlesworth, 1979; Bawa, 1980; Bawa y Beach, 1981; Barret, 1998, 2002). El sistema monoico tiene individuos que portan tanto flores masculinas como flores femeninas; la especie más estudiada con este sistema es *Zea mays* (Albertsen y Phillips, 1981). El sistema ginomonoico posee en la misma planta flores hermafroditas y flores femeninas como en algunas especies del género *Poa* (Anton y Connor, 1995). Al igual que el sistema ginomonoico, el sistema andromonoico tiene flores hermafroditas, sólo que en vez de poseer flores femeninas en el mismo individuo tiene flores masculinas. Ejemplo de este sistema son especies del género *Solanum* (Anderson, 1980). El sistema de reproducción sexual con mayor variedad floral en la misma planta es el trimonoico, en éste se presentan flores femeninas, masculinas y hermafroditas en la misma planta, como sucede en *Dimorphoteca pluvialis* (Ainsworth, 2000). *Silene latifolia*, *Humulus lupulus*, algunas especies del género *Rumex*, las especies del género *Actinidia* entre otras tienen sistemas de reproducción dioicos, en el que se encuentran individuos que portan flores femeninas así como individuos con flores masculinas dentro de una población (Guttman y Charlesworth, 1998; Parker, 1990; Ainsworth *et al.*, 1999; Testolini *et al.*, 1999). La unisexualidad floral puede estar combinada con flores bisexuales como en el sistema ginodioico, donde se presentan individuos con flores femeninas e individuos con flores hermafroditas dentro de una población (ej: *Plantago coronopus*; Koelewijn y van Damme, 1996). El sistema androdioico tiene individuos con flores masculinas e individuos con flores hermafroditas como en *Datisca glomerata* (Liston *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 2001). El sistema trioico tiene en la misma población individuos femeninos, individuos masculinos así como individuos con flores hermafroditas. Como se presenta en *Pachycereus pringlei* (Fleming *et al.*, 1994; Núñez *et al.*, 2004).

## DIOCISMO

Pese a su reciente origen el dioicismo es un carácter ampliamente distribuido en las angiospermas. De acuerdo con Renner y Ricklefs (1995) aproximadamente el 6% de las 240 000 especies de angiospermas son dioicas y el 7% de los 13 000 géneros de plantas con flores contienen especies dioicas, lo que sugiere que este sistema reproductivo se ha originado muchas veces durante la evolución de las angiospermas.

El sistema dioico está presente en mayor proporción en las familias Menispermaceae, Myristicaceae, Monimiaceae, Euphorbiaceae, Moraceae, Cucurbitaceae, Anacardiaceae y Urticaceae (Ainsworth, 2000). Algunos autores han vinculado al dioicismo con plantas perennes polinizadas por viento y con mayor presencia en la flora tropical (Negrutiu *et al.*, 2001). También existen especies dioicas polinizadas por animales, siendo la mayoría entomófilas. Esta relación es mayor en los bosques húmedos que en zonas secas deciduas, en las que la principal polinización se da por aves y murciélagos (Bawa, 1980).

En etapas tempranas del desarrollo la mayoría de las flores de especies dioicas y monoicas no pueden distinguirse de las flores bisexuales, debido a que los primordios de estambres o carpelos comienzan a desarrollarse en las flores unisexuales y el aborto o la interrupción de un órgano ocurre posteriormente (Lebel-Hardenack y Grant, 1997; Ainsworth, 2000). En otras especies dioicas o monoicas, las flores unisexuales no muestran evidencia del sexo opuesto debido a que nunca se forma ningún vestigio del órgano sexual faltante (Maier *et al.*, 1997, Ainsworth, 2000). Algunas especies de plantas hermafroditas, monoicas o dioicas tienen individuos con sistemas sexuales extremadamente susceptibles a cambios ambientales que ejercen cambios en la expresión del sexo, es decir, los individuos pueden cambiar de sexo de un periodo de vegetación a otro, a esto se le conoce como dioicismo secuencial (Freeman y Vitale, 1985; Ainsworth, 2000).

En muchas poblaciones de especies dioicas existen más individuos masculinos, esto podría deberse a proporciones sesgadas de distribución de sexo o a proporciones de mortalidad diferenciales (Decker y Pilson, 2000). Aunque de acuerdo a Domínguez (1985) son las variaciones en los patrones de asignación de recursos destinados hacia crecimiento o funciones sexuales masculinas o femeninas las responsables de estas proporciones.



## EVOLUCIÓN DEL SISTEMA REPRODUCTIVO DIOICO

Existen dos preguntas centrales que han generado diversas líneas de investigación sobre la evolución del dioicismo 1) ¿De cuál sistema reproductor desciende el dioicismo? y 2) ¿Cuál es la presión de selección que genera la evolución hacia este sistema sexual? Debido a que se ha asumido que el entrecruzamiento es la principal fuerza de selección que favorece la evolución del dioicismo, hay mayor atención en resolver la primera pregunta. Sin embargo, además del entrecruzamiento o reducción de autopolinización existen otras fuerzas de selección que rigen al dioicismo como lo son: el eficiente uso (distribución) de los recursos para optimizar las funciones femeninas o masculinas en respuesta a la selección sexual. Además el dimorfismo sexual cambia la distribución espacial de los recursos disponibles para los polinizadores, para la dispersión de semillas y para la depredación (Bawa, 1980). Estos factores pueden cambiar de una especie a otra y deben ser considerados durante la generación de modelos genéticos que muestren la propagación de mutantes unisexuales.

Al parecer existen distintos ancestros del sistema reproductivo dioico según cada especie. Charlesworth y Guttman (1999) proponen que la condición dioica ha evolucionado más de 100 veces con relación a las 160 familias de plantas que incluyen especies dioicas. De acuerdo con Bawa (1980) el dioicismo ha evolucionado directamente de especies hermafroditas, ginodioicas, androdioicas y monoicas. En algunos casos particulares se ha propuesto al sistema heterostílico (El-Keblawy *et al.*, 1996) y al sistema heterodigámico (Pendleton *et al.*, 2000) como un ancestro directo del sistema dioico. Las rutas propuestas de evolución al dioicismo son:

*Evolución directa del hermafroditismo.* El primer modelo genético fue propuesto por Lewis en 1942 (citado por Bawa, 1980), él propuso dos mutaciones independientes, una que generaría esterilidad masculina y la otra mutación actuaría sobre la fertilidad femenina. Aunado a esto sugirió el estricto ligado de estos genes, con lo que se prevendría la recombinación y la consecuente reaparición del morfo hermafrodita y neutro en la progenie. Lewis no profundizó en los mecanismos de dispersión de las nuevas mutantes; sin embargo, asumió que cierta fracción de óvulos de las plantas hermafroditas debía tener menos adecuación que los unisexuales, lo que sugiere que en su modelo se contempla la depresión por endogamia en los ancestros de las plantas dioicas. Ross (1978, 1980) propuso modelos para la evolución del dioicismo a partir de especies hermafroditas mediante genes de esterilidad femenina y masculina

parcial. Él asumió que los individuos que presentaban esterilidad femenina y masculina parcial poseían mayor fertilidad de polen y óvulos respectivamente por "compensación". A su vez, Ross (1980) sugirió la existencia de un multilocus que determina el dioicismo involucrando diversos genes de esterilidad femenina y masculina. Ross citó a *Thalictrum polygamum*, *T. fendleri* y *Vaccinium angustifolium* como ejemplos de la evolución del dioicismo a partir del hermafroditismo.

*Evolución vía ginodioica.* Ross (1980) distinguió dos tipos de sistemas ginodioicos, uno inestable donde se evoluciona hacia el dioicismo y otro estable. El primero está controlado por genes nucleares que controlan la esterilidad masculina como en *Pimelea*, *Fuchsia* y *Umbelliferae*. En el tipo estable la esterilidad masculina es de herencia citoplasmática como en *Labiatae*. En este caso, el sistema ginodioico no evoluciona hacia el dioicismo porque los genes nucleares y citoplasmáticos no están ligados; sin embargo, existen formas intermedias que no se agrupan bajo los grupos propuestos por Ross. Según Barret (2002) la ruta ginodioica es la más extendida, en ella se mutan genes que provocan esterilidad masculina, expandiéndose en la población cosexual y originando individuos femeninos e individuos hermafroditas dentro de la misma población. Posteriormente existen cambios genéticos que alteran la fertilidad femenina convirtiendo gradualmente el carácter hermafrodita en masculino (estéril femenino) propiciando así una población dioica.

*Evolución vía androdioica.* Teóricamente el dioicismo se puede establecer vía androdioica como un paso intermedio de igual manera que en el sistema ginodioico. Aunque se tienen algunas evidencias de que existe esta vía en la naturaleza, se piensa que es una forma rara de evolución hacia el dioicismo, debido a que la capacidad de los individuos hermafroditas para autopolinizarse evitaría la disponibilidad de óvulos para ser fecundados por polen proveniente de los individuos masculinos. Para que se viera favorecida esta condición, las plantas masculinas deberían producir polen con el doble de fertilidad que el de las hermafroditas. Estudios genéticos en algunas especies de *Datisca glomerata* muestran que un *locus* nuclear controla el fenotipo sexual; en este *locus* el carácter masculino es dominante sobre el hermafrodita (Wolf *et al.*, 2001).

*Evolución vía monoica.* Se asume que el dioicismo se origina de un ancestro primeramente hermafrodita que evoluciona al carácter monoico y después a través de una serie de mutaciones alteran la proporción de las flores masculinas y femeninas en

una planta. Barret (2002) asume que esta vía involucra la selección sobre la distribución de los sexos femenino o masculino en poblaciones monoicas, mismas que gradualmente incrementan la especialización de un sexo hasta originar plantas unisexuales como sucede en *Sagittaria latifolia* (Dorken *et al.*, 2002), esto puede suceder por mutaciones que generen esterilidad. La evolución del diocismo a partir del estado monoico puede presentar estados intermedios como el sistema ginomonoico primero y después ginodioico.

*Evolución via heterostíllica.* En la mayoría de las especies dioicas que evolucionan a partir de especies distilicas las flores masculinas derivan de flores con estilos cortos y estambres largos (morfo thrum) y las flores femeninas derivan de flores con estilos largos y estambres cortos (morfo pin), lo que sugiere que la funcionalidad está confinada a la accesibilidad de las estructuras sexuales más largas de la flor. Esta ruta se ha documentado para plantas de las familias Boraginaceae, Menyanthaceae y Rubiaceae (Barret, 2002).

## BASES MOLECULARES DE LA ESTERILIDAD MASCULINA Y LA EVOLUCIÓN AL DIOICISMO

La mayoría de los trabajos que se han realizado para conocer las bases moleculares que están involucradas en los sistemas de reproducción con flores unisexuales están basados principalmente en estudios sobre plantas modelos. Pocos son los estudios que se han realizado para conocer las bases moleculares en especies que se encuentran *in situ*. Sin embargo, se sabe que las especies han seguido distintos rumbos para la creación del dimorfismo sexual. La esterilidad masculina propicia que haya flores femeninas (pistiladas). Se ha propuesto que la esterilidad masculina es uno de los primeros eventos que se presentan durante la evolución al dioicismo (Charlesworth y Charlesworth, 1979).

Existen diversas estrategias por las cuales la función masculina se altera causando esterilidad masculina. Dichas formas de esterilidad masculina varían entre las especies, podemos encontrar la esterilidad masculina de origen nuclear, la de origen citoplásmico y la que se origina en algunas especies que portan cromosomas sexuales. De recién interés ha sido la participación de la muerte celular programada en el desarrollo floral y en los eventos que regulan el desarrollo del órgano masculino. Aunque la muerte celular podría ser consecuencia de alguna mutación nuclear o mitocondrial.

## CROMOSOMAS SEXUALES

De acuerdo con Guttman y Charlesworth (1998) al menos el 4 % de las especies son dioicas y algunas de éstas tienen determinación sexual mediada por cromosomas. La distribución taxonómica de sistemas de sexos separados y la determinación sexual cromosómica indican que los cromosomas sexuales en las angiospermas han evolucionado recientemente a partir de eventos independientes dentro de los diversos taxa, esto ofrece una oportunidad para estudiar los estados tempranos de la evolución de los cromosomas sexuales en plantas (Guttman y Charlesworth, 1998).

La evolución de los cromosomas sexuales presumiblemente se ha dado por la necesidad de limitar la recombinación entre los distintos genes que determinan el sexo. *Rumex acetosa* y *Silene dioica* son las dos plantas en las que se detectaron primero cromosomas sexuales heteromórficos (Ainsworth, 2000). *Rumex acetosa* tiene

un sistema cromosómico X/autosoma. Algunos otros miembros con sistema de compensación de cromosomas autosómicos son: *Humulus lupulus*, *H. japonicus* y *Cannabis sativa*, las tres son dioicas y pertenecen a la familia Cannabidaceae (Parker, 1990).

*Silene latifolia* y *S. dioica* tienen sistemas cromosómicos similares a los de los animales, donde el cromosoma Y actúa incrementando las características masculinas y suprimiendo las características femeninas (Grant *et al.*, 1994). Así la dosis XX origina individuos femeninos y XY a los individuos masculinos. Aunque varias especies de Cucurbitaceae son dioicas sólo se ha podido probar la presencia de cromosomas sexuales en *Coccinia indica* (Parker, 1990).

*Silene latifolia* posee cromosomas sexuales heteromórficos que son más grandes que los autosómicos. Existen 3 regiones cromosomales que contienen genes que determinan el sexo en los cromosomas Y de *S. latifolia*; 1) región de supresión femenina, en la que su delección provoca flores hermafroditas (Lardon *et al.*, 1999), 2) región involucrada en el temprano desarrollo de los estambres, su delección causa flores asexuales (Farbos *et al.*, 1999) y 3) región del desarrollo tardío de los estambres, su delección propicia flores con esterilidad masculina (Westergaard, 1946 en Lengerova *et al.*, 1999). Estas tres regiones han sido recientemente corroboradas por Lebel-Hardenack *et al.* (2002). Sin embargo, se desconocen los genes involucrados en estas tres zonas. Diversos grupos de investigación han tratado de aislar genes expresados específicamente en algún sexo o ligados a cromosomas sexuales y otras secuencias de ADN en un intento de encontrar los genes que determinan el sexo en *S. latifolia* (Kejnovsky *et al.*, 2001). Matsunaga *et al.* (1996, 1997) aislaron los genes MROS, los cuales son un grupo de cuatro genes expresados específicamente en órganos reproductivos masculinos de *S. latifolia*. Zhang *et al.* (1998) encontraron cinco marcadores ligados al cromosoma Y. Delichère *et al.* (1999) localizaron en el cromosoma Y el gen *SIY1*, aunque éste no está involucrado en la determinación sexual. Atanassov y colaboradores (2001) caracterizaron un nuevo gen ligado al cromosoma Y, *SIY4*, el cual también tiene su homólogo en el cromosoma X (*SIX4*). Filatov *et al.* (2001) estudiaron la diversidad nucleotídica en *SIY1/SIX1*. Moore *et al.* (2003) identificaron un par de genes ligados al sexo DD44X/DD44Y. Sin embargo, Guttman y Charlesworth (1998), así como, Kejnovsky *et al.* (2001) encontraron que los genes *MROS* no son específicos del cromosoma sexual Y, sino que también se localizan en cromosomas autosómicos y al menos 2 copias de *MROS3* están ligadas al cromosoma X.

## ESTERILIDAD MASCULINA

La mayor parte de los pasos del desarrollo del androceo están controlados por genes nucleares (Chaudhury, 1993). Cuando se altera algún evento involucrado en el desarrollo de los estambres se puede conducir a la esterilidad masculina, la cual se define como la incapacidad de aportar los gametos masculinos para la reproducción sexual.

La esterilidad masculina ha sido ampliamente documentada en poblaciones naturales de especies de plantas, su persistencia y su propagación han sido teóricamente demostradas como el primer paso en la evolución del dioicismo (Charlesworth y Charlesworth, 1979). La desviación de recursos inicialmente destinados a la producción de granos de polen para la formación de semillas en individuos con esterilidad masculina podría ser un posible mecanismo que permita la propagación de la o las mutaciones responsables de la esterilidad masculina (Williams *et al.*, 1998). La esterilidad masculina garantiza el entrecruzamiento en líneas de plantas que son autogámicas y además puede ser utilizada para producir líneas híbridas con un incremento en la productividad del cultivo.

En términos generales existen dos tipos de esterilidad masculina, estas son la esterilidad masculina nuclear (donde se ven alterados genes nucleares) y la esterilidad masculina citoplásmica (se alteran genes del DNA citoplásmico).

### ESTERILIDAD MASCULINA NUCLEAR

De acuerdo con Chaudhury (1993) existen diferentes categorías de esterilidad masculina mediada por genes nucleares. En la primera categoría las mutantes con esterilidad masculina carecen totalmente del órgano masculino; mientras que en la segunda categoría las mutantes muestran órganos masculinos morfológicamente normales pero carecen de polen; en la tercer categoría las mutantes poseen polen no funcional; por último está la categoría con anteras aberrantes. Otras mutantes con esterilidad masculina son deficientes en el control temporal de la formación de polen.

Existen diversos estudios que describen las mutantes con esterilidad masculina en distintas especies de plantas, tales como las mutaciones que afectan la formación del órgano masculino, mutaciones que afectan el desarrollo durante los estados premeióticos, meióticos y postmeióticos, mutaciones que alteran el desarrollo de la

pared de la antera, mutaciones que evitan la liberación del grano de polen, mutaciones que reducen o suprimen la funcionalidad del polen (Ver Apéndice I).

MUTACIONES QUE ALTERAN EL ÓRGANO SEXUAL. La identidad de los órganos florales está especificada por tres clases distintas de genes homeóticos denominados A, B y C; la acción de los genes ABC se ha descrito en un modelo basado en estudios de mutantes homeóticas (Coen y Meyerowitz, 1991). Diversos estudios moleculares y genéticos revelaron que la identidad de los primordios de estambre se encuentran regulados por la combinación de genes de la clase B y C en *A. thaliana* (Ma y dePamphillis, 2000). En *A. thaliana* se requieren los genes de clase B *APETALA3* y *PISTILLATA* (Bowman *et al.*, 1989) y los de clase C *AGAMOUS* (Yanofsky *et al.*, 1990) y *SEPALLATA1/2/3* para la iniciación de las anteras. En las mutantes homeóticas *pistillata* (*pi*) y *apetala* (*ap-3*) se ve afectada la identidad de los pétalos y estambres remplazándolos por sépalos y carpelos respectivamente (Bowman *et al.*, 1989).

MUTANTES DE ESTADOS PREMEIÓTICOS. Existen mutantes en las que sí se forman los estambres pero no hay formación de tejido esporógeno. Un ejemplo es la mutante del gen *NOZZLE* (*NZZ*). El posible factor de transcripción *NZZ* tiene un papel central en el desarrollo de los esporangios femeninos y masculinos. La mutante *nzz* no forma nucela ni se diferencia el microsporangio (Schieffhale *et al.*, 1999).

MUTANTES DE ESTADOS MEIÓTICOS. Los genes que son parte de la maquinaria de la meiosis durante la cohesión de los cromosomas, la sinapsis, la recombinación y la segregación de los cromosomas, pueden tener alteraciones que deriven en fenotipos estériles debido al erróneo proceso meiótico (Venkata *et al.*, 2003).

En *A. thaliana* se han descrito genes involucrados directamente en el proceso meiótico como el gen *DYAD1/SWITCH1* (*SWI1*) (Mercier *et al.*, 2003) y el gen *SOLO DANCERS* (Asumí *et al.*, 2002). Cuando estos genes se mutan se afecta la meiosis causando alteraciones en el desarrollo de las microsporas que derivan en esterilidad masculina.

Se sabe que en animales, el progreso de la meiosis está controlado por puntos de revisión ("checkpoints") que monitorean el funcionamiento de los cromosomas durante este proceso. Las mutaciones que afectan la sinapsis y la recombinación permiten el arresto de la meiosis en el estado de paquiteno (Edelman *et al.*, 1996). La mayoría de las mutantes meióticas de plantas completan la meiosis y la citocinesis, pero producen microsporas anormales, contrario a lo que sucede en las mutantes meióticas de levaduras y animales, donde se arresta el desarrollo de las células

meióticas y/o mueren. Se sugiere que en la mutante *duet/male meiocyte death1(mmd1)* de *A. thaliana* existe un tipo de control similar al de animales (Venkata *et al.*, 2003; Yang X. *et al.*, 2003). En *duet/mmd1* después de la diacinesis las células madres de las microsporas presentan defectos en los cromosomas, citoplasma colapsado dejando un espacio entre éste y la pared de calosa, fragmentación de la cromatina y muerte celular antes de la citocinesis, reducción en el número de estambres y longitud de los filamentos respecto al tipo silvestre, no se detectaron alteraciones en las capas de la antera de la mutante, pero los autores no descartan esta posibilidad (Yang X. *et al.*, 2003). El gen *DUETIMMD1* codifica una proteína con homeodominio PHD-finger involucrado en la organización cromosómica y en el proceso meiótico de las células madres de las microsporas (Venkata *et al.*, 2003; Yang X. *et al.*, 2003).

En la mutante *atm* de *A. thaliana* se propicia un desorden en la estabilidad de los cromosomas. En la mutante *Atatm* (*Arabidopsis thaliana ataxia telangiectasia mutant*) no se induce la transcripción de los genes involucrados en la reparación y o detección de rupturas de DNA generadas por radiación, además las mutante son parcialmente estériles debido probablemente a los abundantes fragmentos cromosómicos que se producen durante la meiosis (García *et al.*, 2002).

Sanders *et al.* (1999) por mutagénesis dirigida crearon la mutante *fat tapetum* en *A. thaliana*. En esta mutante el desarrollo de las anteras ocurre de manera similar que en el tipo silvestre hasta el inicio de la meiosis. La capa media junto con el tapete persiste y se agrandan significativamente al principio de la meiosis colapsando los productos meióticos dentro del lóculo de la antera. Aunque los autores mencionan que no saben si estos productos son el resultado de una meiosis normal o anormal. Posteriormente la antera continúa un desarrollo anormal y el endotecio tiene una degeneración anormal. En la etapa 12 la única capa que se distingue de la pared de la antera es la epidermis. La epidermis y el tejido conectivo son similares al que presenta el tipo silvestre.

MUTANTES DE ESTADOS POSTMEIÓTICOS. Se han descrito diversas mutaciones que alteran el correcto desarrollo de la antera después de la meiosis. El gen *MALE STERILITY1 (MS1)* de *A. thaliana* es un factor de transcripción que controla el desarrollo de la antera y el polen. En la mutante *ms1* la degeneración del polen ocurre tan pronto como se liberan las microsporas de la tétrada, en ese momento el tapete presenta severas alteraciones, con el citoplasma altamente vacuolado. La proteína MS1 tiene homología con el motivo PHD-finger encontrado en algunos factores de



transcripción (Wilson *et al.*, 2001). Otras mutaciones se ven reflejadas en la imposibilidad de tener dehiscencia. La mutante *defective anther dehiscence1* (*dad1*) de *A. thaliana* muestra defectos en la dehiscencia de la antera y la maduración del polen que pueden restablecerse con la aplicación exógena de ácido jasmónico o linoleico (Ishiguro *et al.*, 2001). Las mutantes *atmyb26*, *non-dehiscence1* y *delayed dehiscence* (*dde2-2*) entre otras, se han descrito en *Arabidopsis* y carecen de dehiscencia originando esterilidad masculina, por que los granos de polen no están disponibles para la fecundación. En las mutantes *dwarf d2*, *d3* y *d5* y en las mutantes *anther-ear an1* y *an2*, las anteras son más pequeñas de lo normal (Kaul, 1988).

#### ESTERILIDAD MASCULINA CITOPLÁSMICA

La esterilidad masculina citoplásmica se define como la incapacidad de producir o liberar polen funcional sin alterar la fertilidad femenina y se ha demostrado que está más asociada con la mitocondria que con el cloroplasto, además es el clásico ejemplo de conflicto genómico entre genes nucleares y citoplásmicos de herencia materna. Frecuentemente las plantas con esterilidad masculina citoplásmica se caracterizan por tener fenotipos florales anormales y alteraciones en la expresión de genes mitocondriales (Mackenzie *et al.*, 1994). De acuerdo con Shichua *et al.* (1996) la esterilidad masculina citoplásmica se observa en más de 150 especies de plantas y representa la oportunidad de investigar las funciones específicas de la mitocondria en estados de desarrollo cruciales.

La fertilidad en líneas con esterilidad masculina citoplásmica puede restablecerse por genes nucleares llamados genes restauradores de la fertilidad (*rf*) (Liu *et al.*, 2003). Los mecanismos de esterilidad masculina citoplásmica y los restauradores de la fertilidad han sido estudiados principalmente en cultivos tales como arroz, maíz, col, petunia, girasol, centeno, frijol, cebada, etc. (Shichua *et al.*, 1996).

La expresión de nuevas secuencias de DNA mitocondrial que contienen marcos de lectura abierta (ORF- open reading frame) son las responsables de generar esterilidad masculina citoplásmica (Shichua *et al.*, 1996). Estos genes quiméricos producen proteínas diferentes a las que producen los genes de individuos fértiles ya que su incorporación dentro de la membrana mitocondrial o de los complejos multienzimáticos puede desencadenar alteraciones en la función de la mitocondria (Hernould *et al.*, 1993).

Si bien, en todos los casos de esterilidad masculina citoplásmica intervienen genes quiméricos o alteraciones en las secuencias de genes principalmente mitocondriales, se ha encontrado que los mecanismos que la propician así como los restauradores que participan en restablecer la correcta función citoplásmica son diferentes en los sistemas estudiados.

En algunas líneas con esterilidad masculina citoplásmica la ausencia de producción de polen se debe a la degradación prematura del tapete, lo que lleva al aborto de las microsporas (Bino, 1985; en Bereterbide, *et al.*, 2002), mientras que en otras líneas se afecta tanto el desarrollo floral como la microsporogénesis (Kaul, 1998).

Burk (1967) creó una línea de tabaco aloplásmica con esterilidad masculina citoplásmica Nta(rep)S, en la cual se desarrollan estambres con filamentos cortos y anteras colapsadas y algunas se fusionan con el gineceo. El responsable de la esterilidad masculina citoplásmica es un nuevo fragmento transcrito de la mitocondria, el orf 274. La fertilidad masculina y el desarrollo floral puede restaurarse introduciendo un fragmento cromosomal de *N. repanda* que contiene el restaurador dentro del núcleo de *N. tabacum* (Bergman, *et al.*, 2000). Farbos *et al.* (2001) mostraron que las anomalías florales en la línea Nta(rep)S comienza durante la formación del primordio. Los verticilos 3 y 4 se fusionan parcialmente entre estambres y carpelos, indicando que se afectó la coordinación entre los genes cadastrales (regulan la expresión de otro gen floral) y los genes de identidad de los órganos (Bonnet *et al.*, 1991). Al sobre expresar el gen SUPERMAN de *Arabidopsis* en la línea aloplásmica se da una restauración parcial del desarrollo floral a través del restablecimiento de los límites entre los verticilos sexuales, con la consecuente producción de polen funcional (Sakai *et al.*, 2000).

La esterilidad masculina citoplásmica en frijol se asocia con una secuencia mitocondrial de 3 Kb denominada pvs (por sus siglas en inglés *Phaseolus vulgaris* sterility sequence) que codifica dos orf (de 2997 y 720 pares de bases) con porciones derivadas del cloroplasto. En las líneas con esterilidad masculina citoplásmica, el depósito de calosa es anormal, el desarrollo del grano de polen se detiene en estado de tétrada, las microsporas mantienen conexiones citoplásmicas a través del desarrollo, indicando citocinesis aberrante o incompleta. La restauración de la fertilidad se da por la pérdida de la secuencia mitocondrial pvs (Johns *et al.*, 1992; Abad *et al.*, 1995). Shichuan *et al.* (1996) introdujeron la secuencia pvs (orf239) de frijol en el genoma nuclear de tabaco y observaron que causa alteraciones similares a las que presenta el frijol transgénico.

Worral y colaboradores (1992) describen que la esterilidad masculina citoplásmica en algunas líneas de *Petunia* se debe a la temprana actividad de la calasa, como consecuencia se degrada prematuramente la calosa, durante la profase I de las células madres de las microsporas. El tapete se hipertrofia. La meiosis sucede normalmente en la mutante, el resultado son microsporas que tienen una delgada pared celular y que carecen de ornamentaciones. La prematura degradación de la calosa es suficiente para causar esterilidad masculina.

#### MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN PLANTAS

Las plantas, además de generar esterilidad en flores unisexuales a través de la mutación de genes nucleares o mitocondriales pueden atravesar por muerte celular programada, ocasionando la pérdida de la fertilidad.

Se piensa que la muerte celular programada emergió desde hace mil o dos mil millones de años con un origen que puede ser enraizado en organismos unicelulares (Ameisen, 1996), es un mecanismo vital en organismos multicelulares (Vaux y Korsmeyer, 1999). Debido a que el organismo controla la iniciación y ejecución del proceso de muerte celular, a este tipo de muerte se le denomina muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés programmed cell death). Sin embargo esta definición no menciona los mecanismos involucrados en dicha ejecución (Buchanan, 2002).

La apoptosis (termino referido a animales) es un tipo de PCD y está altamente regulada e involucra procesos dependientes de energía. En este proceso el DNA frecuentemente es digerido por endonucleasa dependientes de  $Ca^{2+}$  y forman fragmentos oligonucleosomales. Las caspasas son un tipo de cisteína con actividad de proteasa, involucradas en la apoptosis, participan en la iniciación del programa de apoptosis y en el desensamblaje de componentes celulares. Las caspasas son activadas por ruptura proteolítica (autocatalíticas). Su activación se dispara por interacción con cofactores o por remoción de inhibidores. En algunos casos la activación de las caspasas involucra ruptura por otras caspasas. Así, una cascada de ruptura de caspasas participa en la señalización de apoptosis. Las caspasas rompen el lado C-terminal en residuos de aspartato (Buchanan, 2000).

Noodén (2004) sugiere que existe un mecanismo similar de muerte celular programada entre los animales y plantas, incluyendo la fragmentación de la cromatina, la participación de endonucleasas y enzimas con propiedades de proteasas.

La PCD está involucrada en algunos procesos tales como: la xilogénesis, la senescencia, la patogénesis y diversos procesos de reproducción (Greenberg, 1996).

Durante la fase reproductiva después de la inducción floral, uno de los primeros eventos que ocurren en algunas plantas durante el desarrollo reproductivo es matar células destinadas a formar órganos no deseados. La muerte celular ocurre tempranamente en el desarrollo sexual en el selectivo aborto de los primordios de uno u otro órgano sexual en plantas unisexuales y durante el desarrollo de los órganos reproductivos y gametos tanto femeninos como masculinos (Wu y Cheung, 2000).

La producción de granos de polen funcionales depende de la muerte de tapete, un tejido cuya principal función parece ser nutrir y colaborar en la ornamentación de los granos de polen. La degeneración y muerte de tejidos de la antera resulta en la dehiscencia y en la dispersión de los granos de polen. Después de la meiosis de la célula madre de las megasporas se da la degeneración de algunas megasporas de la tétrada formada por meiosis antes de la formación del saco embrionario. Durante la expansión del megagametofito hay muerte de células de la nucela que lo rodean. Los tejidos femeninos que interactúan con el grano de polen tienen una dramática degeneración, incluso la muerte que asegura el encuentro de gametos femeninos y masculinos compatibles. El pistilo mata al polen invasor proveniente de una fuente incompatible. Después en la fase reproductiva, la muerte celular ocurre tanto en el polen como en el pistilo. Cuando no se entra adecuadamente a los diferentes programas de muerte celular durante el desarrollo floral (Fig. 1) se compromete el éxito reproductivo, algunas veces originando esterilidad.

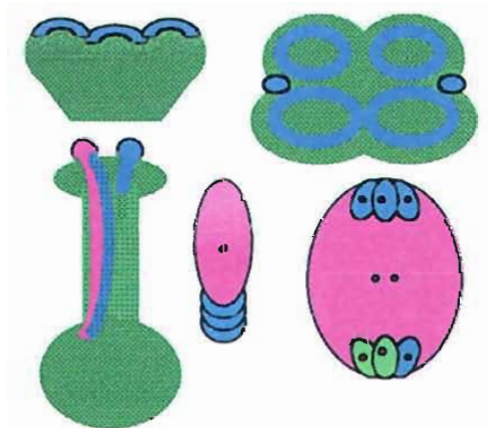


Fig. 1. Se observan algunos ejemplos donde ocurre muerte celular programada durante el desarrollo. Marcado en azul las células que degeneran. Tomado y modificado de Wu y Cheung (2000)

LA PCD Y LAS HORMONAS. Los aportes genéticos sobre la determinación del sexo y la caracterización de unos pocos genes indican que las hormonas en plantas juegan un papel crítico en este proceso. Por ejemplo, el fenotipo *ear* masculinizado en la variedad de maíz *dwarf* y las mutantes de antera *ear 1* pueden ser revertidos por tratamientos de ácido giberélico. El gen *ANTHER EAR 1* y uno de los genes *DWARF 3* codifican enzimas involucradas en la biosíntesis del ácido giberilico (Winkler y Helentjaris, 1995). Una serie de mutantes *tasselseed* (*ts*) muestran varios grados de feminización de espigas masculinas (Neuffer *et al.*, 1997). *TS2* es similar a una esteroide deshidrogenasa y detiene el desarrollo del órgano femenino en meristemas hermafroditas causando la muerte celular directa o indirectamente en el primordio del gineceo (Calderón- Urea y Dellaporta, 1999). Otras hormonas que son importantes para el desarrollo de la planta y puede afectar la fertilidad del grano de polen son los brassinoesteroides (Lebel-Hardenack *et al.*, 1977; Ainsworth *et al.*, 1995).

En *Actinidia* (con sistema sexual dioico) las flores estaminadas tienen pistilos rudimentarios y carecen de óvulos, mientras que las flores pistiladas tienen estambres que liberan granos de polen vacíos. La aplicación exógena de giberilinas a las flores estaminadas causó el desarrollo de ovario y estilo pero no se logró la producción de óvulos, en tanto que en las flores pistiladas no se restauró el correcto desarrollo de los granos de polen (Testolini *et al.*, 1999).

PCD DE LAS MICROSPORAS. Entre el desarrollo de las anteras de las flores pistiladas y estaminadas de *Actinidia deliciosa* no hay variaciones hasta el estado de tétrada de microsporas. El primer síntoma anormal en las microsporas de las flores pistiladas es la retracción de la membrana plasmática y condensación del citoplasma. Pese a las tempranas alteraciones de las microsporas de las flores pistiladas continúa el desarrollo del grano de polen hasta la primera división mitótica del mismo. Las microsporas estériles presentan fallas en el depósito de intina. La pared de la antera de ambos tipos florales parece desarrollarse de manera similar (Coimbra *et al.*, 2004). Por medio de la técnica TUNEL, se demostró que la muerte de las microsporas en *A. deliciosa* ocurre por PCD.

PCD DEL TAPETE. Uno de los mejores ejemplos para resaltar la importancia de la PCD en la fertilidad masculina, es la participación del tapete en la formación de los granos de polen (Dawson *et al.*, 1993). El grano de polen está cubierto por materiales proteicos y lipídicos y además posee una elaborada ornamentación esculpida en la

exina. La exina y los componentes que cubren al grano de polen son derivados mayoritariamente del tapete. Las células del tapete maduro carecen de una pared celular primaria desarrollada favoreciendo la actividad secretora de éste. Durante el desarrollo de las microsporas se piensa que el tapete tiene un fuerte papel en la nutrición. El tapete se degrada tan pronto como se lleva a cabo el desarrollo del polen mientras que el estomio muere al final del desarrollo de la antera (Ku *et al.*, 2003). El tapete también secreta una enzima que degrada la calosa (la  $\beta$ -1,3-glucanasa) y moléculas pécticas que ayudan a la liberación de las microsporas de la tétrada. La regulación temporal de la secreción de la calosa es crítica para la producción de granos de polen viables, ya que cuando se secreta prematuramente se propicia el aborto de las microsporas y las cubiertas del polen son defectuosas (Worrall *et al.*, 1992).

La ausencia de moléculas claves de la cubierta del grano de polen proporcionadas por el tapete, defectos en las enzimas producidas por el tapete, arresto en el desarrollo del tapete y el precoz deterioro de éste pueden todas provocar esterilidad masculina. Además si la PCD del tapete ocurre tempranamente se liberan moléculas que son dañinas para la maduración del grano de polen (Gorman y McCormick, 1997).

En la línea de arroz (*Oryza sativa*) con esterilidad masculina termosensible (TGMS- Thermosensitive genetic male sterility), Ku *et al.* (2003) sugieren que la esterilidad masculina está asociada con la prematura muerte del tapete. En el tapete el citoplasma se colapsa, se deforma la membrana celular, a partir del estado de tétrada, el tapete parece tener mayor número de vacuolas mientras que las líneas fértiles presentan citoplasma denso. La PCD se corroboró con la técnica TUNEL. Inmediato a la muerte del tapete el polen presenta signos de muerte, en cambio, la epidermis, el endotecio y la capa media no muestran alteraciones con respecto a las líneas fértiles de arroz. Al carecer de tapete funcional, las anteras de las líneas TGMS presentan depósito anormal de primexina en los granos de polen, ocasionando que el polen se rompa y libere su contenido. Ku *et al.* (2003) suponen que la prematura muerte celular del tapete se debe a un error en la regulación transcripcional.

PCD Y LA DEHISCENCIA. La liberación de los granos de polen maduros requiere del rompimiento de las células del estomio, una estructura especializada que está contigua a la epidermis y va a lo largo del lado lateral dividiendo a la antera (Golberg *et al.*, 1993). Un error en la dehiscencia puede ocasionar esterilidad masculina. Antes de la dehiscencia de la antera el tejido conectivo y el endotecio degeneran. La sólo

alteración del estomio puede bloquear la apertura de la antera, sugiriendo la importancia que tiene el estomio en la liberación de granos de polen (Beals y Goldberg, 1997).

PCD Y LA ESTERILIDAD MASCULINA CITOPLÁSMICA. En la mutante *cms-T* de maíz el rearrreglo del DNA mitocondrial crea un nuevo gen que codifica a URF13 la cual se encuentra en la membrana interna de la mitocondria, interfiere con el proceso de transporte de electrones y síntesis de ATP (Dewey *et al.*, 1987). En plantas *cms-T* el tapete presenta vacuolización, degeneración prematura y la vía del desarrollo del polen se bloquea después de la meiosis de la célula madre de la microspora. Por otro lado, se encuentra el restaurador de la fertilidad *rf2* de maíz que codifican para aldehído deshidrogenasas (ALDHs) las cuales actúan previniendo la prematura muerte celular en tejidos de la antera (Liu y Schnable, 2002).

Pocos estudios han logrado vincular directamente la esterilidad masculina con el programa de muerte celular, entre ellos se encuentra el realizado en girasol (Balk y Leaver, 2001). En el girasol la mutante *PET1-CMS* es el resultado de la cruce interespecífica de *Helianthus petiolaris* y *H. annuus*. El fenotipo mutante está asociado con la expresión de un nuevo gen mitocondrial, orf522, el gen fue creado por un evento de recombinación involucrando una inversión-inserción del gen *atp1*. En la mutante las células del tapete y las microsporas jóvenes pierden su forma, pero persisten las mitocondrias. En células del tapete de *PET1-CMS* el citocromo *c* se libera al citoplasma como sucede en la apoptosis en animales. La liberación del citocromo *c* precede a la condensación celular, fragmentación del DNA y a un decremento en la integridad de la membrana externa de la mitocondria. La prematura muerte del tapete origina la muerte de las microsporas generando un fenotipo estéril (Balk y Leaver, 2001).

## DESARROLLO DE LA ANTERA EN LA FAMILIA CACTACEAE

El desarrollo de la antera en las cactáceas comienza con primordios de anteras, formados por una protodermis que rodea al tejido arquesporial. Este último forma al tejido esporógeno y a la capa parietal primaria. Las células esporógenas originan a las células madres de las microsporas (CMMi), éstas se rodean por calosa antes de entrar a meiosis. La meiosis da como resultado, generalmente, una tétrada tetraédrica de microsporas. La calosa entonces es degradada y se liberan las microsporas de la tétrada. El tapete contribuye con la formación de la pared del grano de polen. Dos divisiones mitóticas del grano de polen joven originan un grano de polen tricelular maduro. La capa parietal primaria se divide para formar a las capas parietal secundaria externa que formará directamente al endotecio. A partir de la capa parietal interna se forman la capa media y el tapete de tipo secretor. Cada esporangio tiene cuatro capas, de afuera hacia adentro son: epidermis, endotecio, capa media y el tapete. Después de la meiosis el tapete y la capa media degeneran. La pared de la antera madura está conformada por epidermis y endotecio este último presenta engrosamientos de celulosa. La antera tiene dehiscencia longitudinal (Flores, 2002; Jiménez, 2002; Núñez *et al.*, 2001; Orozco, 2002).

## SISTEMAS SEXUALES DE LA FAMILIA CACTACEAE

La familia Cactaceae cuenta con al menos 2000 especies (Anderson, 2001). Las especies de la familia tienen un sistema de reproducción sexual predominantemente hermafrodita al igual que la mayoría de las angiospermas, en su flor coinciden los verticilos femenino y masculino, aunque raras veces por atrofia de los estambres o el estigma son unisexuales (Arreola, 1997).

Además de contar con flores bisexuales en la mayoría de las especies de la familia Cactaceae, se reconocen diferentes sistemas reproductores para 18 especies de 9 géneros distintos (Cuadro 1).

Las especies *Mammillaria dioica* y *M. neopalmeri* tienen presumiblemente un sistema reproductor ginodioico o posiblemente trioico, aparentemente difiriendo de una población a otra (Bravo-Hollis, 1978). Del Castillo (1986) y Del Castillo y González (1988) describen tres sistemas reproductores en *Opuntia robusta*: hermafrodita, dioico y trioico, encontrados en distintas poblaciones de esta especie. Fleming *et al.* (1998)



reportaron poblaciones trioicas y ginodioicas de *Pachycereus pringlei*, aunque las primeras están más extendidas geográficamente.

Tabla 1. Especies de la familia Cactaceae con sistemas reproductivos con flores unisexuales. Tomado y modificado de Orozco (2002).

| Especie                          | Sistema Reproductivo           | Referencia                   |
|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <b>SUBFAMILIA PERESKIOIDEAE</b>  |                                |                              |
| <i>Pereskia zinniflora</i>       | Dioico                         | (Leuenberger, 1986)          |
| <i>P. portulacifolia</i>         | Dioico                         | Leuenberger, 1986)           |
| <i>P. quisqueyana</i>            | Androdioico                    | Leuenberger, 1986)           |
| <b>SUBFAMILIA OPUNTIOIDEAE</b>   |                                |                              |
| <i>Consolea spinosissima</i>     | Subdioico                      | (Strittmatter, et al., 2002) |
| <i>Opuntia robusta</i>           | Dioico, Trioico y Hermafrodita | (Del Castillo, 1986)         |
| <i>O. sanfelipensis</i>          | Ginodioico                     | (Rebman, 1998)               |
| <i>O. wolffi</i>                 | Ginodioico                     | (Rebman, 1998)               |
| <i>O. quimilo</i>                | Funcionalmente dioico          | (Díaz y Cocucci, 2001)       |
| <i>O. stenopetala</i>            | Funcionalmente dioico          | (Orozco, 2002)               |
| <b>SUBFAMILIA CACTOIDEAE</b>     |                                |                              |
| <i>Selenicereus innesii</i>      | Ginodioico y Hermafrodita      | (Kimmach, 1982)              |
| <i>Pachycereus pringlei</i>      | Trioico y Ginodioico           | (Fleming et al., 1994)       |
| <i>Mammillaria dioica</i>        | Ginodioico y Trioico           | (Ganders y Kennedy, 1978)    |
| <i>M. neopalmeri</i>             | Ginodioico y Trioico           | (Lindsay y Dawson, 1952)     |
| <i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i> | Androdioico                    | (Valiente et al., 1997)      |
| <i>Echinocereus coccineus</i>    | F. dioico y Hermafrodita       | (Hoffman, 1992)              |
| <i>Mitrocereus fulviceps</i>     | Androdioico y Hermafrodita     | (S. Arias, com. pers.)       |

*Neobuxbaumia mezcalaensis* es una especie androdioica en la cual los granos de polen producidos por las flores bisexuales y estaminadas forman tubos polínicos (Valiente et al., 1997).

Han sido muy breves las descripciones en cuanto a las alteraciones morfológicas o a los cambios que presentan las flores unisexuales con respecto al desarrollo que presentan las flores hermafroditas en la familia Cactaceae. Ganders y Kennedy (1978) reportan flores de *M. dioica* bisexuales y pistiladas, ambas con producción de frutos y semillas aparentemente normales. Sin embargo, describen a las flores pistiladas con anteras indehiscentes y sin polen. Lindsay y Dawson (1952) reportaron para *M. neopalmeri* flores unisexuales y bisexuales, siendo estas últimas las más abundantes. Sin embargo, no mencionan si las flores unisexuales son pistiladas y/o estaminadas. Hoffman (1992) reporta a *Echinocereus coccineus* como una especie dioica, en donde las flores pistiladas poseen aparentemente partes masculinas y femeninas, pero los filamentos son más cortos y las anteras son más

pequeñas, están colapsadas y no producen polen. Fleming *et al.* (1994) reportan para *Pachycereus pringlei* cuatro tipos florales: bisexuales, estaminadas, pistiladas y neutras. Describen a las flores pistiladas (estériles masculinas) con anteras que carecen de polen y notablemente más pequeñas que las de las bisexuales. En *Opuntia robusta* las anteras de las flores pistiladas están atrofiadas y no tienen polen fértil, mientras que las que producen los granos de polen son las estaminadas y las bisexuales (Del Castillo, 1986; Del Castillo y González, 1988). Tanto en *Pachycereus pringlei* como en *Opuntia robusta* las flores estaminadas producen mayor cantidad de polen que las bisexuales. El único reporte en la familia Cactaceae donde se menciona la ausencia de estambres en flores pistiladas es en *Selenicereus innesii* (Kimnach, 1982).

La información sobre el desarrollo de las flores unisexuales es muy escasa y fragmentada. Una buena descripción morfológica y embriológica sobre una especie con sistema de reproducción unisexual de la familia Cactaceae es la realizada por Strittmatter *et al.* (2002) en *Consolea spinosissima*, la cual posee un sistema reproductivo subdioico con tres morfos florales (estaminado, pistilado y bisexual -poco representado-). En los primeros estadios de las flores pistiladas las anteras se desarrollan similar a las de las anteras estaminadas, el tapete de las flores pistiladas se degrada previo a la meiosis. Las células del tapete se agrandan, se vacualizan fuertemente y degenera poco después. Las células madres de las microsporas casi siempre degeneran alrededor de la Profase I, aunque en algunos casos observaron una "tétrada anormal". En algunos lóculos se observaron remanentes de la pared de calosa de las células madres de las microsporas, a la vez que es rodeado por las células del tapete y de la capa media degenerando. Las células del endotecio no se agrandan como en las flores estaminadas, pero persisten todo el tiempo, aunque la mayoría no desarrolla engrosamientos de celulosa. En la madurez la pared de la antera de los cuatro esporangios vacíos está compuesta por epidermis con estomas y endotecio. Durante la antesis las anteras de las flores pistiladas están, vacías, arrugadas y se encuentran por debajo del nivel del estigma. De acuerdo con Strittmatter *et al.* (2002) la alta vacuolización del tapete de las anteras de las flores pistiladas marca el comienzo de la muerte de esta capa sugiriendo que atraviesan por muerte celular programada.

## SISTEMA DE REPRODUCCIÓN DE *Opuntia stenopetala*

*Opuntia stenopetala* ( $\approx O. grandis \approx O. glaucescens$ ) pertenece a la serie Stenopetalae, es una planta rastrera, de artículos planos que presenta flores unisexuales (Bravo-Hollis, 1978; Britton y Rose, 1937; Parfitt, 1985; Gibson y Nobel, 1986).

De acuerdo con Orozco (2002) *Opuntia stenopetala* posee un sistema reproductor funcionalmente dioico. En las flores pistiladas el desarrollo de la antera se detiene en etapa de célula madre de las microsporas (no entra a meiosis), además de que el tapete es anormal y en el caso de las flores estaminadas se encontraron estilodios que no desarrollan lóbulos estigmáticos, ovarios poco desarrollados con pocos óvulos que no completan su desarrollo u ovarios que carecen de óvulos y en algunos casos no hay formación de la cavidad del ovario.

A partir del estudio realizado por Orozco (2002) en *Opuntia stenopetala* surge el interés por estudiar los mecanismos que generan la unisexualidad en esta especie. *O. stenopetala* es una especie que sirve para conocer los mecanismos involucrados en la unisexualidad en plantas debido a que los programas del desarrollo de órganos sexuales masculinos y femeninos se encuentran separados, permitiendo el estudio de los mismos o de los mecanismos que causan su esterilidad. Por lo que se realizaron estudios estructurales y moleculares que permitieran comparar el desarrollo de las anteras de las flores pistiladas y estaminadas para conocer los eventos y etapas precisas de desarrollo de *O. stenopetala*.

## **HIPÓTESIS**

Las flores pistiladas de *Opuntia stenopetala* no producen granos de polen debido a alteraciones en la expresión génica durante la meiosis que provocan la muerte celular programada en las anteras.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los cambios en la estructura celular y en la expresión génica durante el desarrollo de las anteras en flores funcionalmente masculinas y femeninas de *Opuntia stenopetala*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Estudiar los cambios estructurales en las anteras de las flores estaminadas y pistiladas de *O. stenopetala* en las etapas premeióticas, meióticas y postmeióticas.
- 2) Determinar si en las anteras de las flores pistiladas de *O. stenopetala* ocurre muerte celular programada.
- 3) Identificar y clonar genes expresados diferencialmente entre las flores estaminadas y pistiladas de *O. stenopetala*.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### SISTEMA DE ESTUDIO

*Opuntia stenopetala* Engelm., 1857 (Anderson, 2001): Plantas arbustivas con frecuencia formando matorrales, crecimiento rastrero apoyándose en el suelo por el margen del artículo. Tallos oblongos u obovados, de 10 a 25 cm de longitud, color verde grisáceo pero casi nunca glaucos. Aréolas distantes entre sí de 1 a 3 cm, con glóquidas abundantes y de 2 a 6 espinas moreno-rojizas hasta negras, de 2 a 5 cm de longitud. Flores unisexuales, rojo-anaranjadas, de 3 cm de longitud. Fruto globoso, de 3 cm de diámetro, con o sin espinas.

Distribución: Se distribuye en los estados de Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas, Querétaro, Guanajuato e Hidalgo.

Fenología: Florece desde el mes de marzo hasta junio, pudiendo encontrar frutos a partir de julio.

### ÁREA DE ESTUDIO

El material biológico de *Opuntia stenopetala* fue colectado en dos localidades ubicadas en el Municipio de Cadereyta, en el estado de Querétaro. Dichas localidades se encuentran sobre la carretera que va de Cadereyta a Vizarrón, cerca de la desviación a Bellavista. La primera se localiza en el kilómetro 12 (26° 00.000' N 104° 03.750' W) a 1959 msnm y la segunda en el kilómetro 17 (20° 41.212' N 99° 35.933' W) a 1969 msnm.

### COLECTA

Se realizaron dos transectos en cada localidad. Cada transecto tuvo como dimensiones 160 m de longitud por 20 m de ancho. Se tomaron en cuenta a todos aquellos individuos que estuvieran en etapa reproductiva (floración) dentro de cada transecto, en total se utilizaron 30 individuos masculinos y cerca de 30 individuos femeninos.

El material biológico (botones florales y flores en antesis) se colectó en los meses de marzo y mayo del 2003 y 2004. En el campo se etiquetaron las plantas de acuerdo al morfo sexual que presentaron las flores en antesis (individuos con flores

pistiladas o estaminadas) y un número asignado que correspondía a individuos diferentes. En el laboratorio los botones florales y flores en antesis se clasificaron por su longitud en las 13 etapas de desarrollo establecidas previamente por Orozco (2002, tabla 2).

Ya que las diferencias estructurales en el desarrollo entre las anteras de las flores pistiladas con respecto a las estaminadas comienzan antes de la meiosis (etapa 9-10), para esta investigación se estudiaron a detalle las etapas de desarrollo 7-12. La disección del material se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico. Parte del material se fijó, mientras que otra parte se disectó con mayor precisión removiendo las anteras y parte de los filamentos, este material se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.

Tabla 2. Etapas del desarrollo de *Opuntia stenopetala* establecidas por Orozco (2002). En el recuadro oscuro se remarcan las etapas estudiadas en la presente investigación.

| ETAPA | LONGITUD<br>(mm)  |
|-------|-------------------|
| 1     | 2.0- 3.1          |
| 2     | 3.2- 4.5          |
| 3     | 4.6- 7.3          |
| 4     | 7.4-8.7           |
| 5     | 8.8- 9.5          |
| 6     | 9.6-11.1          |
| 7     | <b>11.2- 13.8</b> |
| 8     | <b>13.9- 15.8</b> |
| 9     | <b>15.9- 17.2</b> |
| 10    | <b>17.3-18.7</b>  |
| 11    | <b>18.8-21.5</b>  |
| 12    | <b>21.6-25</b>    |
| 13    | >25               |

PARA ESTUDIAR ESTRUCTURALMENTE LOS CAMBIOS PREMEIÓTICOS, MEIÓTICOS Y POSTMEIÓTICOS EN ANTERAS DE FLORES ESTAMINADAS Y PISTILADAS DE *Opuntia stenopetala* SE REALIZARON LOS SIGUIENTES PROCEDIMIENTOS:

1. Fijación. Se utilizaron fijadores como: FAA (formaldehído-ácido acético-etanol al 96%) paraformaldehído al 4%, en buffer de PBS 1X (apéndice II); formaldehído al 2% y 4% en buffer de PBS 1X y Farmer (ácido acético-etanol 100%, 1:3).

2. Deshidrataciones graduales. A las muestras procesadas en FAA se les dio un lavado en agua corriente por dos horas y a las fijadas en paraformaldehído y formaldehído se enjuagaron con buffer de PBS 1X por dos horas. Posteriormente las muestras se deshidrataron gradualmente en etanol.

3. Inclusión y obtención de cortes histológicos:

Cortes en el microtomo rotatorio

*Paraplast*: Para la inclusión en paraplast el material biológico que se encontraba en etanol absoluto se pasó a xilol por 10 minutos, xilol-paraplast 1:1 por 12 horas incubando a 57°C, paraplast puro por 24 horas (57°C). Las muestras se orientaron en bloques y se obtuvieron cortes de 5 a 7 micrómetros de grosor. Posteriormente los cortes se desparafinaron y se tiñeron con safranina verde rápido (Safranina O 4g, Metilcelosolve 200ml, Etanol 96% 100ml, Agua destilada 5ml, Acetato de sodio 4g, Formol 8ml). A los cortes se les colocaron gotas de medio de montaje (entellan, electrón microscopy science) para hacer preparaciones permanentes y finalmente se observaron en el microscopio de luz. Las muestras que se fijaron en formaldehído y en paraformaldehído se procesaron de igual forma sólo que se destinaron para detección inmunológica.

Cortes en el ultramicrotomo

*Historesina*: Una vez deshidratadas las muestras se incluyeron en historesina (Leica Instruments) realizando cambios de 3 horas en una proporción 1:3, 1:1, 3:1 de historesina por etanol (Dubrovsky *et al.*, 2000). Finalmente se incluyeron las muestras en resina pura y se realizaron 2 cambios de 3 horas. Por cada 50 ml utilizados de resina se le agregaron 1.5 ml de endurecedor. Las muestras se colocaron en un molde de aluminio etiquetado y rápidamente se embebieron con la mezcla resina-endurecedor. El molde se cubrió perfectamente con parafilm (Dubrovsky, com. pers.), se dejó a temperatura ambiente. Una vez que solidificó la resina se hicieron bloques y se colocaron en portamuestras de madera. Se realizaron cortes de 1 a 4 micrómetros

en el ultramicrotomo. Una parte se tiñó con azul de toluidina acuosa al 1% y el resto se conservó para realizar inmunodetecciones.

*LR-White*: A partir de etanol absoluto las muestras que se incluyeron en LR-White (EBScience) se procesaron en resina:etanol en una proporción 1:3, 1:1, 3:1 cada cambio por 3 horas. Se realizaron dos cambios en LR-White puro por 12 horas. Las muestras se orientaron en cápsulas been y se polimerizó la resina en una estufa a 56°C. También se obtuvieron cortes de 1 micrómetro y se tiñeron con azul de toluidina.

4. Preparaciones aplastadas. Se procesaron anteras fijadas en FAA en distintas etapas de desarrollo, pasándolas por KOH 1N y después se colocaron en azul de anilina decolorada al 1% (en 0.1M de  $K_3PO_4$ ), se realizaron preparaciones aplastadas y se observaron en el microscopio de epi-fluorescencia con el propósito de observar las paredes de calosa más definidas. Adicionalmente se aplicó azul de anilina en cortes de anteras incluidas en paraplast para la detección de calosa.

5. Pruebas de viabilidad de polen. Se colectaron botones florales cercanos a la antesis y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. Después de dos días, se pusieron a desecar las anteras en cámaras con silica gel para permitir su dehiscencia. El polen se colocó en portaobjetos y se les agregó unas gotas del reactivo de Alexander (López *et al.*, 1998) y se observaron inmediatamente bajo microscopio de campo claro. Los granos de polen cuyo citoplasma es color magenta se consideraron viables, mientras que aquellos granos de polen cuyo citoplasma no se tiñó se consideraron no viables.

6. Longitud de los estambres. Se tomaron las medidas de la longitud de los estambres de flores en antesis de las flores pistiladas y estaminadas. La medida se realizó de la base del filamento hasta el ápice de las anteras. Los resultados se compararon entre sí sacando una media de los datos recolectados.

PARA DETERMINAR SI EN LAS ANTERAS DE LAS FLORES PISTILADAS DE *Opuntia stenopetala* OCURRE MUERTE CELULAR PROGRAMADA SE REALIZÓ LA TÉCNICA DE TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling).

La técnica TUNEL consiste en marcar el extremo 3'OH libre con nucleótidos modificados en los que una sonda fluorescente los evidencia, la responsable de pegar estos nucleótidos a los extremos 3'OH libres del DNA es la enzima tdt (terminal



deoxinucleotidil-transferasa), de esta manera la fragmentación del DNA en multímeros de oligonucleosomas durante la muerte celular se hace evidente.

1. Procesamiento para inmunodetecciones. TUNEL (Kit Apoptag). Reactivos en el apéndice III.

- ❖ Se obtuvieron cortes de 1 a 2 micrómetros de grosor, utilizando portaobjetos superfrost/plus (Fisher).
- ❖ Las preparaciones obtenidas de bloques en historesina y LR-White se hidrataron con PBS 1X por 15 minutos.
- ❖ Se secó el excedente.
- ❖ Se agregó proteinasa K y se dejó actuar por 15 minutos.
- ❖ Se hicieron 3 lavados de 2 minutos en PBS 1X.
- ❖ Se secó el excedente.
- ❖ Se le agregó buffer de equilibrio al tejido tratado con la proteinasa K y se cubrió con papel tipo celofán dejando actuar al buffer por 10 segundos.
- ❖ Se agregó el buffer de reacción a la enzima TdT y se cubrieron las muestras con esta mezcla dejando actuar por 1:30 h dentro de una cámara húmeda.
- ❖ Pasando el tiempo recomendado se metieron las preparaciones en un vaso coplin conteniendo buffer de stop, se agitaron por 15 segundos y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente.
- ❖ Se preparó el anticuerpo con la solución de bloqueo.
- ❖ Después de los 10 minutos de tratar con el buffer de stop se realizaron 3 lavados de 2 minutos en PBS 1X.
- ❖ Se secó el exceso de PBS.
- ❖ A las preparaciones se les aplicó la anti-digoxigenina conjugada con FITC (fluorescein isothiocyanate) más la solución de bloqueo, se cubrieron con plástico tipo celofán evitando el contacto con la luz, se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora en una cámara húmeda.
- ❖ Pasada la hora se retiró el plástico y se hicieron 4 lavados en PBS 1X por 2 minutos a temperatura ambiente.
- ❖ Rápidamente se enjuagó con agua destilada.
- ❖ Las preparaciones se cubrieron con una mezcla de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro) 10 $\mu$ g/ml disuelto en el medio de montaje Dako, se colocó un cubreobjetos y se analizaron las preparaciones en el microscopio de epi-fluorescencia y/o confocal.

2. Tinción de DNA. Las muestras fijadas en Farmer se incluyeron en paraplast. Se utilizó el microtomo para obtener cortes de 5 micrómetros. Los cortes se desparafinaron e hidrataron gradualmente tiñéndose con DAPI 10 $\mu$ g/ml para evidenciar el DNA y analizar posibles alteraciones estructurales en el núcleo.

Obtención de imágenes. Las preparaciones realizadas para este estudio fueron observadas en el microscopio óptico y se tomaron fotomicrografías a diferentes aumentos. Se utilizó el microscopio de epi-fluorescencia para el caso de las muestras procesadas con azul de anilina y DAPI. También se utilizó el microscopio confocal para la obtención de imágenes de las preparaciones utilizadas para la técnica TUNEL.

PARA IDENTIFICAR Y CLONAR GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE ENTRE LAS FLORES ESTAMINADAS Y PISTILADAS DE *O. stenopetala* LOS MÉTODOS FUERON LOS SIGUIENTES:

1. Extracción de RNA (Apéndice IV). Dado que nuestro análisis intenta conocer las etapas premeióticas, meióticas y postmeióticas y los análisis estructurales mostraron que la meiosis ocurre en la etapa 10 del desarrollo, la extracción de RNA total abarcó de la etapa 7 a la 12 tanto para anteras de estaminadas como pistiladas. De este rango de etapas de desarrollo realizamos dos grupos; el primero que abarcó las etapas 7, 8 y 9 y el segundo que comprendió las etapas 10, 11 y 12.

Durante la purificación del RNA se usó la enzima DNasa I (Roche) para eliminar los restos contaminantes de DNA ya que la presencia de algunos compuestos mucilaginosos que co-purifican con los ácidos nucleicos hace difícil su separación.

2. Geles de agarosa. Para evidenciar la presencia del RNA se realizaron geles de agarosa (Sigma) al 2% en todos los casos (Apéndice IV).

3. cDNA. A partir de nuestro RNA obtuvimos cDNA por RT-PCR. Primero se sintetizó la cadena sencilla y posteriormente la doble cadena (Apéndice V). Para evaluar la pureza y cantidad de cDNA obtenido, se diluyó 1  $\mu$ l de la solución de cDNA en 1 ml de agua y se midió su absorbancia a 260 y 280 nm. Los ácidos nucleicos absorben a 260nm y las proteínas a 280 nm, por lo que el cociente 260/280 que debe ser aproximadamente de 2.0 implicando que el cDNA purificado tiene una baja porción de

proteínas contaminantes. Para cuantificar la cantidad de cDNA se sabe que por cada unidad de densidad óptica (D.O.) corresponde 50 ng de DNA.

4. Obtención de caracteres moleculares (cDNA) por medio de AFLP's (*Amplified Fragment Length Polimorphisms*). El protocolo que se utilizó fue el desarrollado por Vos *et al.* (1995) y modificado por Liscum (1999).

El cDNA sintetizado a partir del RNA total se digirió utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI* (Invitrogene). A los extremos de los fragmentos se les ligaron adaptadores para *EcoRI* y *MseI* (apéndice V). Posteriormente se realizó una preamplificación por PCR (apéndice VI) para evaluar la eficiencia de ligado de los adaptadores al cDNA digerido.

Se separaron electroforéticamente 10  $\mu$ l del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.2% en buffer de TBE1 % (apéndice VII) para evaluar su amplificación en los rangos esperados (100 a 600 pb). Por otra parte, el producto de la reacción de PCR se diluyó 5 veces (1:5) para una posterior amplificación denominada PCR-AFLP (apéndice VIII). En esta amplificación se utilizaron primers *EcoRI*-AFLP marcados con el radioisótopo  $^{33}\text{P}$  y primers *MseI*-AFLP no marcados. En total se probaron ciento cincuenta combinaciones de pares de primers (Tabla 3). Los productos del PCR se mantuvieron a 4°C.

Tabla 3. Combinación de pares de primers para la obtención de AFLP's

| EcoRI $^{33}\text{P}$ -AFLP: | MseI:                   |
|------------------------------|-------------------------|
| AGACTGCGTACCAATTCT (43)      | GATGAGTCCTGAGTAAA (62)  |
| AGACTGCGTACCAATTCG (44)      | GATGAGTCCTGAGTAAT (63)  |
| AGACTGCGTACCAATTCC (45)      | GATGAGTCCTGAGTAAG (64)  |
| AGACTGCGTACCAATTCAA (46)     | GATGAGTCCTGAGTAAC (65)  |
| AGACTGCGTACCAATTCAT (47)     | GATGAGTCCTGAGTAAAA (66) |
| AGACTGCGTACCAATTCAG (48)     | GATGAGTCCTGAGTAAAT (67) |
| AGACTGCGTACCAATTCAC (49)     | GATGAGTCCTGAGTAAAG (68) |
| AGACTGCGTACCAATTCTA (50)     | GATGAGTCCTGAGTAAAC (69) |
|                              | GATGAGTCCTGAGTAATA (70) |
|                              | GATGAGTCCTGAGTAATT (71) |
|                              | GATGAGTCCTGAGTAATG (72) |
|                              | GATGAGTCCTGAGTAATC (73) |
|                              | GATGAGTCCTGAGTAAGA (74) |
|                              | GATGAGTCCTGAGTAAGT (75) |
|                              | GATGAGTCCTGAGTAAGG (76) |

5. Geles de acrilamida. Para visualizar los fragmentos amplificados, se realizaron electroforésis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 5% de la siguiente forma: se preparó el gel mezclando 60 ml de acrilamida al 5% para secuenciación prefiltrada (apéndice IX), 150  $\mu$ l de persulfato de amonio (10mM) y 40  $\mu$ l de TEMED. Se limpiaron perfectamente 2 vidrios para secuenciación con acetona y etanol al 70%; los separadores fueron colocados en el vidrio más grande y encima de éstos se puso el otro vidrio. Se sujetaron ambos vidrios con clips grandes. Se vació el gel dentro del espacio que dejan ambos vidrios evitando la formación de burbujas; finalmente se colocó el peine en la parte superior y se dejó polimerizando una hora a temperatura ambiente y luego se colocó a 4° C para que siguiera polimerizando toda la noche.

6. Electroforesis. En los geles de poliacrilamida se cargaron 7  $\mu$ l del cDNA amplificado (PCR-AFLPs) conteniendo el buffer de carga (apéndice IV). La electroforesis se realizó por dos horas a 2000 volts utilizando un buffer de TBE 1X (apéndice VII). El gel se transfirió a papel filtro (Whatman, 3mm), se cubrió con un plástico autoadherente y se secó al vacío a 80°C por tres horas.

7. Autorradiografía. Cuando el gel estuvo seco se marcó fluorescentemente en los extremos y se colocó bajo una placa fotográfica, ambos dentro de un cassette para autorradiografía; se expuso por aproximadamente 3 días. La película se reveló y fijó. Una vez revelada la película se analizó en una pantalla de luz para observar el patrón de bandas.

8. Selección de genes expresados diferencialmente. Cuando se detectaron diferencias entre las bandas de las flores pistiladas y estaminadas la película se alineó con el gel haciendo uso de las marcas fluorescentes. Los cDNAs candidatos a ser genes que se expresan diferencialmente (por presencia, ausencia o disminución de la intensidad de las bandas), fueron recuperados del gel y reamplificados por PCR utilizando "primers" universales y las condiciones del PCR de preamplificación (apéndice VI). Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2%, los fragmentos amplificados se recortaron del gel y se almacenaron a 4°C para ser recuperados por medio del kit Concert Rapid Gel Extraction System (GIBCO-BRL).

9. Clonación. Los fragmentos recuperados se ligaron a un vector PGEM-Teasy (Promega). Por otro lado se multiplicaron células competentes de *Escherichia coli*

DH5- $\alpha$  y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cuando se tuvo la reacción de ligado se descongelaron las células competentes y se les agregó la reacción de ligado para realizar la transformación, poniéndolas inmediatamente en hielo por 20 minutos, después a  $42^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos y finalmente en hielo por 2 minutos. Posteriormente se le agregaron  $400\ \mu\text{l}$  de medio LB líquido (apéndice X) más  $8\ \mu\text{l}$  de glucosa 1M. Se incubaron al menos 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación constante. Se centrifugaron 20 segundos. Al sobrenadante se le quitaron  $200\ \mu\text{l}$  de medio y se resuspendió el precipitado en el medio restante. Se tomaron las células resuspendidas y se sembraron en una caja petri con medio LB-agar+IPTG+x-gal. Se pusieron a crecer las colonias transformadas toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Las colonias que crecieron conteniendo los fragmentos ligados (colonias blancas) se resembraron en cajas petri para mantener las colonias.

Posteriormente se hizo la reacción de digestión de los plásmidos con los cDNAs clonados para verificar la presencia del inserto, se utilizó EcoRI para digerir el plásmido (apéndice X).

Se incubó 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se tomaron  $10\ \mu\text{l}$  de la digestión para corroborar en el gel de agarosa al 1.5% la presencia de los insertos.

10. Secuenciación. El DNA plasmídico se purificó con de las clonas usando el sistema Concert™ rapid plasmid miniprep (Gibco BRL). La concentración de DNA estuvo por arriba de  $300\text{ng}/\mu\text{l}$ . La secuenciación se realizó en el instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Las secuencias obtenidas se compararon con las existentes en el banco de datos utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A través del programa Work Bench (<http://workbench.sdsc.edu>) se obtuvo la probable secuencia peptídica empleando el algoritmo CLUSTAL W durante la alineación de las secuencias.

#### BÚSQUEDA DE MUTANTES SIMILARES A *Opuntia stenopetala*

Una aproximación para encontrar genes que participen en la generación de morfos unisexuales se hizo por medio de la búsqueda de mutantes que fueran similar a *O. stenopetala*. Debido a que no se tiene la secuencia reportada del gen *FAT TAPETUM*, la cual presenta mayor similitud con las flores pistiladas de *O. stenopetala*, no fue posible sintetizar "primers" para este gen. La mutante de *Arabidopsis mmd1* mostró similitud en cuanto a las alteraciones que muestra el desarrollo de las CMMi en comparación con el desarrollo de las CMMi de las flores pistiladas de *O. stenopetala*.

Además el gen *MMD1* mostró homología con el gen *MS1* de arroz. Ambos comparten un dominio PHD-finger. Cuando se mutan estos genes se conduce a la esterilidad masculina alterando diferentes etapas del desarrollo de las anteras.

Por lo anterior se sintetizaron "primers" contra dos regiones conservadas (Fig. 2) entre *mmd1* y *ms1*, usando el programa oligo analyzer (<http://www.idtdna.com>), para realizar amplificaciones por PCR, bajo las condiciones mostradas en el apéndice VI, a partir del cDNA de las anteras pistiladas y estaminadas de *O. stenopetala* y probar si se encuentra expresado diferencialmente. Durante la amplificación se tomó como control positivo el DNA y cDNA de *Arabidopsis thaliana*. Del producto del PCR se tomaron 10  $\mu$ l y se observaron en geles de acrilamida al 1.5%.



Fig. 2. Secuencias de nucleótidos donde se muestran las regiones conservadas entre *Arabidopsis* y *Oryza sativa* utilizadas para el diseño de primers (subrayadas con rojo). *mmd1* corresponde a la secuencia de *Arabidopsis* y *NM\_190132* corresponde a la secuencia de arroz.

## RESULTADOS

### ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS CAMBIOS PREMEIÓTICOS, MEIÓTICOS Y POSTMEIÓTICOS EN ANTERAS DE FLORES ESTAMINADAS Y PISTILADAS DE *Opuntia stenopetala*

El desarrollo de las anteras de las flores pistiladas y estaminadas comienza de manera similar con el surgimiento de múltiples primordios de anteras a partir del meristemo floral, que se encuentran rodeando a los primordios de carpelos. A su vez los primordios de estambres son circundados por los primordios de tépalos. Tanto las anteras de las flores pistiladas como estaminadas son tetraesporangiadas (Figs. 3 y 4). En la etapa 8 la pared de la antera de ambos tipos florales se encuentran conformadas, de adentro hacia fuera, por cuatro capas uniestratificadas: tapete, capa media, endotecio y ocupando la perifería la epidermis (Figs. 5 y 6). Estas capas rodean a las células madres de las microsporas (CMMi), originadas por divisiones mitóticas a partir de las células esporógenas (Figs. 7 y 8).

Es en la etapa 9 donde comienzan a hacerse visibles diferencias en cuanto al desarrollo de la antera entre las flores pistiladas y estaminadas.

### DESARROLLO DE LAS CÉLULAS MADRES DE LAS MICROSPORAS DE LAS FLORES ESTAMINADAS

En la etapa 9 de las flores estaminadas las CMMi, rodeadas por una pared de calosa, permanecen conectadas al estrato del tapete por algunas uniones citoplásmicas. En algunos casos, durante esta etapa se observó migración de la cromatina de las CMMi hacia la periferia del núcleo (Fig. 9). En esta etapa las CMMi que ocupan el centro de los microsporangios son las células más grandes que el resto de las células de la antera (Fig. 10).

En todas las CMMi de las anteras estaminadas observadas el citoplasma se hace más denso y la cromatina se compacta entrando al programa meiótico. Se observa durante la etapa 9 y principios de la 10 los primeros eventos meióticos como son la compactación de la cromatina en fibras evidentes que se expanden por el núcleo que aún se ve delimitado, así como la posterior desaparición del nucleolo, todo esto correspondiendo a la profase I (Fig. 11). En estas etapas las CMMi pierden



contacto con el tapete (Fig. 12) y comienzan a tener forma esférica. Pudimos observar parte los cromosomas alineados mostrando una metafase I (Fig. 13). Como resultado de la división meiótica se observó una tétrada tetraédrica rodeada por calosa (Fig. 14).

Es posible encontrar en un mismo lóculo a CMMi en diferentes estados de desarrollo que van desde interfase hasta tétrada pasando por distintas fases de la meiosis (Figs. 14 y 15).

Las cuatro microsporas que permanecen unidas por la calosa (Fig. 16) ya poseen paredes celulares independientes que servirá de molde para posteriores depósitos de materiales. La calosa es hidrolizada por calasa causando la separación de las tétradas de microsporas.

Después que se separan las microsporas (granos de polen joven, etapa de desarrollo 11), cuyo citoplasma es escasamente denso, el núcleo y todos los componentes celulares parecen estar desplazados hacia un extremo de la célula (Fig. 17). Cuando las microsporas se encuentran liberadas en el lóculo el siguiente paso es el depósito de material de origen esporofítico que proviene de la secreción del tapete de tipo glandular. Estos materiales de naturaleza lipoprotéica dan la ornamentación a la pared del grano de polen y contribuyen al depósito de moléculas involucradas en el reconocimiento específico del polen en el estigma. Paralelamente, el grano de polen joven tiene divisiones mitóticas (alrededor de la etapa 12 de desarrollo). Para este momento el citoplasma del grano de polen joven se vuelve denso y el núcleo se sitúa en posición central (Figs. 18 y 19). La primera división mitótica da como resultado a una célula vegetativa y una generatriz. La segunda división se da en la célula generatriz y se producen dos células espermáticas. Así el grano de polen maduro de *Opuntia stenopetala* es tricelular y posee una pared de exina tipo reticulada con aberturas colporadas (Figs. 20 y 21).

Los resultados para la viabilidad de los granos de polen maduros fue del 99.9 %, utilizando la prueba de Alexander (Figs. 22 y 23).

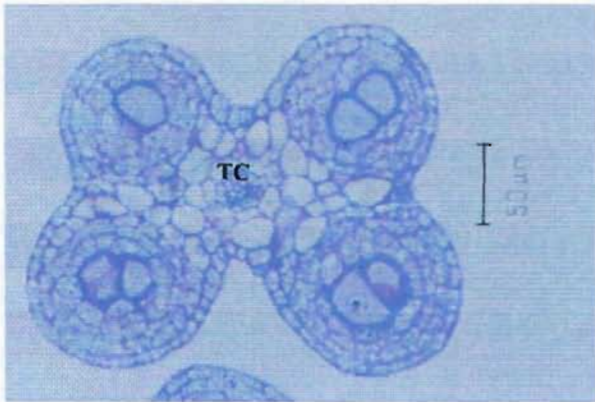


Fig. 3. Corte transversal de antera tetrasporangiada de flor estaminada en etapa 8. Tejido conectivo (TC). Barra 50  $\mu$ m.

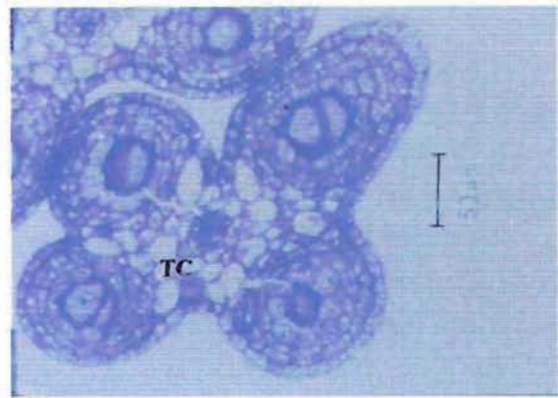


Fig. 4. Corte transversal de antera tetrasporangiada de flor pistilada en etapa 8. Tejido conectivo (TC). Barra 50  $\mu$ m.

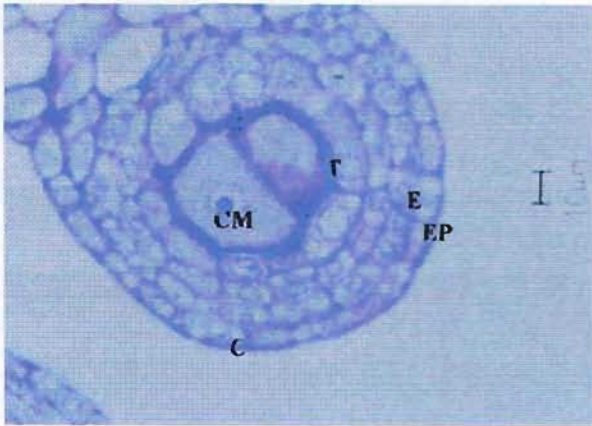


Fig. 5. Corte transversal de microsporangio de flor estaminada en etapa 8. Célula madre de las microsporas (CM), Tapete (T), Endotecio (E), Capa media (C), Epidermis (EP). Barra 10  $\mu$ m.

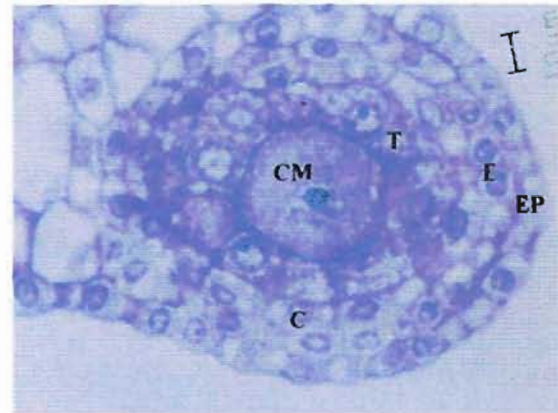


Fig. 6. Corte transversal de microsporangio de flor pistilada en etapa 8. Célula madre de las microsporas (CM), Tapete (T), Endotecio (E), Capa media (C), Epidermis (EP). Barra 10  $\mu$ m.

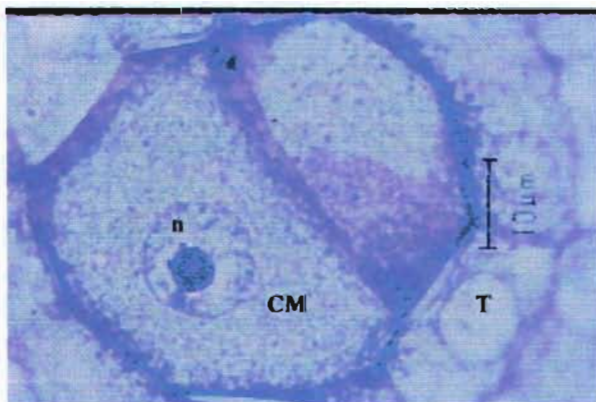


Fig. 7. Célula madre de las microsporas (CM) de flor estaminada en etapa 8. Núcleo de célula madre de las microsporas (n). Barra 10  $\mu$ m.

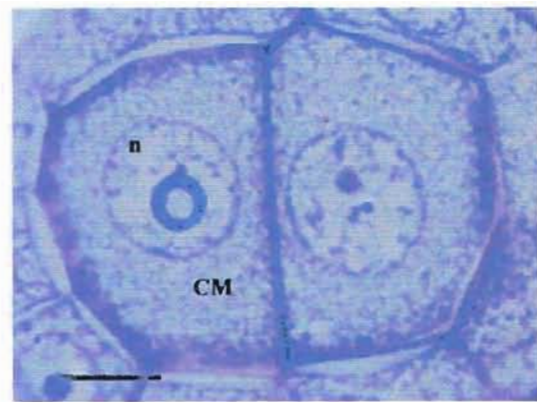


Fig. 8. Célula madre de las microsporas (CM) y tapete (T) de flor pistilada en etapa 8. Núcleo de célula madre de las microsporas (n). Barra 10  $\mu$ m.

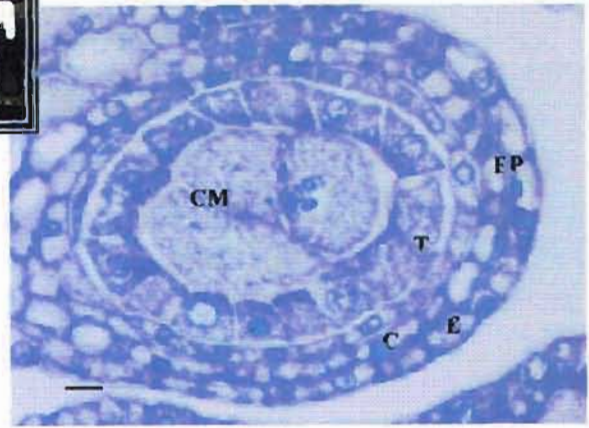
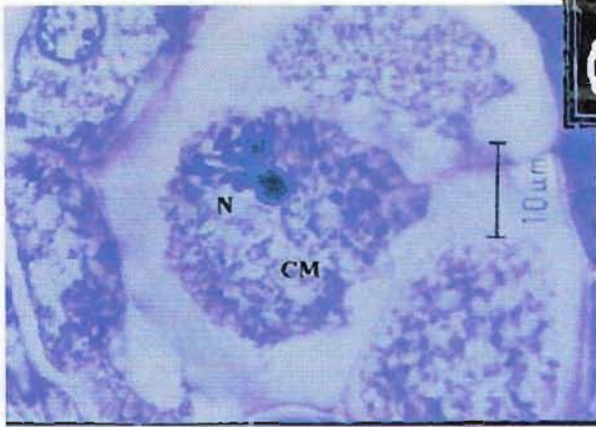


Fig. 9. Antera de flor estaminada en etapa 9. Célula madre de las microsporas (CM) mostrando desplazamiento de la cromatina, núcleo (N) Barra=10 µm.

Fig. 10. Microsporangio de flor estaminada en etapa 9. Célula madre de las microsporas (CM), Tapete (T), Capa media (C), Endotecio (E), Epidermis (EP). Barra=10 µm.

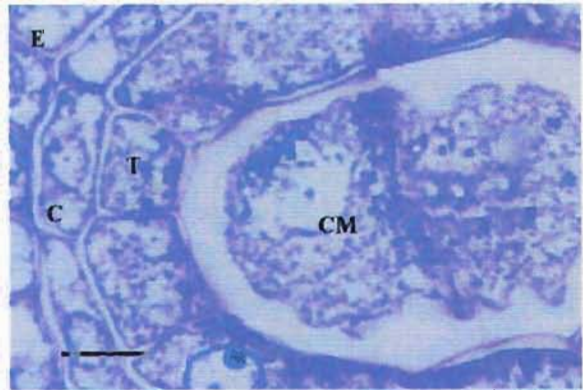
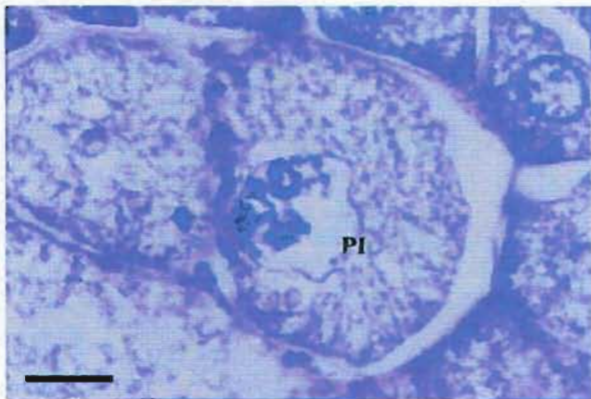


Fig. 11. Se observa la CMMi en profase I (PI) de flor estaminada. Barra=10 µm.

Fig. 12. Corte transversal de microsporangio de flor estaminada en etapa 9. CMMi durante la meiosis I. Barra=10 µm.

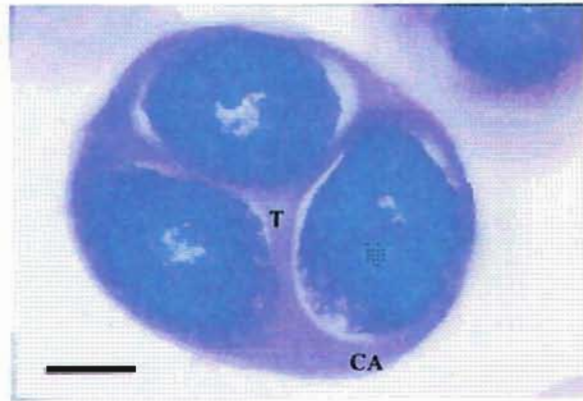
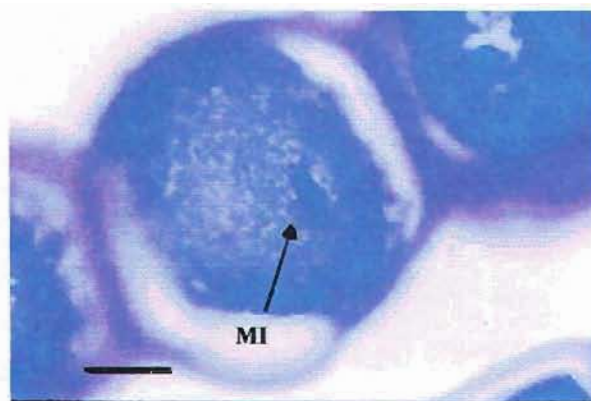


Fig. 13. Célula madre de las microsporas en estado de metafase I (MI) rodeada por calosa. Barra=10 µm.

Fig. 14. Tétrada de microsporas de tipo tetraédrico (T). Calosa (CA). Barra=10 µm.

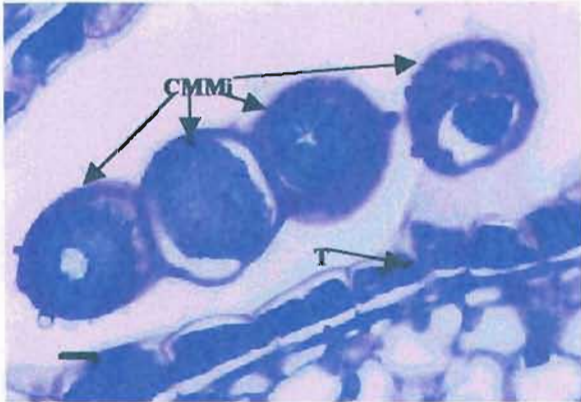


Fig. 15. Microsporangio de flor estaminada en etapa 10. Mostrando lóculo con células madres de las microsporas (CMMIs) en diferentes etapas de meiosis. Tapete (T). Barra=10  $\mu$ m.

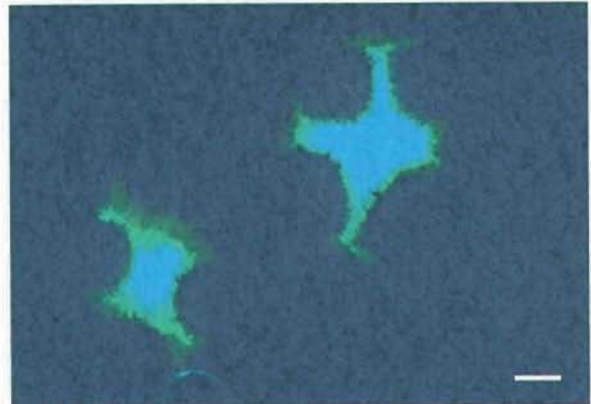


Fig. 16. Tétradas de microsporas con calosa detectada con azul de anilina y fluorescencia. Etapa de tétradas de microsporas. Barra=10  $\mu$ m.

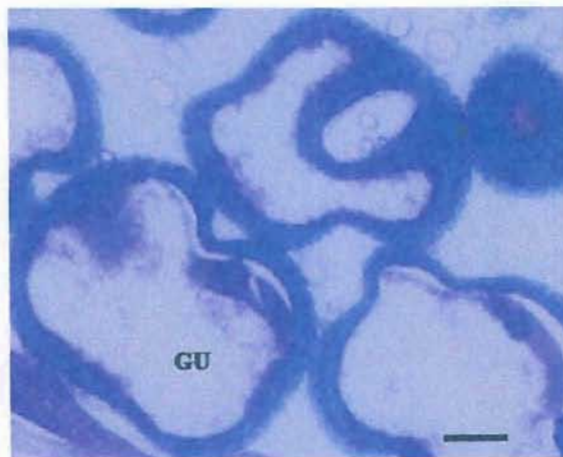


Fig. 17. Corte transversal de antera de flor estaminada en etapa 11. Granos de polen uninucleados (GU). Barra=10  $\mu$ m.

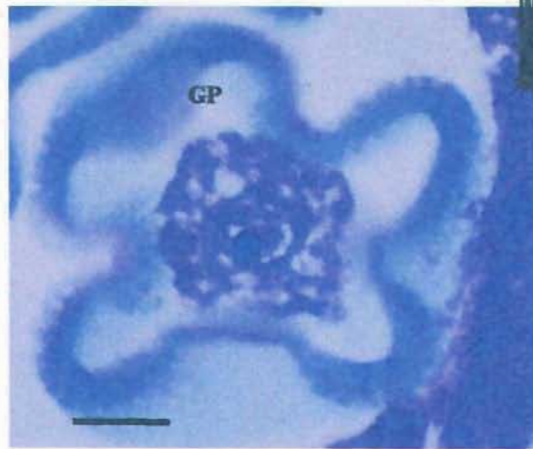


Fig. 18. Corte transversal de antera de flor estaminada en etapa 11. Grano de polen joven (GP). Barra=10  $\mu$ m.

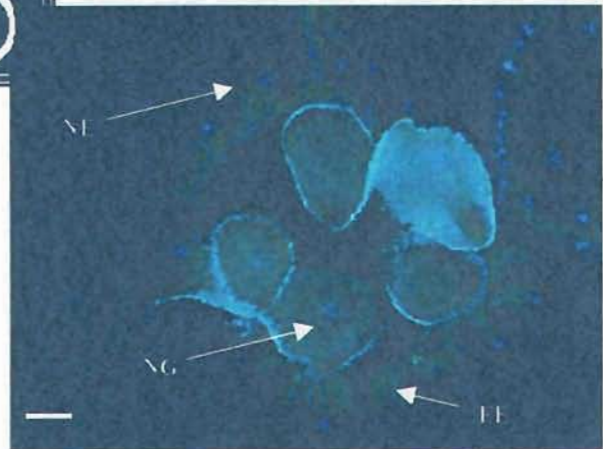


Fig. 19. Corte transversal de antera de flor estaminada en etapa 12. Núcleos de granos de polen (NG). Fibras de endotecio (FE). Núcleos de la epidermis (NE). Barra=50  $\mu$ m.

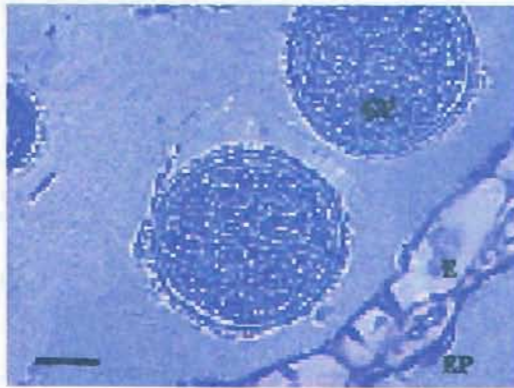


Fig. 20. Corte transversal de antera de flor estaminada en etapa 13. Granos de polen maduro (GP). Endotecio (E), Epidermis (EP). Barra=10  $\mu$ m.

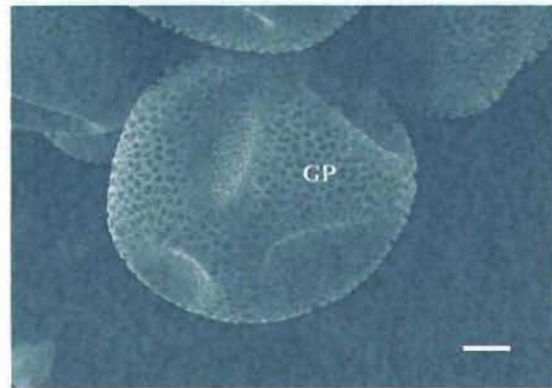


Fig. 21. Corte transversal de antera de flor estaminada en etapa 13. Granos de polen maduro (GP). Barra=10  $\mu$ m.

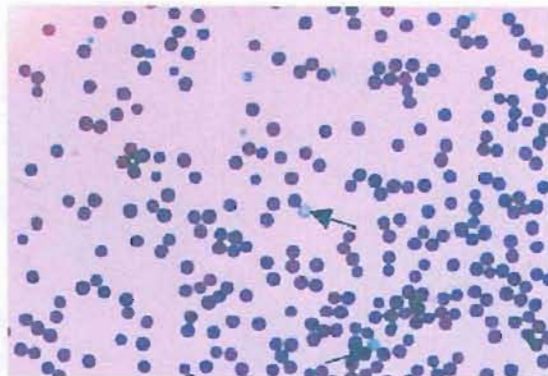


Fig. 22. Pruebas de viabilidad de los granos de polen. Los granos de polen rojos son viables y los verdes no viables (flechas).

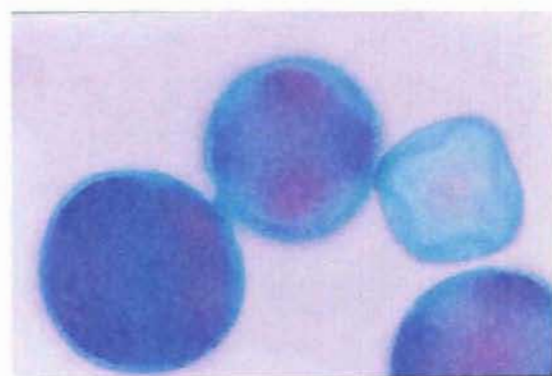


Fig. 23. Pruebas de viabilidad de los granos de polen. Granos de polen rojos (viables) y verdes (no viables).

## DESARROLLO DE LAS CÉLULAS MADRES DE LAS MICROSPORAS DE LAS FLORES PISTILADAS

En la etapa 8 las anteras de las flores pistiladas poseen los cuatro estratos descritos para la pared de la antera, mientras que las células madres de las microsporas (CMMi) se encuentran al centro del microsporangio. Las CMMi incrementan su tamaño (Fig. 8). Hacia finales de la etapa 8 las CMMi de las flores pistiladas presentan diferencias con respecto a las CMMi de las flores estaminadas, en las primeras la cromatina se compacta de forma particular hacia un extremo del núcleo (Figs. 24 y 25).

En la etapa 9 se observa que sólo una porción de células madres de las microsporas de las flores pistiladas se rodean por calosa (Fig. 26). Las CMMi se empiezan a vacuolar anormalmente (Fig. 27). Hacia finales de la etapa 9 el citoplasma de estas células se colapsa creando una separación entre el citoplasma y la pared celular (Fig. 28). Las vacuolas se hacen más evidentes. El núcleo se encuentra aparentemente con bordes irregulares (Fig. 29).

En la etapa 10 comienzan a colapsarse paulatinamente las CMMi (Fig. 30). Las células madres que deberían experimentar el proceso meiótico se ven sumamente alteradas (Fig. 31). En las CMMi de algunas anteras se encontró evidencia de que estas células entran al programa meiótico progresando al menos hasta la profase I, donde se hacen visibles las fibras de cromatina, sin embargo, algunas CMMi adyacentes se observaron sumamente colapsadas (Fig. 32). La integridad celular de las CMMi se ve afectada en su totalidad (Fig. 33).

A finales de la etapa 10 y principios de la 11 todas las CMMi se observan como restos celulares colapsados y se definen poco las CMMi entre sí, dando la apariencia de un continuo "plasmodio" (Fig. 34). Además al utilizar azul de anilina para evidenciar calosa da positivo en esta etapa (Figs. 35 y 36). En las etapas más avanzadas ya no se aprecian los límites celulares ni sus compartimentos, en su lugar se observa un continuo de material no definido. Incluso en la etapa 13 permanecen restos de calosa en los desechos no compartimentalizados de las anteras (Figs. 37 y 38).

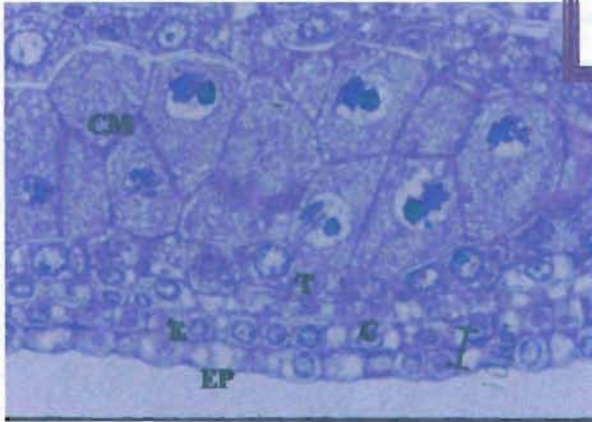


Fig. 24. Microsporangio de flor pistilada en etapa 8. Célula madre de las microsporas (CM) mostrando cromatina compactada, Tapete (T), Endotecio (E), Capa media (C), Epidermis (EP). Barra 10  $\mu$ m.

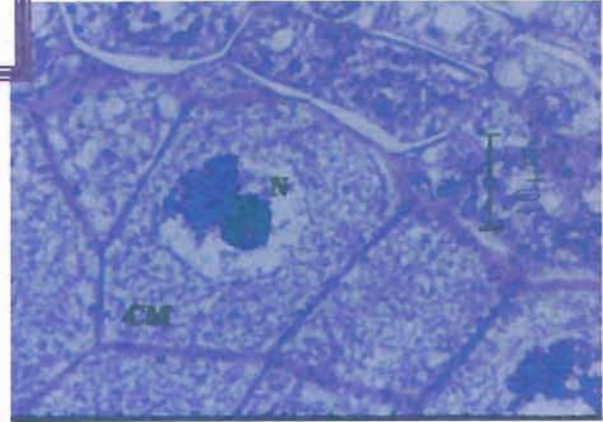


Fig. 25. Corte transversal de célula madre de las microsporas (CM) de flor pistilada en etapa 8. Núcleo de célula madre de las microsporas (N) mostrando la cromatina compactada hacia un extremo. Barra 10  $\mu$ m.

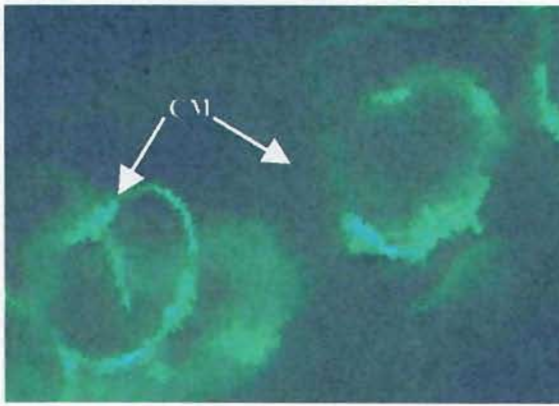


Fig. 26. Células madres de las microsporas de las flores pistiladas en etapa 9. Se observa pared de calosa cuya depositación es irregular.

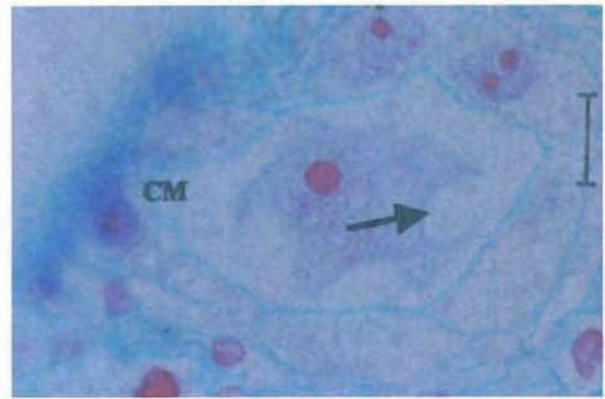


Fig. 27. Corte transversal de antera de flor pistilada en etapa 9. Célula madre de las microsporas (CM) con vacuolas en su citoplasma (flecha). Barra 10  $\mu$ m.

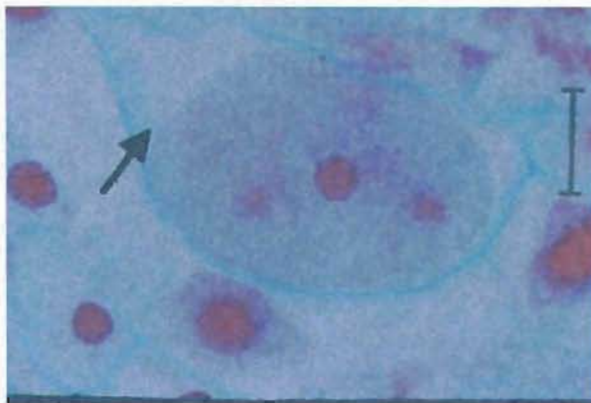


Fig. 28. Corte transversal de célula madre de las microsporas (CM) de flor pistilada en etapa 9. El citoplasma se colapsa con respecto a la pared celular (flecha). Barra 10  $\mu$ m.

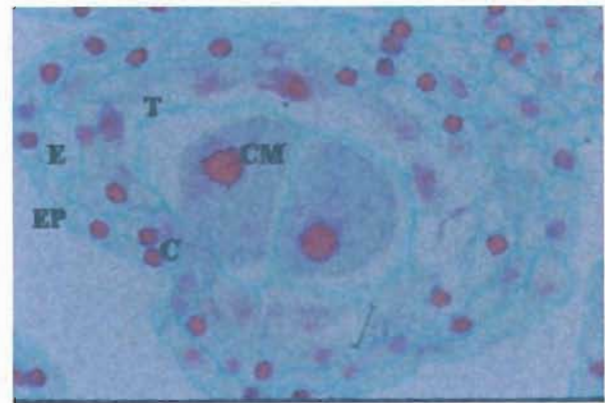


Fig. 29. Corte transversal de célula madre de las microsporas (CM) de flor pistilada en etapa 9 con núcleo irregular. Tapete (T), Endotecio (E), Capa media (C), Epidermis (EP). Barra 10  $\mu$ m.

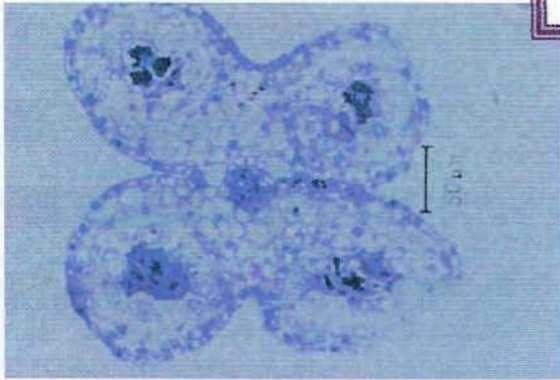


Fig. 30. Corte transversal de antera tetrasporangiada de flor pistilada en etapa 10 mostrando el centro de los lóculos obliterado. Barra 50  $\mu$ m.

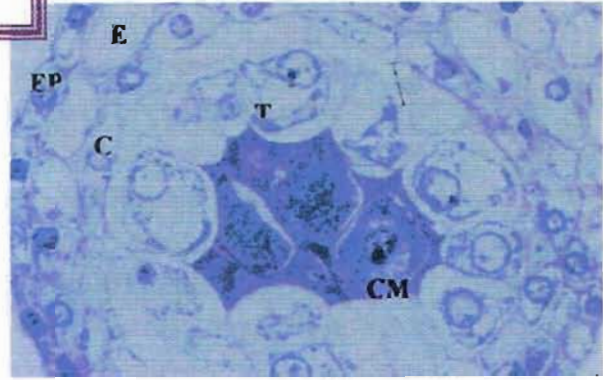


Fig. 31. Microsporangio de flor pistilada en etapa 10. Célula madre de las microsporas alterda (CM), Tapete vacuolado (T), Endotecio (E), Capa media (C), Epidermis (EP). Barra 10  $\mu$ m.

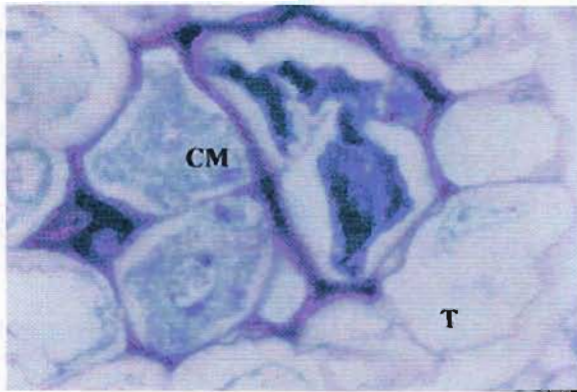


Fig. 32. Microsporangio de flor pistilada en etapa 10. Células madres de las microsporas (CM) colapsadas, otras inician meiosis a profase I. Tapete (T) muy vacuolado. Barra 10  $\mu$ m.

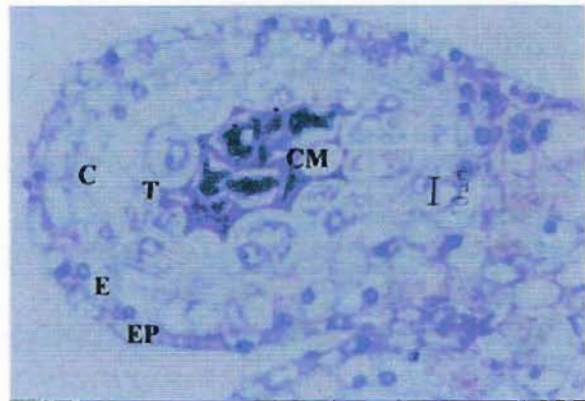


Fig. 33. Antera de flor pistilada en etapa 10. La integridad de las células madres de las microsporas (CM) se pierde. Tapete (T) separado de la Capa media (C). Endotecio (E), Epidermis (EP). Barra 10  $\mu$ m.

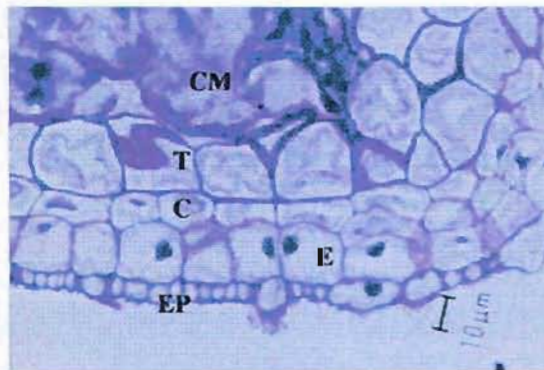


Fig. 34. Corte transversal de antera de flor pistilada en etapa 11. Las células madres de las microsporas (CM) parecen formar un "plasmodio", Tapete (T), Capa media (C), Endotecio (E), Epidermis (EP). Barra 10  $\mu$ m.



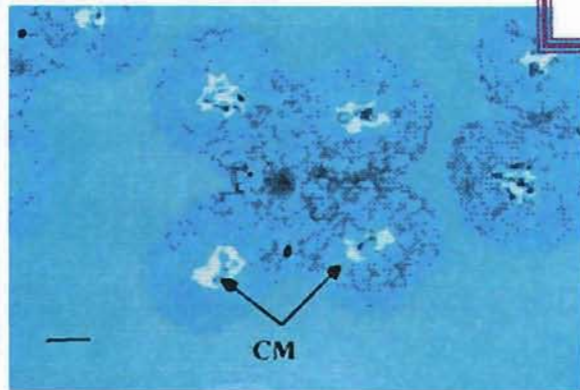


Fig. 35. Corte transversal de antera de flor pistilada en etapa 11. Se observan restos de las células madres de las microsporas (CM) rodeadas por calosa en los cuatro microsporangios. Barra 50  $\mu\text{m}$ .

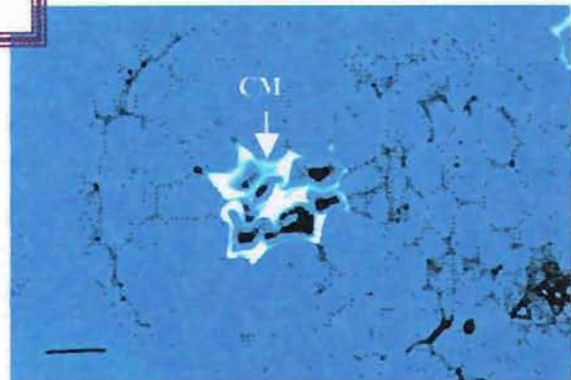


Fig. 36. Detalle de la figura anterior. Se observan las células madres de las microsporas (CM) colapsadas rodeadas por calosa (fluorescencia). Barra 10  $\mu\text{m}$ .

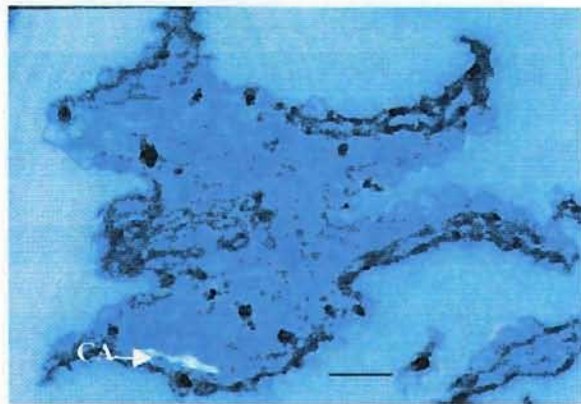


Fig. 37. Corte transversal de antera de flor pistilada en etapa 13 con microsporangios obliterados. Se aprecian aún restos de calosa (CA). Barra 50  $\mu\text{m}$ .

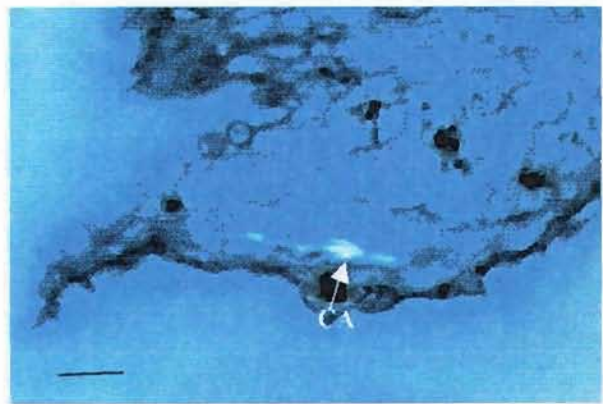


Fig. 38. Aumento del microsporangio de la figura anterior donde se observan restos de calosa (CA). Para esta etapa la antera se aprecia colapsada. Barra 10  $\mu\text{m}$ .

## DESARROLLO DE LA PARED DE LA ANTERA DE LAS FLORES ESTAMINADAS

El primordio de antera se rodea por una protodermis, en posición hipodérmica se encuentra el tejido arquesporial. Las células arquesporiales tienen una división periclinal y originan células parietales primarias adyacentes a la protodermis y el tejido esporógeno hacia el centro. Las células parietales primarias se dividen periclinamente. La capa parietal secundaria externa forma directamente el endotecio, por su parte, la capa parietal secundaria interna se divide originando un estrato de células de la capa media adyacente al endotecio y un estrato de tapete al interior. La epidermis permanece rodeando a la antera.

La pared de la antera conformada por estos cuatro estratos en la etapa 9 comienza a tener cambios. Los más evidentes son el incremento del tamaño y el aumento en densidad citoplasmática del tapete. Las células del tapete de las flores estaminadas tienen cariocinesis sin citocinesis pasando por diferentes etapas de la mitosis como telofase (Fig. 39). A principios de la etapa 10 las células más grandes de la pared son las del tapete, las cuales son binucleadas (Fig. 40).

En la etapa de tétradas de microsporas (etapa 10) el citoplasma del tapete se hace extremadamente denso (Fig. 41).

Por su parte la capa media es efímera y comienza a colapsarse hacia la etapa 10. De igual forma el tapete que es de tipo glandular comienza su secreción a finales de esta etapa. En la etapa 11 la capa media degenera por completo, quedando únicamente visibles el tapete, el endotecio y la epidermis (Fig. 42). A finales de la etapa 11 aún permanecen restos del tapete glandular, mientras que el endotecio y la epidermis presentan escaso citoplasma (Fig. 43).

El endotecio tiene una abrupta transformación en la etapa 11 en la que se observan engrosamientos de celulosa alrededor de las células del endotecio y finalmente (etapa 12) se colapsa el citoplasma (Fig. 44).

En la etapa 12 se observa la pared de la antera conformada por el endotecio, en la periferia se encuentra la epidermis que ha pasado de tener forma semi-rectangular a cónica.

En la etapa 13 se da la ruptura del estomio provocando la dehiscencia longitudinal y la consecuente liberación de los granos de polen (Figs. 45 y 46).

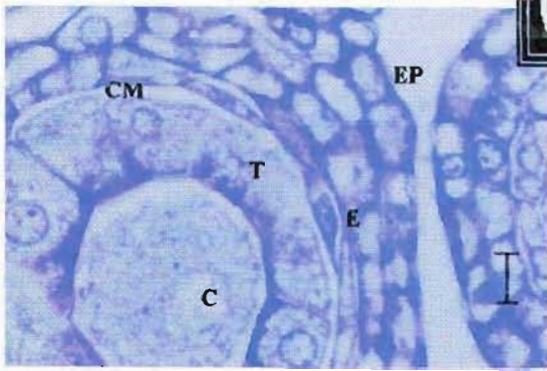


Fig. 39. Microsporangio de flor estaminada en etapa 9. Célula madre de las microsporas (CM). Capa media (C), Endotecio (E), Epidermis (EP). Telofase de células del tapete (T). Barra=10  $\mu$ m.

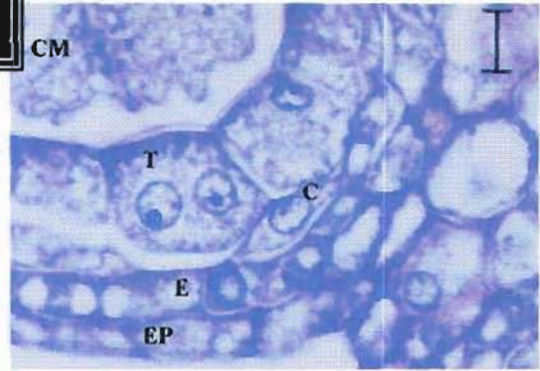


Fig. 40. Microsporangio de flor estaminada en etapa 9. Célula madre de las microsporas (CM). Capa media (C), Endotecio (E), Epidermis (EP). Tapete binucleado (T). Barra=10  $\mu$ m.

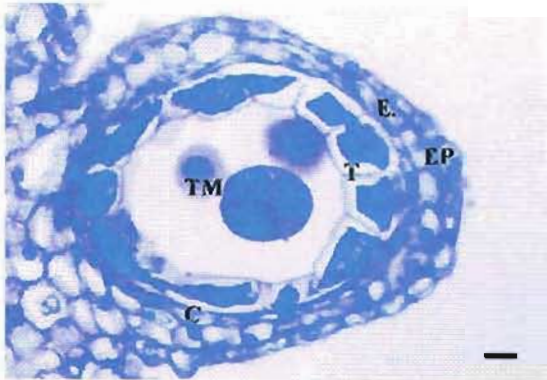


Fig. 41. Microsporangio de flor estaminada en etapa 10. Tétrada de microsporas (TM). Capa media (C), Endotecio (E), Epidermis (EP). Denso citoplasma del tapete (T). Barra=10  $\mu$ m.

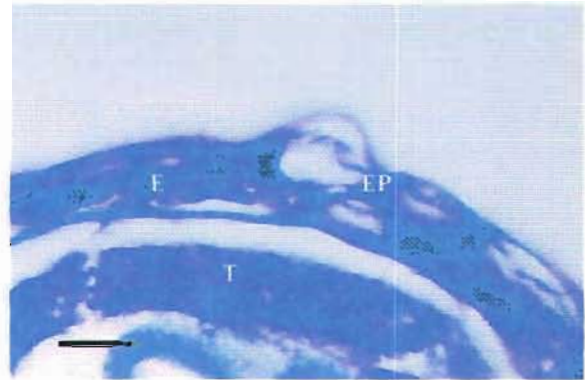


Fig. 42. Pared de la antera de flor estaminada en etapa 11. Tapete (T), Endotecio (E), Epidermis (EP). Barra=10  $\mu$ m.

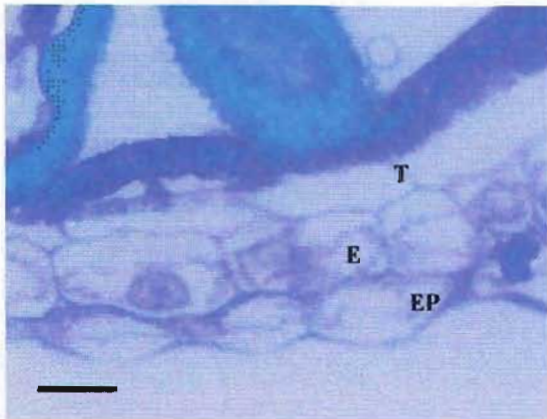


Fig. 43. Microsporangio de flor estaminada en etapa 11. Tapete en degeneración (T), Endotecio (E), Epidermis (EP). Barra=10  $\mu$ m.

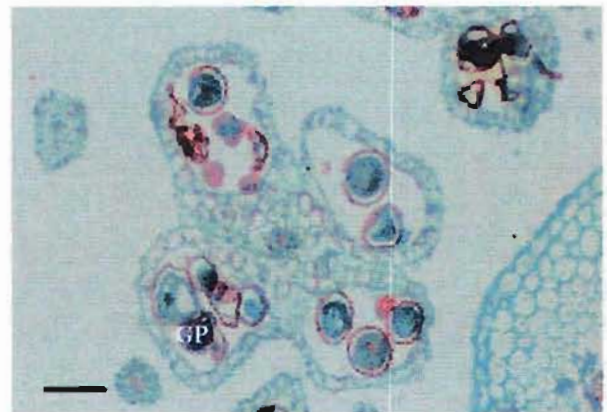


Fig. 44. Corte transversal de antera tetrasporangiada de flor estaminada en etapa 12. Granos de polen (GP). Barra=50  $\mu$ m.

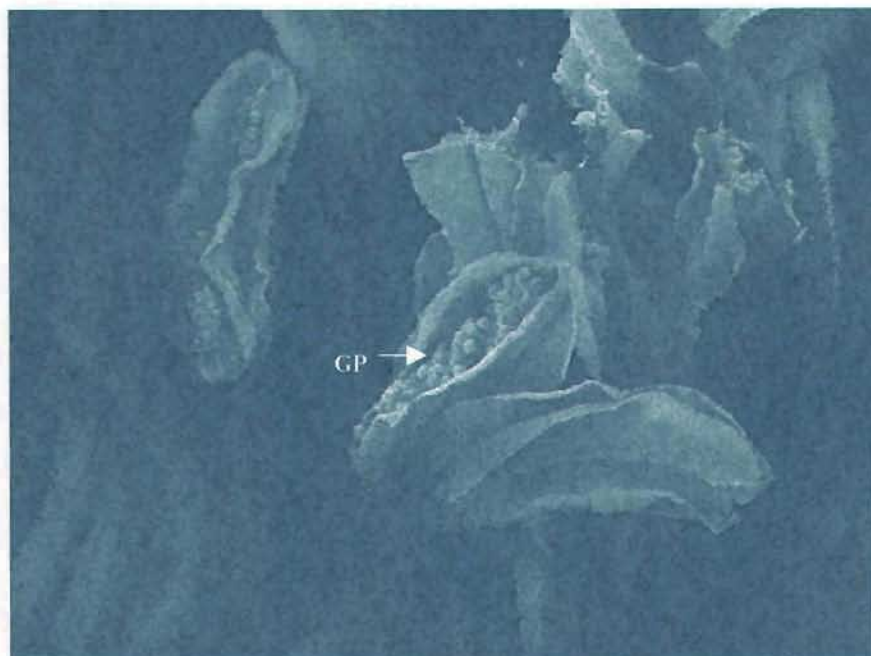


Fig. 45. Anteras de flor estaminada en dehiscencia (MEB). Mostrando granos de polen (GP).

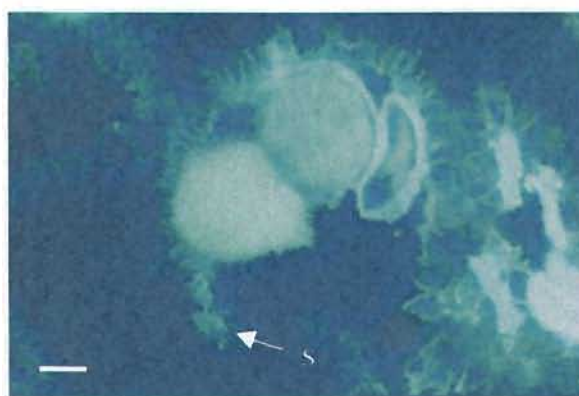


Fig. 46. Corte transversal de antera de flor estaminada en etapa 13. Zona del estomio (S). Barra=10  $\mu$ m.

## DESARROLLO DE LA PARED DE LA ANTERA DE LAS FLORES PISTILADAS

La pared de la antera de las flores pistiladas presenta las primeras diferencias estructurales con respecto a la pared de las flores estaminadas a finales de la etapa 9. El primer estrato en el que se observan marcadas diferencias es el tapete, en las anteras de flores pistiladas, el tapete, el cual presenta en la etapa 8 células conspicuas uninucleadas, en la etapa 9 se vacuoliza anormalmente. Las células de la capa media, del endotecio y de la epidermis también presentan vacuolas en su citoplasma aunque no tan evidentes como las que se presentan en el tapete. Hacia la etapa 10 el citoplasma de las células del tapete se colapsa, por su parte el núcleo también se compacta y no presenta cariocinesis como en las anteras de las flores estaminadas (Fig. 47). Las células de la capa media que en las anteras de las flores estaminadas comienzan a colapsarse, sin embargo, en las flores pistiladas en esta etapa permanece la capa media y se acentúa la presencia de vacuolas. Alteraciones similares presentan el endotecio y la epidermis. Alrededor de la etapa 10, se observó en algunos casos que la capa de tapete se separa de la capa media (Fig. 33).

En la etapa 11 se pueden apreciar aún las cuatro capas de la pared con alteraciones en el citoplasma y los núcleos de todos los estratos se ven colapsados; además La epidermis modifica su apariencia semi-rectangular hacia una forma relativamente cónica (Fig. 48). A finales de esta etapa y principios de la 12 el tapete degenera completamente y toma la apariencia de las células madres de las microsporas degeneradas (Fig. 49).

Ya entrada la etapa 12 sólo se puede distinguir dos estratos conformando a la pared de la antera, estos son el endotecio conteniendo algunas drusas visibles y la epidermis con células de forma cónica con severas alteraciones (Figs. 49 y 50). En la epidermis se observaron algunos estomas (Fig. 50).

En la etapa 13 no se distingue el endotecio debido a su completa degeneración, aunque es posible observar las drusas que estuvieron contenidas en él (Figs. 51 y 52); en algunas regiones de las células ni siquiera es posible distinguir la integridad de la epidermis (Fig. 52). Por otro lado, parte del tejido conectivo permanece con algunas drusas y presenta algunas alteraciones similares a las de las células de la pared de la antera como es el incremento de vacuolas y alteraciones en el núcleo. En esta etapa de desarrollo las anteras de las flores pistiladas se encuentran colapsadas y en otros casos lo que correspondería a un tetrasporangio da la apariencia de un gran

saco conteniendo desechos o secreciones no compartimentalizadas. Sólo algunas células, probablemente de la epidermis, se observan hipertrofiadas.

Las anteras de las flores pistiladas que no logran la formación de granos de polen tampoco tienen línea de dehiscencia.

Los filamentos de los estambres de las flores pistiladas no alcanzan la misma longitud que los de las flores estaminadas. Se observaron por debajo de los lóbulos estigmáticos (Fig. 54).

En la antesis las anteras de este morfo floral se encuentran colapsadas (Fig. 55).

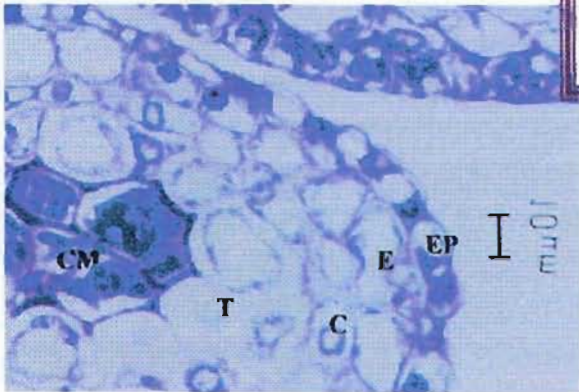


Fig. 47. Corte transversal de antera de flor pistilada en etapa 10. Célula madre de las microsporas (CM), Tapete (T) sin cariocinesis, Endotecio (E), Capa media (C), Epidermis (EP). Barra 10  $\mu\text{m}$ .

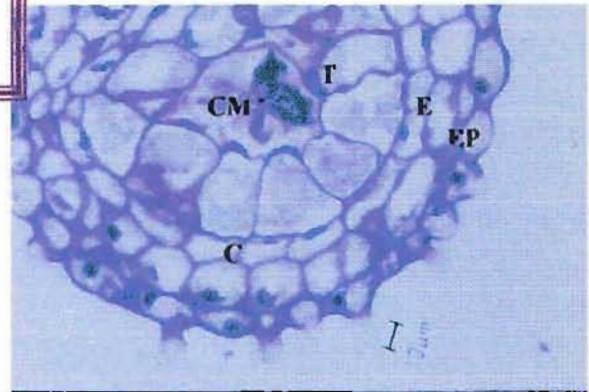


Fig. 48. Corte transversal de antera de flor pistilada en etapa 11. Célula madre de las microsporas (CM), Tapete (T), Capa media (C). Endotecio (E), Epidermis (EP). En todas las capas los núcleos se observan altercados. Barra 10  $\mu\text{m}$ .

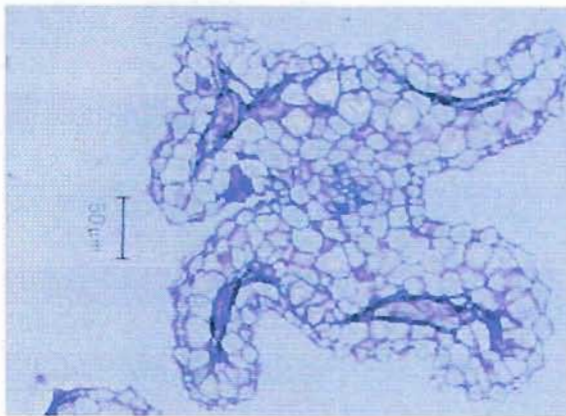


Fig. 49. Corte transversal de antera de flor pistilada en etapa 11-12. Se observa un decremento en el número de capas de la antera, quedando sólo la epidermis y endotecio. Barra 50  $\mu\text{m}$ .

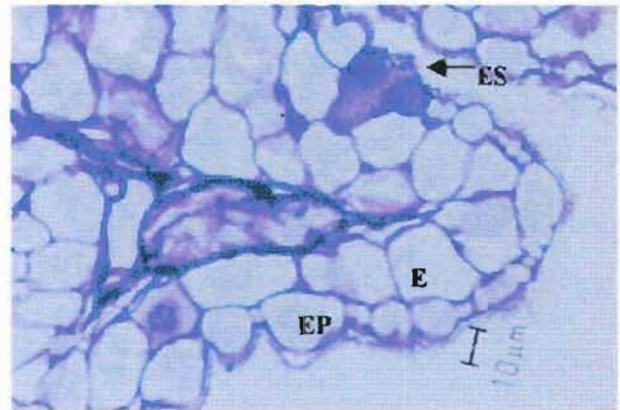


Fig. 50. Corte transversal de antera de flor pistilada en etapa 11-12. La pared de la antera la integran el endotecio (E) y la epidermis (EP) la cual posee algunos estomas (ES). Barra 10  $\mu\text{m}$ .

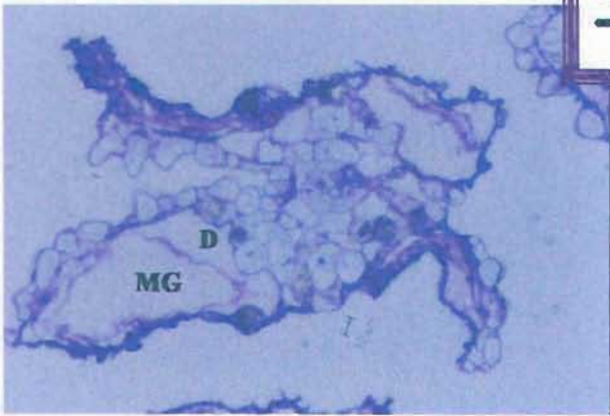


Fig. 51. Corte transversal de antera de flor pistilada en etapa 13. Microsporangio degenerado (MG), Drusas (D). Barra 10  $\mu$ m.

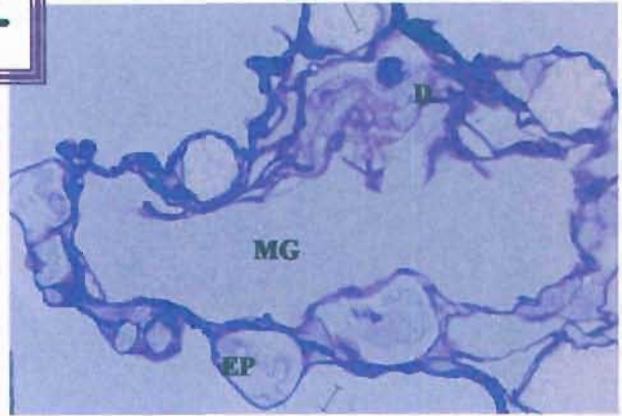


Fig. 52. Corte transversal de antera de flor pistilada en etapa 13. Microsporangio degenerado (MG). Drusas (D). Las pocas células de la epidermis se observan hipertrofiadas. Barra 10  $\mu$ m.

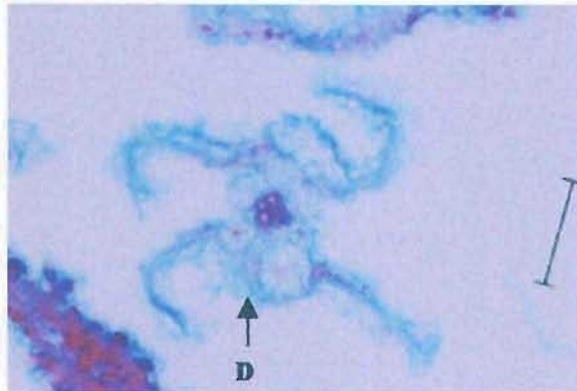


Fig. 53. Corte transversal de antera de flor pistilada en etapa 13. Se observan totalmente colapsados los microsporangios. Permanecen drusas (D) del conectivo. Barra 50  $\mu$ m.

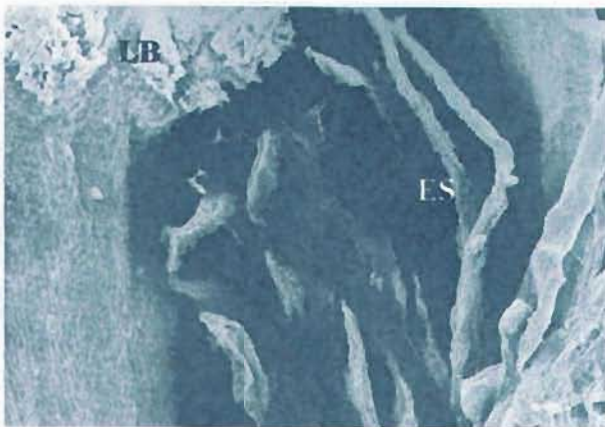


Fig. 54. Se observan los estambres (ES) colapsados por debajo de los lóbulos estigmáticos (LB). MEB.

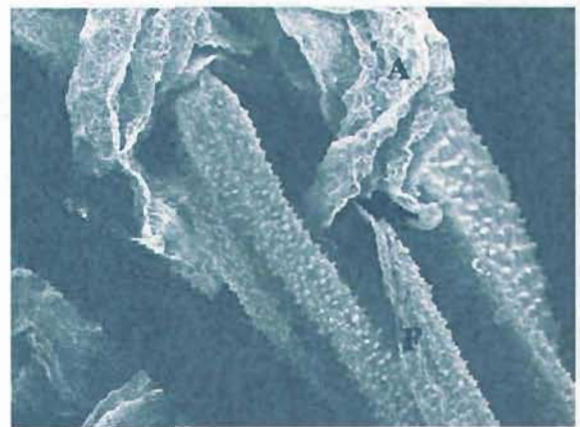


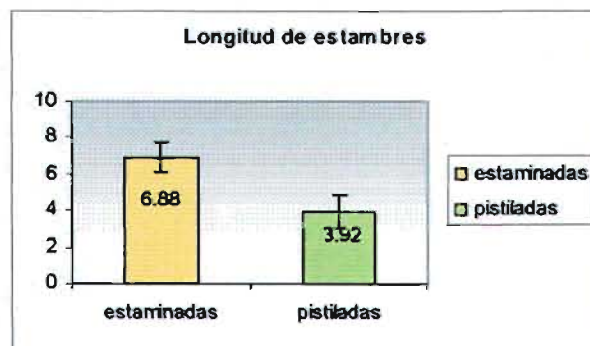
Fig. 55. Se observan a las anteras alteradas (A) y a los filamentos (F) colapsados en su parte apical (flecha). MEB.



## LONGITUD DE ESTAMBRES DE FLORES EN ANTESIS

Aparentemente la longitud de los estambres (antera y filamento) de las flores pistiladas durante la flor en anthesis de *Opuntia stenopetala* se apreciaban más cortas que los estambres de las flores estaminadas. Para corroborar estas observaciones, se midió la longitud de los estambres de ambos tipos florales. Se tomaron 6 individuos, de cada uno de ellos se tomó una flor y se seleccionaron diferentes estambres dentro de la misma.

Los valores de la longitud de estambres se muestran en el apéndice XI. Se promedió la longitud de estambres en las flores estaminadas y las flores pistiladas, encontrándose que la longitud de estambres de las flores estaminadas casi duplica, en promedio, a la longitud de los estambres de las flores pistiladas (gráfica 1).



Gráfica 1. Comparación de los promedios de la longitud de los estambres de las flores estaminadas y las flores pistiladas. La longitud promedio de los estambres de las flores estaminadas es de 6.88 mm y de las pistiladas de 3.92 mm.

Longitud promedio de estambres de flores estaminadas: 6.88 mm (desviación estándar: 0.813), con un número de muestras analizadas de 60.

Longitud promedio de estambres de flores pistiladas: 3.92 mm (desviación estándar: 0.916), con un número de muestras analizadas de 58.

## DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA (PCD) EN LAS ANTERAS DE LAS FLORES PISTILADAS DE *Opuntia stenopetala*

Para probar si los tejidos de la antera atraviesan por PCD, se evaluó el estado de la cromatina durante el desarrollo de las anteras de las flores pistiladas. El análisis se realizó con el método TUNEL que detecta cromatina fragmentada.

Se realizaron controles positivos utilizando DNasa I que provocó la ruptura del DNA en todas las células de la antera, por lo que todos los núcleos se observaron con fluorescencia (verde) cuando se analizaron en el microscopio de epi-fluorescencia (Figs. 57, 63 y 69).

El control negativo se realizó sin la acción de la enzima TdT, con lo que se evita la transferencia de nucleótidos y por lo tanto el núcleo no fluoresce (Figs. 60, 66 y 71). Para asegurarnos de la presencia de núcleos en nuestros cortes utilizamos DAPI (Figs. 59 y 65) y microscopía con contraste de fases para calcular las dimensiones celulares de nuestras muestras (Figs. 58, 64 y 70).

Las células madres de las microsporas (CMMi) de las flores pistiladas en etapa 8-9 (Fig. 56) presentan los primeros datos de fragmentación de DNA (Fig. 61). Otro dato evidente es que algunas células de la epidermis, fuera de la zona del estomio, de las anteras de las flores pistiladas mostraron fluorescencia en la etapa 10. Lo que indica que la muerte celular en la epidermis se dispara en etapas tempranas. Asimismo (Fig. 62) en las capas de tapete, capa media y endotecio de las anteras de las flores pistiladas se observó muerte celular programada al realizar la prueba de TUNEL (Fig. 67).

En la etapa 10 de la antera de las flores estaminadas (Fig. 68) se observó fluorescencia como producto de la fragmentación del DNA en la capa del endotecio y en algunas células del tapete (Fig. 72). Ya que distintas células entran al programa de muerte celular, se pueden observar patrones de muerte celular espacialmente distintos aunque los estratos involucrados sean los mismos. No se observó fragmentación del DNA en las CMMi, ni las microsporas con fluorescencia de las flores estaminadas con fluorescencia.

El número de muestra observadas fue variable teniendo al menos diez cortes histológicos por etapa de desarrollo. Tanto las flores pistiladas como estaminadas presentan muerte celular programada en las anteras, sólo que estos procesos difieren espacial y temporalmente entre ambos tipos florales, siendo normal este proceso en el tapete, en las células del estomio (parte de la epidermis) y endotecio de las flores estaminadas.



## Etapa de Célula madre de las microsporas

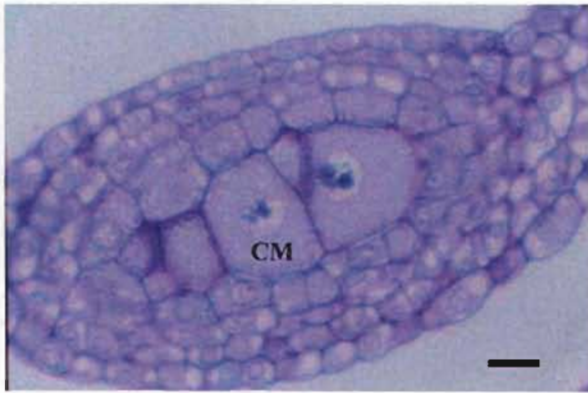


Fig. 56. Microsporangio de flor pistilada en etapa 9. Células madres de las microsporas (CM). Barra 10  $\mu\text{m}$ .

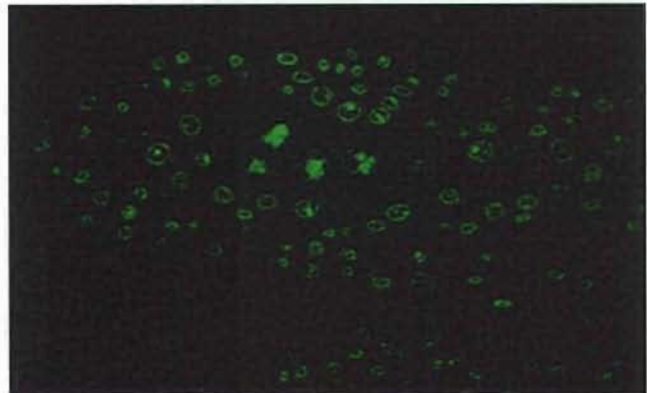


Fig. 57. Microsporangio de flor pistilada en etapa 9. Los núcleos se observan en verde. Control positivo con DNasa. Aumento: 40X.

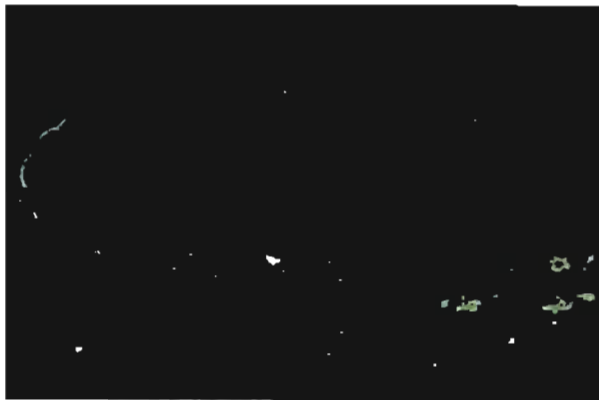


Fig. 58. Microsporangio de flor pistilada en etapa 9. Contraste de fases. Aumento: 40X.



Fig. 59. Microsporangio de flor pistilada en etapa 9. En azul se observan los núcleos. Control con DAPI. Aumento: 40X.



Fig. 60. Microsporangio de flor pistilada en etapa 9. Control negativo, sin enzima TdT. Aumento: 40X.

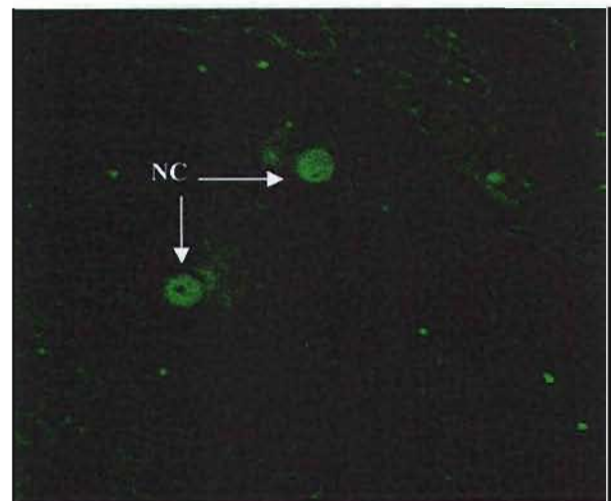


Fig. 61. Microsporangio de flor pistilada en etapa 9. Prueba de TUNEL sobre los núcleos de las células madres de las microsporas (NC). Aumento: 100X

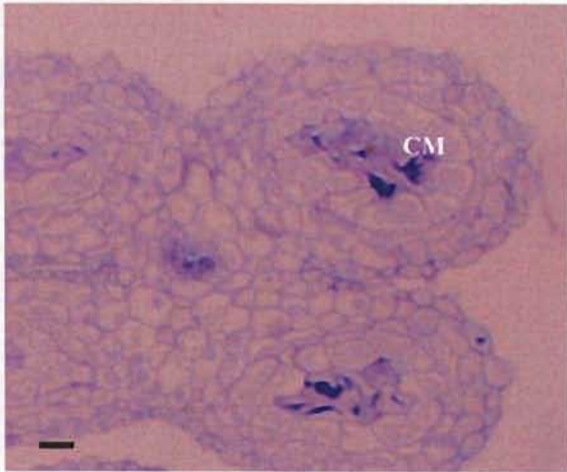


Fig. 62. Microsporangio de flor pistilada en etapa 10. Células madres de las microsporas degeneradas (CM). Barra 10  $\mu$ m.

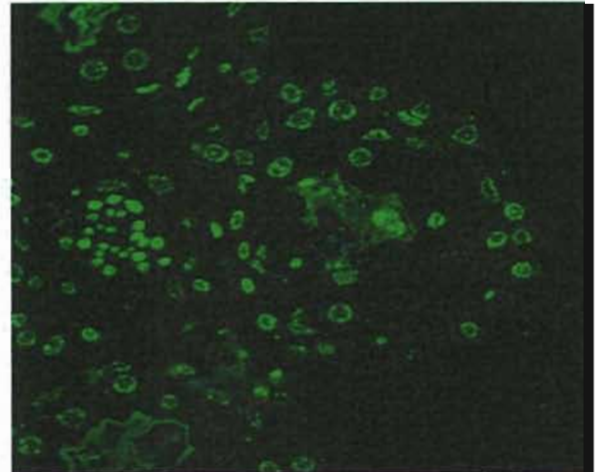


Fig. 63. Microsporangio de flor pistilada en etapa 10. Los núcleos se observan en verde. Control positivo con DNasa. Aumento: 40X.

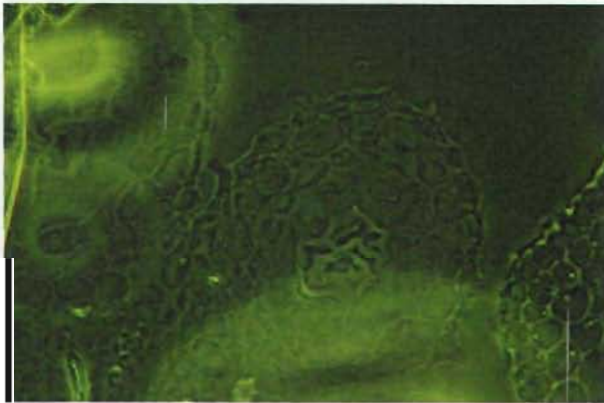


Fig. 64. Microsporangio de flor pistilada en etapa 10. Contraste de fases. Aumento: 40X.

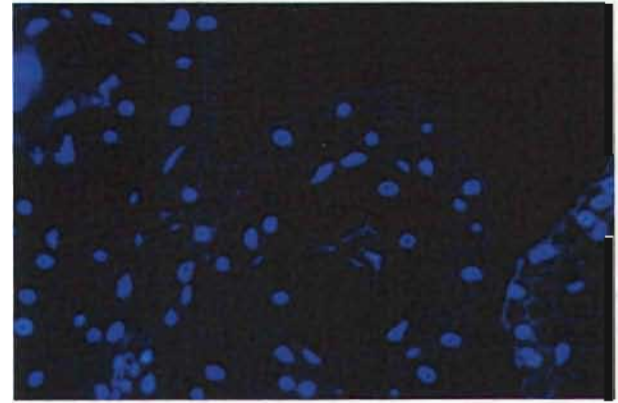


Fig. 65. Microsporangio de flor pistilada en etapa 10. En azul se observan los núcleos. Control con DAPI. Aumento: 40X.

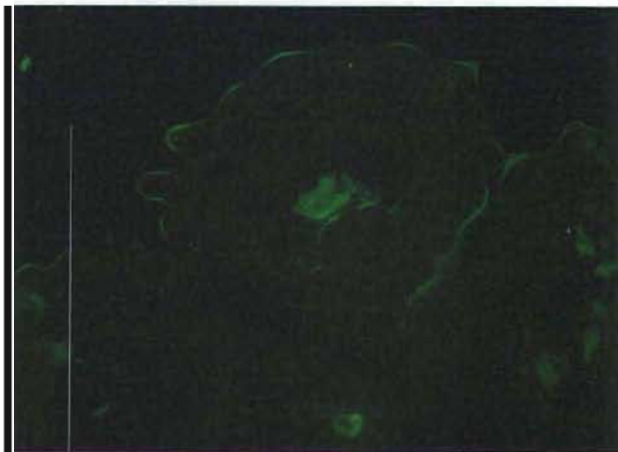


Fig. 66. Microsporangio de flor pistilada en etapa 10. Prueba de TUNEL. Control negativo, carente de enzima TdT. Aumento: 40X.

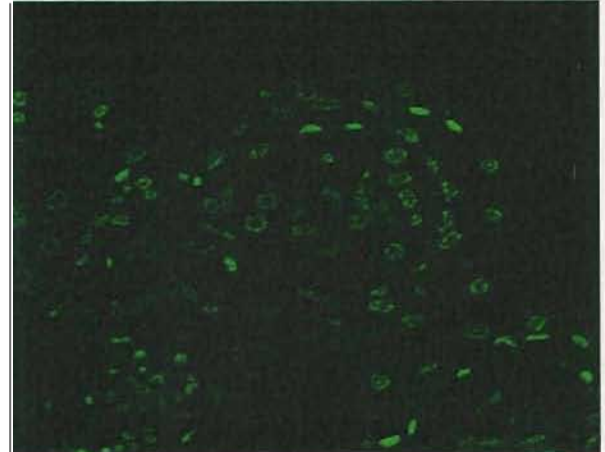


Fig. 67. Microsporangio de flor pistilada en etapa 10. Positivo para núcleos de distintas partes de la antera. Aumento: 40X.



## Etapa de Célula madre de las microsporas-tétradas

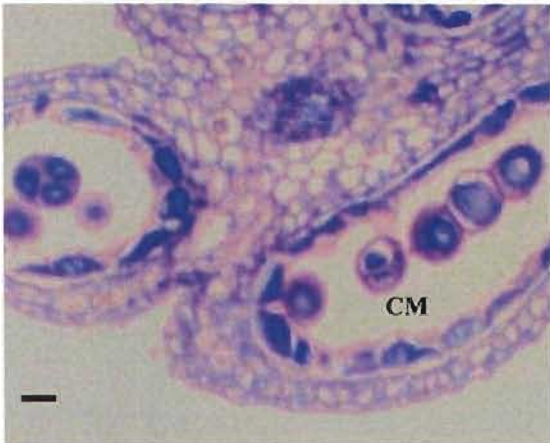


Fig. 68. Microsporangio de flor estaminada en etapa 10. Células madres de las microsporas y tétradas de microsporas (CM). Barra 10  $\mu$ m.

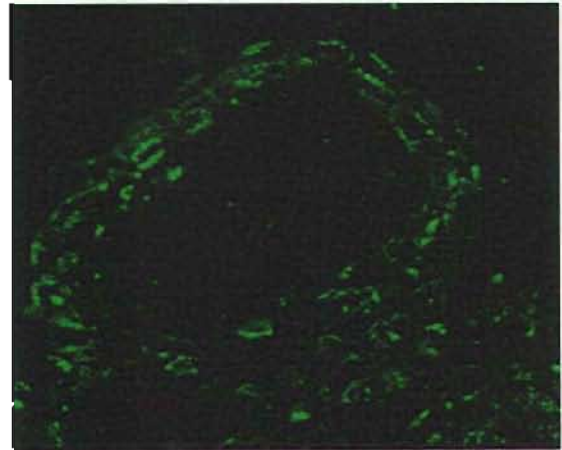


Fig. 69. Microsporangio de florestaminada en etapa 10. Los núcleos se observan en verde. Control positivo. Aumento: 40X.



Fig. 70. Microsporangio de flor estaminada en etapa 10. Contraste de fases. Aumento: 40X.



Fig. 71. Microsporangio de flor estaminada en etapa 10. Prueba de TUNEL. Control negativo. Aumento: 40X.

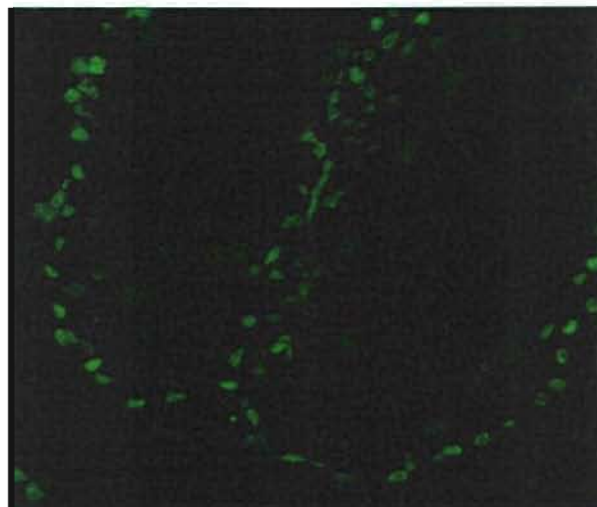


Fig. 72. Microsporangio de flor estaminada en etapa 10. Positivo para núcleos de la epidermis y endotecio. Aumento: 40X.

## IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE ENTRE LAS FLORES ESTAMINADAS Y PISTILADAS DE *Opuntia stenopetala*

Para identificar genes expresados diferencialmente a nivel de la transcripción, entre anteras de plantas estaminadas y pistiladas se purificó el RNA total de anteras de diferentes etapas de desarrollo (7-9 y 10-12) tanto de flores estaminadas como de flores pistiladas (Fig. 73).

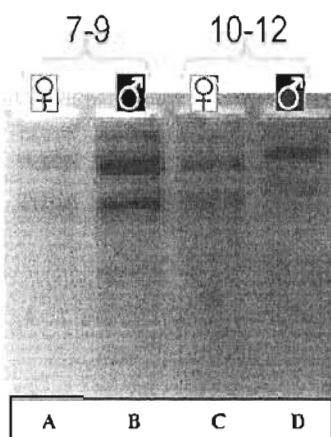


Fig. 73. Extracción de RNA total. En el carril A y B se observa una mezcla de RNA de anteras de flores pistiladas y estaminadas respectivamente, en etapas 7, 8 y 9. En el carril C se observa el RNA de la mezcla con las anteras de las flores pistiladas y en el carril D la mezcla de las flores estaminadas, ambas en etapas 10, 11 y 12.

El RNA total fue utilizado para sintetizar cDNA de doble cadena (Fig. 74 A). El cDNA se cortó con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI*. A los fragmentos de cDNA obtenidos se les ligaron adaptadores específicos para los sitios *EcoRI* y *MseI* (Fig. 74 B). Los cDNAs quiméricos se utilizaron en reacciones de PCR, utilizando "primers" que se alinean contra los adaptadores *EcoRI* y *MseI* (Fig. 74 C). Estos fragmentos se encuentran entre los 100 y 600 pb.

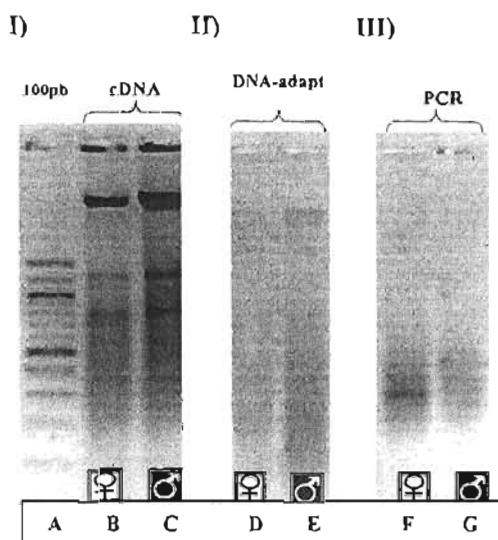


Fig. 74. I) Síntesis de cDNA. Se observa en el carril A el marcador molecular de 100 pb, en los carriles B y C el cDNA sintetizado a partir del RNA de las anteras de flores pistiladas y estaminadas respectivamente. II) cDNA ligado a adaptadores. En los carriles D y E se observan los fragmentos de cDNA digeridos con enzimas de restricción y ligados con adaptadores para *MseI* y *EcoRI*, de las flores pistiladas y estaminadas respectivamente. III) PCR. En los carriles F y G se observa la amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA.

Los productos de este "primer" PCR se amplificaron con un segundo PCR que lleva el "primer" *EcoRI* previamente marcado radiactivamente con  $\gamma^{33}\text{P}$ -dATP con el fin de

visualizar los productos del PCR por autoradiografía. Para la realización de cDNA-AFLPs se probaron 120 combinaciones de pares de "primers".

Aunque no todas las combinaciones de pares de "primers" (*EcoRI*  $\gamma^{33}\text{P-dATP}$  y *MseI*) fueron amplificadas se encontraron 16 bandas (Cuadro 4) con diferente patrón entre las muestras pertenecientes a flores masculinas y femeninas, ya sea en presencia, ausencia o concentración de la secuencia de cDNA.

Cuadro 4. Clave de los fragmentos con posible expresión diferencial. A las 16 bandas se les nombró de acuerdo con la combinación de pares de "primers" utilizados para su amplificación y el sexo de las flores, por ejemplo, la banda 4 denominada M62E43♂-I se obtuvo a partir del PCR en el que se ocuparon los "primers" contra los adaptadores *MseI* número 62 y *EcoRI* número 43 de las anteras de las flores estaminadas. Se encuentran subrayados los fragmentos de los genes que se recuperaron y se obtuvo la secuencia de nucleótidos (bandas 4, 12, 13 y 14). Las 16 bandas encontradas son las siguientes:

- 1) M62E43♂-I
- 2) M66E43♀-I
- 3) M66E43♀-II
- 4) M66E43♀-III
- 5) M71E43♀-I
- 6) M71E43♀-II
- 7) M64E44♂-I
- 8) M70E44♂-I
- 9) M71E44♀-I
- 10) M71E44♂-I
- 11) M72E44♂-I
- 12) M72E44♂-II
- 13) M74E44♂-I
- 14) M75E44♀-I
- 15) M75E44♂-I
- 16) M76E44♀-I

Las bandas seleccionadas se recuperaron, algunas de ellas se metieron a un vector PGEM-Teasy para su clonación. De las 16 bandas finalmente obtuvimos cuatro con la posibilidad de secuenciarlas. La primera banda la denominamos M66E43♀-III aparece en la Figura 75 a que muestra la ausencia de una banda en el patrón de bandas de las flores estaminadas (Fig. 75 b), su secuencia aparece en la Figura 75 c. La segunda banda que pudimos secuenciar (Fig. 76 c) M72E44♂-II está presente en las flores estaminadas y ausente en las flores pistiladas (Figs. 76 a y b). La tercer banda M74E44♂-I se encuentra en las anteras de flores estaminadas y no así en las flores pistiladas (Figs. 77 a y b) y su secuencia se observa en la Figura 77 c. La última banda de la que se pudo obtener su secuencia (Fig. 78 c) fue M75E44♀-I, encontrándose únicamente en las anteras de flores pistiladas (Figs. 78 a y b).

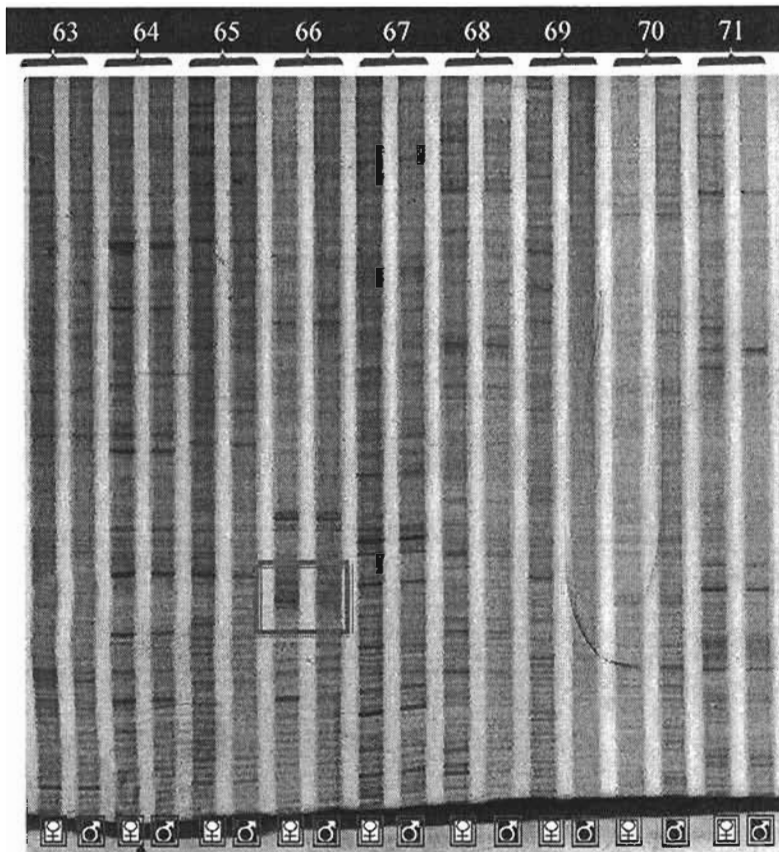


Fig 75 a. Patrón de bandeo al amplificar el cDNA de anteras de *O. stenopetala* con los primers 43 y 63 al 71.

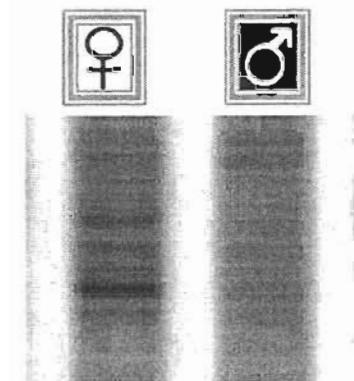


Fig. 75 b. Detalle de la figura anterior (recuadro). Posible expresión diferencial del fragmento 4M66E43 ♀ III.

```

5'-TGGAGATGCTGAGTGTGTGGAAAATGA
GGGGGAGAGCCTCTATTTATAGGCTCC
ACCAGCCTAGGGTTTGAGTTGGGCTTT
GGGCTTGGGCCCATATTGTAATTATTTT
TATT-3'

```

Fig. 75 c. Secuencia del fragmento 4M66E43 ♀ III, con 113 pares de bases.



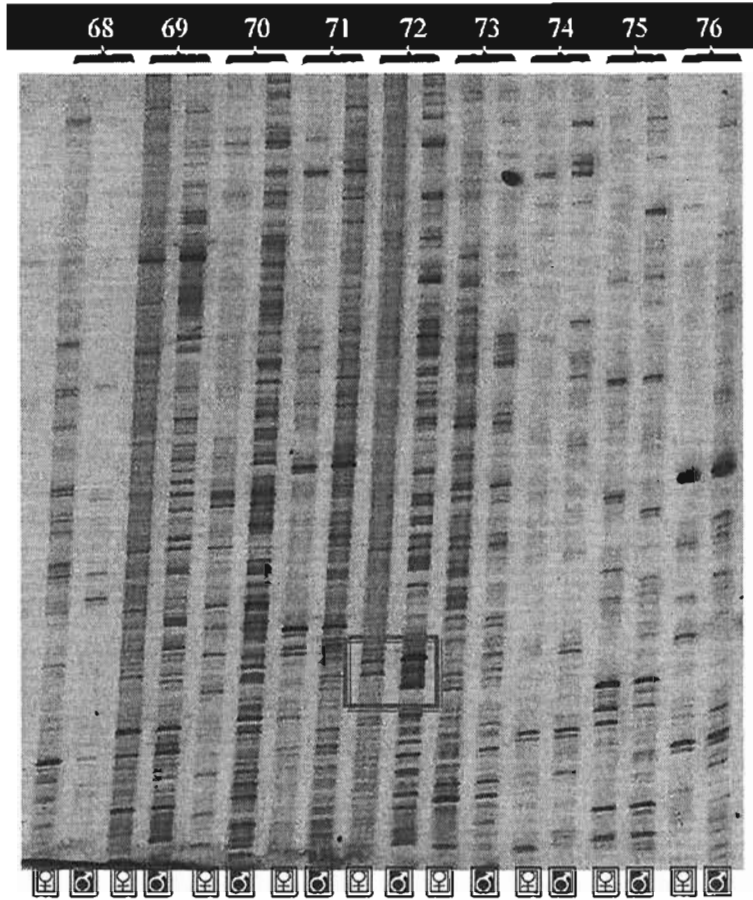


Fig. 76 a. Patrón de bandeo al amplificar el cDNA de anteras de *O. stenopetala* con los primers 44 de EcoRI y los primers 68-76 de MseI.

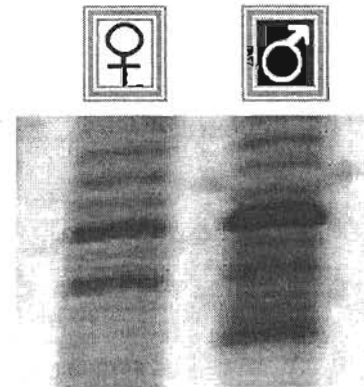


Fig. 76 b. Detalle de la figura 76 a. Posible expresión diferencial del fragmento 12M72E44 ♂ I I.

```

5'-TGCACAGTATTTACAACAAGAGTACAA
GATTACCGTCTGCACAATTATCACAGCC
ACAAAACTCAGAAATAGGGGAATATA
CAAGGTCACTGCC-3'

```

Fig. 76 c. Secuencia del fragmento 12M72E44 ♂ I I, con 95 pares de bases.

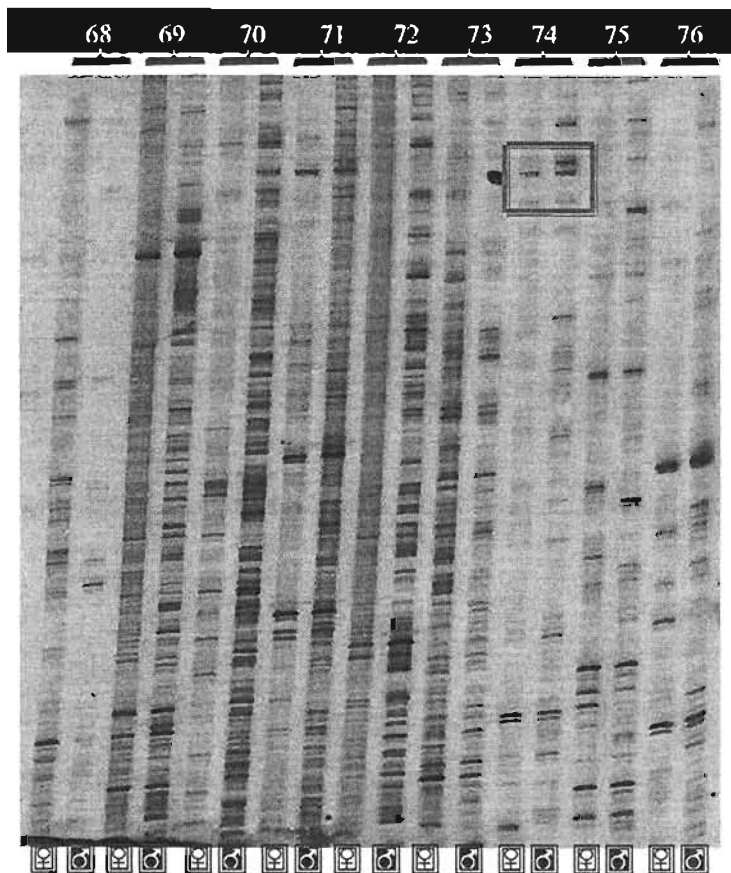


Fig. 77 a. Patrón de bandeo al amplificar el cDNA de anteras de *O. stenopetala* con los primers 44 de EcoRI y los primers 68-76 de MseI.

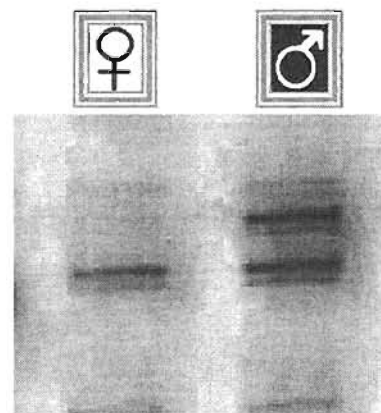


Fig. 77 b. Detalle de la figura anterior (recuadro). Posible expresión diferencial del fragmento 13M74E44 ♂ I.

5'-GCTCAAAGCCGTGTCAGATTGAATTGG  
TACGCAGTCTACGGAATTCGCAATCA  
CTAGT-3'

Fig. 77 c. Secuencia del fragmento 13M74E44 ♂ I, con 59 pares de bases.

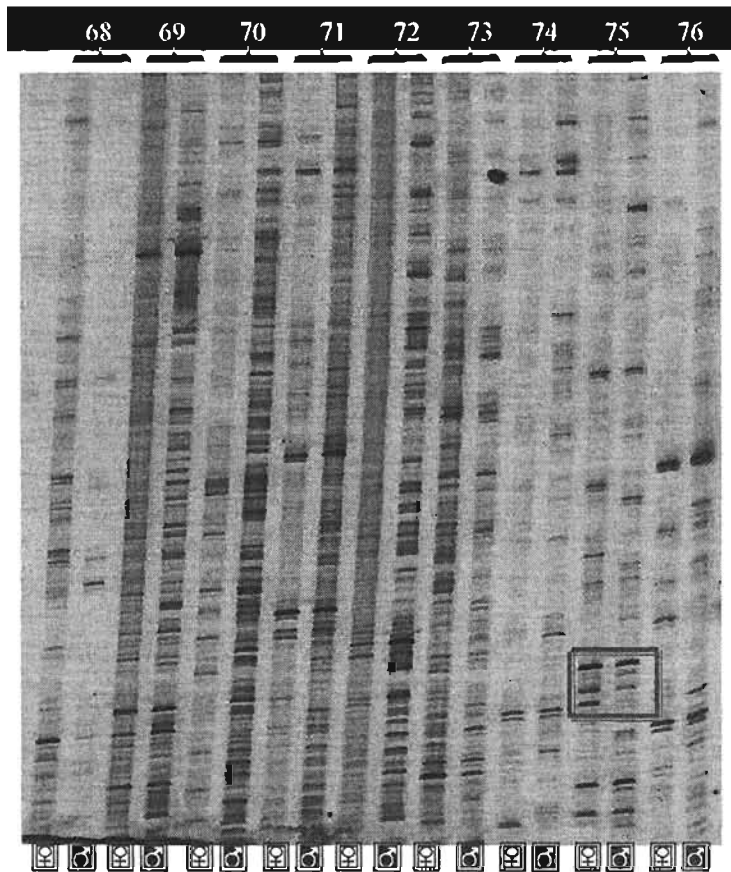


Fig. 78 a. Patrón de bandeo al amplificar el cDNA de anteras de *O. stenopetala* con los primers 44 de EcoRI y los primers 68-76 de MseI.

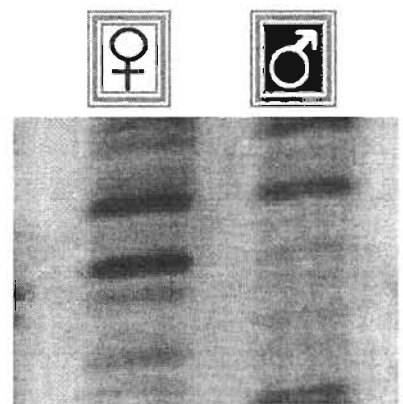


Fig. 78 b. Detalle de la figura anterior. Posible expresión diferencial del fragmento 14M75E44 ♀ I.

```

5'-GACAGAAGCGAAGGCCGGGAGGAAA
GGATCTGGCTCTAGTAAATATGCTAATC
TGTAAC TTTACTGATATACCAATGACGG
GTGAC-3'

```

Fig. 78 c. Secuencia del fragmento 14M75E44 ♀ I, con 87 pares de bases.

Otra aproximación que se hizo fue la búsqueda bibliográfica de mutantes para compararlas con el fenotipo estéril de *O. stenopetala*. Los "primers" sintetizados a partir del gen *MMD1* reportado para *Arabidopsis* y para *MS1* de arroz son:

"primers" para gen *mmd1* en *Arabidopsis*

Forward: *Osmmd1F1*  
 5' ATTGGAGATACCGGTCTGCTTGAT 3'  
 Reverse: *Osmmd1R1*  
 5' CATCCTCTCGCCATCATCATC 3'

"primers" para gen putativo de colágeno en arroz

Forward: *Osmmd1F2*  
 5' AATGCTGAGACGAGTGCAATTGAA 3'  
 Reverse: *Osmmd1R2*  
 5' CATCCTCTCGCCATCATCGTC 3'

Con dichos "primers" se intentó amplificar por PCR a partir de nuestras muestras de cDNA de *O. stenopetala*, sin embargo, no se obtuvo ninguna banda definida cuando se amplificó el cDNA de las anteras de las flores pistiladas de las etapas 7-9, lo mismo ocurrió con la amplificación del cDNA de las anteras de flores estaminadas (Fig. 80). Sin embargo, cuando se tomó como control positivo a los ácidos nucleicos de *Arabidopsis thaliana* para probar la eficiencia de los "primers" se pudo amplificar una banda bien definida a partir del cDNA, una banda más intensa a la misma altura se amplificó a partir del DNA (Fig. 81).

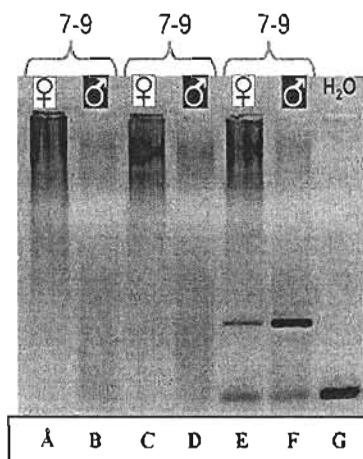


Fig. 80. Amplificación de *MMD1* en *O. stenopetala*. Se observa en los carriles A y B el resultado de la amplificación para *O. stenopetala* utilizando los "primers" de *mmd1* (*Osmmd1*) y en los carriles C y D utilizando los primers de *ms1* (*Osmmd2*). En los carriles E y F se observa la amplificación de otros "primers" como control positivo. Como control negativo se encuentra el agua en el carril G.

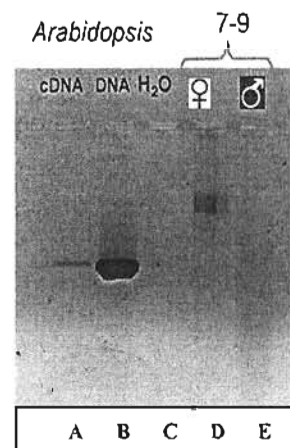


Fig. 81. Amplificación de *MMD1* en *A. thaliana*. En el carril A y B se observa el producto de la amplificación utilizando los "primers" para *mmd1* (*Osmmd1*) a partir del cDNA y DNA de *Arabidopsis*, en el C el control negativo y en el D y E el resultado utilizando una combinación de "primers" y el cDNA de *O. stenopetala*.

## DISCUSIÓN

La mayoría de los trabajos que se han realizado para conocer las bases genéticas y moleculares que causan esterilidad masculina están basados principalmente en estudios sobre plantas modelos como *Arabidopsis*, *Nicotiana* y *Zea mays*. Pocos son los estudios que se han realizado para entender los mecanismos o estrategias que causan la esterilidad masculina en especies que se encuentran *in situ*. Tomando a *Opuntia stenopetala* como sistema de estudio pretendemos conocer más acerca de las estrategias que tienen algunas especies de angiospermas para generar sexos separados al causar esterilidad en uno de los sexos.

### ESTERILIDAD MASCULINA EN *Opuntia stenopetala*

La fertilidad masculina requiere de diferentes eventos coordinados que cuando se altera uno o más de éstos se puede conducir a la esterilidad masculina (Chaudhury, 1993; Mc Cormick, 1993). El desarrollo de *O. stenopetala* se ve alterado en varios eventos del desarrollo, ya que presenta alteraciones previas a la formación de los granos de polen que resultan en la nula producción de estos por parte de las anteras de las flores pistiladas. Además de que no hay producción de granos de polen, no existe dehiscencia de las anteras debido a la total alteración y lisis de las células involucradas en la apertura mecánica de la antera, por lo que en el supuesto de que se formaran granos de polen las alteraciones que presenta la pared de la antera haría imposible su disponibilidad en este tipo floral. Las alteraciones se extienden a todas las capas de la pared de la antera y tejido conectivo. Aunado a estas alteraciones las anteras en las flores pistiladas son más pequeñas que las de las flores estaminadas.

Al comparar las observaciones del desarrollo de las anteras de las flores pistiladas de *O. stenopetala* contra las mutantes reportadas, se encontró que existe mucha similitud con la mutante *fat tapetum* de *A. thaliana* (Sanders *et al.*, 1999). En esta mutante y en las flores pistiladas de *O. stenopetala* las anteras se desarrollan de manera normal o semejante a las del tipo silvestre (flores estaminadas en *O. stenopetala*) hasta que inicia la meiosis. En ambas especies el tapete y la capa media se hipertrofian, degeneran y se colapsan las células madres de las microsporas que atraviesan por meiosis. Además en las últimas etapas del desarrollo de la antera sólo se distingue la epidermis que rodea a las otras capas colapsadas.

Por medio de la técnica de TUNEL se evidenció que en las etapas 8-9 las CMMi de las anteras de las flores pistiladas de *O. stenopetala* tienen fragmentado el DNA, lo que sugiere que estas células entran al programa de muerte celular propiciando la esterilidad masculina en este morfo floral. En la mutante *fat tapetum* de *A. thaliana* no existen estudios que permitan determinar si las alteraciones descritas en las CMMi y en la pared de la antera se propician por muerte celular programada.

De acuerdo con Sanders *et al.* (1999) debido al incremento en el tamaño de la capa media y el tapete, en la mutante *fat tapetum*, es que se colapsan los productos de la meiosis, aunque aclaran que podría ocurrir una meiosis anormal. Aunque los autores mencionan que no se forman granos de polen no especifican si la meiosis llega a concluir. Esto es de particular relevancia ya que en otras mutantes como *duet/mmd1* (Venkata *et al.*, 2003; Yang X. *et al.*, 2003), con alteraciones similares en las CMMi a las que se presentan en *O. stenopetala*, se sugiere que el progreso de la meiosis está controlado por puntos de revisión (checkpoints) que arrestan el desarrollo de las células meióticas pudiendo provocar su muerte. Es importante resaltar el hecho de que en las CMMi de las flores pistiladas de *O. stenopetala* se detiene el proceso meiótico alrededor de la profase I y que estas células degeneran por muerte celular programada, lo que sugiere la presencia de algún punto de control como lo propone Yang X. y colaboradores (2003) para *A. thaliana*.

La mutante *duet/mmd1* de *A. thaliana* (Venkata *et al.*, 2003; Yang X. *et al.*, 2003) comparte con *O. stenopetala* las alteraciones de las células madres de las microsporas, ya que durante la meiosis en ambas especies se presentan defectos en los cromosomas, además el citoplasma se colapsa dejando un espacio entre él y la pared de calosa y la cromatina se fragmenta. En la mutante *duet* se corroboró que en las CMMi se desencadena muerte celular antes de la citocinesis (Yang X. *et al.*, 2003), igualmente en *O. stenopetala* en estas células se induce la muerte celular programada, aunque no se determinó la etapa exacta hasta la que se detiene la meiosis, los resultados sugieren que al menos algunas células entran a profase I. Otra característica que comparten *duet/mmd1* y *O. stenopetala* es la reducción en el largo de los filamentos, es decir, en *duet/mmd1* los filamentos son más cortos que los del tipo silvestre y en *O. stenopetala* los estambres de las flores pistiladas poseen filamentos más cortos que las flores estaminadas. Sin embargo en *duet/mmd1* no se detectaron alteraciones en las capas de la pared de la antera, mientras que en *O. stenopetala* presenta alteraciones en todas las capas de la antera de las flores pistiladas. Otras mutantes en las cuales también se reducen la longitud de los

estambres son *dwarf d2*, *d3* y *d5* de maíz y en la mutante *anther-ear an1* y *an2*, *non-dehiscense1*, *ams*, *mmd1* (Kaul, 1988; Van Mylek *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2003; Yang X. *et al.*, 2003), entre otras, sin embargo, en la mayoría de estas mutantes la meiosis no se altera.

El gen *DUETIMMD1* de *A. thaliana* (Venkata *et al.*, 2003; Yang X. *et al.*, 2003) y el gen *MS1* de *Oryza sativa* (Ito y Shinozak, 2002) tienen homología, sin embargo, las alteraciones que provocan esterilidad son distintas. En la mutante *ms1* sí ocurre el proceso meiótico y la degeneración del polen ocurre tan pronto como se liberan las microsporas de la tétrada. En *O. stenopetala* no se forman tétradas de microsporas debido a que la degeneración se da durante las primeras fases de la meiosis de la CMMi. Lo que comparte la mutante *ms1* con *O. stenopetala* es que el tapete presenta el citoplasma altamente vacuolado. Tanto en la mutante *duet/mmd1* como en la mutante *ms1* no se ve alterado el resto de la pared de la antera, es decir, la epidermis, endotecio, capa media y tapete (éste último se altera en *duet/mmd1*) se desarrollan de manera normal, en *O. stenopetala* todas las capas de la antera se ven colapsadas y sin definición en la madurez, por lo que esto no se comparte con las mutantes de *Arabidopsis duet/mmd1* ni con las mutantes de arroz *ms1*. Sin embargo, en la mutante *fat tapetum* las alteraciones que se presentan en la pared de la antera son similares a *O. stenopetala*.

Debido a que no se tiene reportada la secuencia del gen *FAT TAPETUM* el diseño de "primers" se realizó únicamente contra la región homóloga de *DUETIMMD1* y *MS1* y así amplificar estos genes a partir del cDNA de las anteras de *O. stenopetala*. Sin embargo, no produjo ninguna banda a partir las flores pistiladas ni de las flores estaminadas; esto no se debió a un mal diseño de "primers" ya que cuando se tomó el cDNA y el DNA genómico de *A. thaliana* se encontró una banda del tamaño esperado para el gen *DUETIMMD1*. Esto se puede deber a diversas razones, una de ellas es que probablemente no exista ese gen en *O. stenopetala*, otra posibilidad es que una de las regiones que tomamos para la síntesis de "primers" fuera variable y que no sirviera como cebador.

Aunque las CMMi de las flores pistiladas de *Opuntia stenopetala* presentan de inicio menos cantidad de calosa que las de las flores estaminadas y además se observan muchas irregularidades en dicho depósito, es claro que en ambos morfos sexuales se deposita la calosa alrededor de las CMMi en la etapa 9, lo que sugiere que la esterilidad masculina no está vinculada a la ausencia de este glucano como sucede en algunas líneas con esterilidad masculina. Las CMMi de las flores pistiladas

de *O. stenopetala* continúan rodeadas por calosa y al parecer ésta no se degrada (permanecen restos de calosa en las últimas etapas de desarrollo en la masa amorfa de las anteras femeninas), probablemente esto se deba a que el tapete presenta alteraciones tempranas y su obliteración es anterior a que tenga actividad secretora haciendo incapaz la disposición de la calasa para degradar la calosa o quizás no se sintetice.

Otras mutaciones se ven reflejadas en la imposibilidad de tener dehiscencia. Las mutantes de *Arabidopsis dad1*, *atmyb26*, *non-dehiscense1* y *dde2-2* entre otras no alteran el desarrollo de los granos de polen, sin embargo, carecen de dehiscencia originando esterilidad masculina por que los granos de polen no están disponibles para la fecundación (Sanders *et al.*, 1999; Ishiguro *et al.*, 2001; Van Mylek *et al.*, 2002; Steiner-Lange *et al.*, 2003), lo cual no ocurre en *O. stenopetala* ya que no hay producción de granos de polen.

En la línea de tabaco con esterilidad masculina citoplásmica aloplásmica Nta(rep)S, las anomalías florales comienzan en estados tempranos del desarrollo, durante la formación del primordio (Farbos *et al.*, 2001). Este no parece ser el caso de *O. stenopetala*, debido a que las primeras alteraciones evidentes en el desarrollo de las anteras de las flores pistiladas se dan en etapas alrededor de la meiosis, posteriores a la diferenciación de las anteras.

Existen varios ejemplos de que cuando se interfiere en la diferenciación de las células del tapete se causa esterilidad masculina citoplásmica, indicando que este tejido es esencial para la producción de granos de polen funcional (Hernould *et al.*, 1993). En plantas transgénicas de tabaco, en la línea *pvs* de frijol y en algunas líneas de *Petunia* el depósito de calosa es anormal y el desarrollo del grano de polen se detiene en estado de tétrada, la meiosis concluye (Johns *et al.*, 1992; Abad *et al.*, 1995). De acuerdo con Worrall *et al.* (1992) la prematura degradación de la calosa, asociada a alteraciones del tapete, es suficiente para causar esterilidad masculina. Es claro que aunque en *O. stenopetala* existen muchas alteraciones que generan esterilidad masculina, una de ellas se presenta en el tapete, éste se hipertrofia, se vacuoliza intensamente en los estados cercanos a la meiosis, nunca sucede cariocinesis, por lo tanto, el tapete está suficientemente alterado en el momento en que las CMMi están rodeadas por la pared de calosa, a diferencia de las mutantes arriba descritas, en *O. stenopetala* la calosa permanece en las etapas de anthesis en las flores pistiladas. Esto sugiere que aunque se completara la meiosis de las CMMi las alteraciones que presenta el tapete hacen imposible su correcto funcionamiento, la



permanencia de la calosa dentro de los lóculos colapsados de la antera en etapas maduras del desarrollo sugiere que posiblemente no hay liberación de la calasa por parte del tapete.

## LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y LA ESTERILIDAD MASCULINA

La muerte celular tiene un papel fundamental durante los eventos de reproducción debido a que la alteración en su control puede provocar esterilidad de algún órgano sexual. Se ha reportado que la muerte celular ocurre tempranamente en el desarrollo sexual en la selectiva absorción de los primordios de uno u otro órgano sexual en plantas unisexuales y durante el desarrollo de los órganos reproductivos y gametos tanto femeninos como masculinos (Wu y Cheung, 2000).

Es inusual en la muerte celular de plantas la ruptura celular, liberando el contenido celular para ser incorporados por otros tipos celulares diferenciándose, como ocurre en animales, debido a que en plantas la pared celular impide el engullimiento de las células muertas. En el caso de *O. stenopetala* las células de la antera (las CMMi y las diferentes capas de la pared) parecen romperse por el colapso generalizado y hacer un continuo fluido o "plasmodio" limitado por la unión de paredes de células muertas de los diferentes estratos de la antera y en algunos casos se conservan células epidérmicas limitando a este "fluido".

De acuerdo con Balk y Leaver (2001) en la línea PET1-CMS de girasol en las células del tapete se libera el citocromo *c* al citoplasma. La liberación del citocromo precede a la condensación celular, fragmentación del DNA y a un decremento en la integridad de la membrana externa de la mitocondria. La prematura muerte del tapete origina la muerte de las microsporas generando un fenotipo estéril. En la familia Cactaceae existe un reporte donde se menciona a la PCD como un posible evento que provoque la esterilidad masculina en las flores postiladas, de acuerdo con Strittmatter *et al.* (2002) la alta vacuolización del tapete de las anteras de las flores pistiladas de *C. spinosissima* marca el comienzo de la muerte de esta capa sugiriendo que atraviesan por muerte celular programada, sin embargo, esto no lo corroboraron con un estudio específico de PCD.

Algunos trabajos que han requerido de la técnica TUNEL para la corroboración de PCD en la antera son los realizados por Coimbra y colaboradores (2004) en *Actinidia deliciosa*, Yang X. *et al.* (2003) en *A. thaliana*, Balk y Leaver (2001) en el girasol, entre otros, mostrando la fragmentación de la cromatina de distintas células de la antera. En *A. thaliana* las células madres de las microsporas a partir de la diacinesis presentan

los síntomas de la muerte celular programada (Yang X. *et al.*, 2003). Por otro lado, en *Actinidia deliciosa* la detección de la fragmentación se probó en los estados tempranos de la microspora (Coimbra *et al.*, 2004). En el girasol (*Helianthus annuus*) la fragmentación de la cromatina y las alteraciones morfológicas características de la PCD se acompañan de la liberación del citocromo *c* en las células del tapete, al parecer la temprana degeneración del tapete propicia la muerte de las células madres de las microsporas (Balk y Leaver, 2001). De estos tres casos el único que coincide parcialmente con *O. stenopetala* es el de la mutante *duet/mmd1* de *Arabidopsis* ya que la muerte celular se sitúa en ambos casos en las mismas células (células madres de las microsporas) originando alteraciones similares aunque no idénticas, ya que en *Arabidopsis* se avanza más en la meiosis, por el contrario en *O. stenopetala* parece detenerse rápidamente la meiosis en las primeras etapas de la profase y las CMMi comienza a degenerar.

Con relación a la línea mutante de esterilidad masculina del girasol PET1-CMS, *O. stenopetala* comparte la alteración temprana de las células del tapete de las flores pistiladas que parecen entrar a PCD antes del tiempo en el que lo hacen las de las flores estaminadas, presentando un número elevado de vacuolas antes de que se realice la cariocinesis de este estrato, la cual es una característica de las especies de cactáceas, las cuales llegan a presentar 2 núcleos en el tapete (Tiagi, 1970). Aunque no se corroboró la liberación del citocromo *c* en las células del tapete de *O. stenopetala*.

De acuerdo con Golberg *et al.* (1993) un error en la dehiscencia puede ocasionar la esterilidad masculina. La liberación de los granos de polen maduros requiere del rompimiento de las células del estomio, una estructura especializada que está contigua a la epidermis y va a lo largo del lado lateral dividiendo a la antera. Tanto las células circulares, el tejido conectivo, como el endotecio pueden tener muerte celular, si estas células no entran a muerte celular programada se bloquea la dehiscencia. En ambos tipos florales de *O. stenopetala* se encontró fragmentación del DNA, una característica principal de la PCD, este proceso es necesario en diferentes capas de la antera para el buen funcionamiento global de los estambres, sin embargo, su regulación espacio-temporal es importante, ya que si se modifican las células que entran a muerte celular o el tiempo en que entran a dicho programa se puede generar esterilidad masculina. Por ejemplo, sólo algunas células de la epidermis ubicadas en la parte lateral de la antera, corriendo a lo largo de la misma, son las que entran a muerte celular, las demás células de la epidermis en las anteras de las flores pistiladas tienen modificaciones en cuanto a su forma, que va de ser rectangular a tener forma de

papila. Sin embargo, en las anteras de las flores pistiladas, algunas células de la epidermis alejadas de la región donde se forma el estomio presentan fragmentación del DNA alrededor de la etapa 10, lo cual es un hallazgo importante porque no ha sido reportado en trabajos previos de desarrollo de anteras. Ya que la PCD es un mecanismo que regula los procesos del desarrollo floral podría estar más involucrado en la generación de especies con flores unisexuales, independientemente si es mediada por mutaciones en el DNA mitocondrial o en el núcleo.

El análisis sobre expresión génica diferencial entre las anteras de las flores pistiladas contra las estaminadas con AFLP's permite, teóricamente, encontrar genes involucrados en la unisexualidad en el caso de ser mutaciones sobre genes nucleares o genes restauradores de la fertilidad en el caso de que *O. stenopetala* tenga esterilidad masculina citoplásmica. Se encontraron secuencias de cuatro posibles genes expresados diferencialmente entre las anteras de ambos tipos florales que podrían corresponder a genes restauradores de la fertilidad, como es el caso de las secuencias 4M66E43F-III y M75E44F-I que se encuentran en las flores pistiladas; contrariamente las secuencias M72E44♂-II y M74E44♂-I que sólo se encuentran en flores estaminadas. No obstante, al comparar las secuencias en el banco de genes no se encontró homología con ningún gen antes reportado. Se requieren de estudios más detallados sobre la posible función de estos genes y comprobar si están involucrados en la unisexualidad de *O. stenopetala*.

## SISTEMAS DE REPRODUCCIÓN SEXUAL EN LA FAMILIA CACTACEAE

El sistema sexual hermafrodita se distribuye en todas las familias de plantas con flores como un carácter conservado. La familia Cactaceae no es la excepción ya que aproximadamente el 99% de sus especies presentan flores hermafroditas, es decir, flores que presentan tanto estambres como carpelos.

Han sido muy breves las descripciones en cuanto a las alteraciones morfológicas que presentan las flores unisexuales con respecto al desarrollo de las flores hermafroditas en la familia Cactaceae. En cuanto a las descripciones de las anteras de las flores pistiladas son los siguientes: Las flores pistiladas de *M. dioica* tienen anteras indehiscentes que no contienen polen (Ganders y Kennedy, 1978). Hoffman (1992) reporta que las flores pistiladas de *E. coccineus* poseen anteras pequeñas con filamentos cortos, colapsadas y que no producen polen. Las flores

pistiladas de *Pachycereus pringlei* poseen anteras que carecen de polen y son notablemente más pequeñas que las de las hermafroditas (Fleming *et al.*, 1994). En *Opuntia robusta* Del Castillo (1986) y Del Castillo y González (1988) reportaron que las anteras de las flores pistiladas están atrofiadas y no tienen polen fértil, aunque los autores no especifican si hay formación de polen. Kimnach (1982) menciona que las flores pistiladas de *Selenicereus innesii* carecen enteramente de estambres, siendo el único ejemplo en la familia con ausencia total de uno de sus órganos reproductivos, sin embargo, de acuerdo con Orozco (2002) existen muchos errores en las descripciones de los sistemas unisexuales en la familia Cactaceae, por lo que estudios más detallados podrían modificar los datos del tipo de reproducción sexual de algunas especies.

Para entender las alteraciones que presentan las anteras de las flores pistiladas es necesario describir a detalle el desarrollo normal de las anteras de las flores estaminadas. El cual en *O. stenopetala* es similar al que presentan distintas especies de las diferentes subfamilias de la familia Cactaceae como son *Pereskia lychnidiflora* (Jiménez, 2002), *Opuntia tomentosa* (Flores, 2002) y *Pachycereus militaris* (Núñez *et al.*, 2001).

Recientes trabajos han descrito estructuralmente los cambios en el desarrollo de los morfos que presentan las especies con sistemas de reproducción con flores unisexuales en *Consolea spinosissima* (Strittmatter *et al.*, 2002) y *Pachycereus pringlei* (Núñez, 2004).

Las anteras de las flores pistiladas y flores estaminadas de *O. stenopetala* y *C. spinosissima* se desarrollan de manera similar durante sus primeras etapas. En ambas especies las CMMi entran al programa de meiosis y detienen su desarrollo alrededor de la profase I. Las células madres se degradan, por lo que nunca forman microsporas libres. Aunque Strittmatter *et al.* (2002) observaron en algunos casos "tétradas anormales" en *C. spinosissima* lo que indica que rara vez se avanza más en la meiosis, suceso que no se observó en *O. stenopetala*. Otra característica que comparten las anteras de las flores pistiladas de ambas especies es que las células del tapete se hipertrofian y se vacuolizan fuertemente antes de que las CMMi lleguen a la Profase I y degeneran poco después. Al igual que en *O. stenopetala* en *C. spinosissima* se observaron remanentes de calosa rodeando las células madres de las microsporas degenerando de las flores pistiladas. En ambas especies el tapete de las flores pistiladas permanece por más tiempo que en las estaminadas y más tarde

degenera. De acuerdo con Strittmatter *et al.* (2002) las anteras de las flores pistiladas de *C. spinosissima* durante la antesis están vacías, colapsadas y se encuentran por debajo del nivel del estigma. En la antesis, las anteras de las flores pistiladas de *O. stenopetala* tienen todos los estratos degenerados y se colapsan, por lo que no se encuentran vacíos los lóculos, sin embargo, las anteras también se encuentran por debajo del nivel del estigma. Aunque estas dos especies comparten varias características en cuanto a las alteraciones del desarrollo de las anteras de las flores pistiladas ambas poseen distintos sistemas de reproducción. *C. spinosissima* tiene tres morfos florales en su población, regida por un sistema de reproducción subdioico, ya que forma en menor proporción individuos con flores bisexuales. *Opuntia stenopetala* parece tener un sistema funcionalmente dioico estable donde sólo hay individuos masculinos y femeninos. Aunque los datos estructurales que describen las alteraciones en las distintas especies unisexuales de la familia Cactaceae son escasos y poco detallados es claro que no todos comparten las mismas alteraciones con *O. stenopetala* y *C. spinosissima*. Por ejemplo, el desarrollo de las anteras de las flores pistiladas de *P. pringlei* y el desarrollo de las flores pistiladas de *O. stenopetala* difieren en cuanto a que en *P. pringlei* se lleva a cabo la meiosis de las células madres de las microsporas generando granos de polen con alteraciones en la pared, mismos que no están disponibles para la reproducción sexual (Núñez, 2004).

Ross (1978, 1980) propuso modelos para la evolución del dioicismo a partir de especies hermafroditas vía genes de esterilidad femenina y masculina parcial. Él asumió que los individuos que presentaban esterilidad femenina y masculina parcial poseían mayor fertilidad de polen y óvulos respectivamente por "compensación". En el caso de *O. stenopetala* no es posible comparar si hay un incremento en la fertilidad de los morfos unisexuales con respecto al morfo hermafrodita debido a que este último no se presentó en la población estudiada, ni hay indicios de su existencia en los ejemplares de herbario. Sin embargo, en las anteras de las flores estaminadas se encontró que el polen es viable en más del 99%.

En la familia Cactaceae se reportan los sistemas dioicos y sus formas intermedias así como el sistema trioico, sugiriendo que posiblemente la evolución de este sistema dentro de la familia es, en su mayoría, a partir de un sistema hermafrodita o posiblemente ginodioico para algunas especies de *Opuntia*, como en *Opuntia quimilo*, donde el sistema de reproducción es funcionalmente dioico, pero raramente es ginodioico, teniendo vestigios de este sistema como su precursor. De acuerdo con Ross (1980) la evolución del dioicismo a través de la vía ginodioica puede ser estable o inestable. Esta última está controlada por genes nucleares que controlan la

esterilidad masculina como en *Pimelea*, *Fuchsia* y *Umbelliferae*. Muy probablemente, *O. quimilo* tenga un sistema de reproducción ginodioico poco estable cambiando al sistema dioico. Las especies con flores unisexuales del género *Pereskia*, el cual se considera ancestral dentro de la familia, posee sistemas unisexuales dioico (*P. zinniflora* y *P. portulacifolia*) y androdioico (*P. quisqueyana*). Según Wolf *et al.* (2001) el sistema androdioico es una forma rara de evolución hacia el dioicismo, aunque Pannell (2000) propone que la condición androdioica evoluciona teniendo al dioicismo o monoicismo como precursores. Sin embargo, para la familia no hay reportes de especies con sistemas de reproducción monoicos. El sistema de reproducción heterostilico lo reporta Del Castillo (1986) para *Opuntia robusta* pero muy probablemente esto parta de una mala interpretación de los morfos florales, ya que compara anteras viables contra anteras abortivas. Lo mismo ocurriría con otras especies de la familia Cactaceae que al igual que *O. stenopetala* los estambres de las flores pistiladas son más cortas en la antesis que las de las flores estaminadas pero esto no se debe a que posean un sistema de reproducción heterostilico sino al colapso generalizado de las células de los estambres.

## CROMOSOMAS SEXUALES

Algunas especies dioicas tienen determinación sexual mediada por cromosomas como algunas del género *Silene* y las especies *Humulus lupulus*, *H. japonicus* y *Cannabis sativa* (Guttman y Charlesworth, 1998). En la familia Cactaceae no se tiene evidencia de que existan cromosomas sexuales. Quizás se deba a que no existe este mecanismo en la familia o a los pocos estudios que se tienen sobre los cromosomas de las especies esta familia. Uno de estos estudios es el realizado por Pinkava *et al.* (1985) en donde describen que *Opuntia stenopetala* posee, como el resto de las especies de la familia, 11 cromosomas como número base pero no mencionan alguna diferencia cromosómica asociada con alguna forma sexual.

## **CONCLUSIONES**

En *Opuntia stenopetala* las anteras de las flores estaminadas se desarrollan exitosamente llegando a la madurez y proporcionando los granos de polen para la reproducción.

Las anteras de las flores pistiladas se desarrollan de manera similar a las estaminadas hasta la etapa de célula madre de las microsporas. Al entrar a meiosis la CMMi presenta características estructurales típicas de muerte celular como: compactación de la cromatina, incremento en el número y tamaño de las vacuolas, colapso celular propiciado la separación de la pared celular. El tapete se hipertrofia, conteniendo un número elevado de vacuolas y no ocurre la división nuclear. Posteriormente el resto de las capas de la pared presentan alteraciones similares sugiriendo que en todas las capas de las anteras de las flores pistiladas ocurre muerte celular programada. Estos datos fueron comprobados por la técnica de TUNEL.

*Opuntia stenopetala* es una de las primeras especies silvestres en la que se estudia la relación de la muerte celular y la esterilidad masculina, ya que los estudios se han centrado en especies cultivadas.

A pesar de los esfuerzos por buscar genes expresados diferencialmente entre las anteras de las flores estaminadas y pistiladas, la expresión génica evaluada mostró diferencias sutiles entre las anteras de las flores estaminadas y las anteras de las flores pistiladas.

## PERSPECTIVAS

Existen otras aproximaciones que se pueden hacer para corroborar la muerte celular programada en las anteras de las flores pistiladas, como la detección de la liberación del citocromo c de la mitocondria; la detección de la fragmentación del DNA por medio de la visualización de DNA "ladder" ya que son útiles para demostrar la muerte de las anteras.

Por otra parte, se requiere corroborar la expresión génica diferencial de los fragmentos secuenciados, para ello se tienen los "primers" ya sintetizados que serán útiles durante la amplificación por PCR a partir de DNA de 30 individuos con flores estaminadas y 30 individuos con flores pistiladas. Además de corroborar su expresión se requiere de ver si estos genes están involucrados con la esterilidad masculina de las flores pistiladas, por lo que se necesitan estudios más detallados para esta finalidad.

Un hallazgo prometedor es que la mutante *fat tapetum* de *Arabidopsis thaliana* durante el desarrollo tiene las mismas alteraciones que se presentan en las anteras de las flores pistiladas de *Opuntia stenopetala*, por lo que sería útil la secuencia de este gen para saber si es el responsable de la esterilidad masculina en *Opuntia stenopetala*, sin embargo, esta no se encuentra en el gen bank.



## LITERATURA CITADA

- Aarts, M., Dirkse, W., Stlekema, W. y Pereira, A. 1993. Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature* 363:715-717.
- Abad A., Mehrtens B. y Mackenzie, S. 1995. Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male-sterile bean. *Plant Cell* 7:271-85.
- Ainsworth C., Crossley S., Buchanan-Wollaston V., Thangavelu M. y Parker J. 1995. Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. *Plant Cell* 7:1583-98.
- Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany* 86: 211-221.
- Ainsworth, C., Lu, J., Winfield, M. y Parker, J. 1999. Sex determination by X:autosome dosage: *Rumex acetosa* (sorrel). En: Ainsworth, C. (ed.). *Sex determination in plants*. Oxford: Bios Scientific Publishers. EUA.
- Albertsen, M. y Phillips, R. 1981. Developmental cytology of 13 genetic male-sterile loci in maize. *Can J Genet Cytol* 23:195-208.
- Allison, D. y Fisher, W. 1964. A dominant gene for male sterility in upland cotton. *Crop Sci* 4:548-549.
- Ameisen, J. 1996. The origin of programmed cell death. *Science* 272:1278-1279.
- Anderson, E. 2001. *The cactus family*. Timber Press, Portland, EUA.
- Anderson, G. 1980. Dioecious *Solanum* species of hermaphroditic origin is an example of a broad convergence. *Nature* 282:836-838.
- Anton, A. y Connor H. 1995. Floral biology and reproduction in *Poa* (Poeae, Gramineae). *Aust J Bot* 43:577-599.
- Arreola, H. 1997. Formas de vida y características morfológicas. En: Valle, C. (ed.) *Suculentas mexicanas y cactáceas*. CONABIO, SEMARNAP, UNAM. México.
- Atanassov I., Delicheré C., Filatov D., Charlesworth D., Negrutiu I. y Monéger F. 2001. Analysis and evolution of two functional Y-linked loci in a plant sex chromosomes system. *Mol Biol Evol* 18:2162-2168.
- Azumi Y., Liu D., Zhao D., Li W., Wang G., Hu Y. y Ma H. 2002. Homolog interaction during meiotic prophase I in *Arabidopsis* requires the *SOLO DANCERS* gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J* 21:3081-3095
- Bachem C., Oomen R. y Visser R. 1998. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Mol Biol Rep* 16:157-173.
- Bai X., Peirson B., Dong F., Xue C. y Makaroff C. 1999. Isolation and characterization of *SYN1*, a *RAD21*-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 3:417-30.

- Balk J. y Laever, C. 2001. The PET-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release. *Plant Cell* 13:1803-1818.
- Barret, S. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science* 3:335-341.
- Barret, S. 2002. The Evolution on Plant Sexual Diversity. *Nature* 3:274-284.
- Bawa, K. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:15-39.
- Bawa, K. y Beach, J. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68:254-274.
- Beals, T. y Goldberg, R. 1997. A novel cell ablation strategy blocks tobacco anther dehiscence. *Plant Cell* 9:1527-1545.
- Bereterbide, A., Hernould, M., Farbos, I., Glimelius, K. y Mouras, A. 2002. Restoration of stamen development and production of functional pollen in an alloplasmic CMS tobacco line by ectopic expression of the *Arabidopsis thaliana* *SUPERMAN* gene. *Plant J* 29:607-615.
- Bergman, P., Edqvist, J., Farbos, I. y Glimelius, K. 2000. Male sterile tobacco display abnormal mitochondrial *atp1* transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio. *Plant Mol Biol* 42:531-544.
- Bhatt, A., Lister, C., Page, T., Fransz, P., Findlay, K., Jones, G., Dickinson, H., y Dean, C. 1999. The DIF1 gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the REC8/RAD21 cohesin gene family. *Plant J* 4:463-72.
- Bhojwani, S. y Bhatnagar, S. 1974. *The Embriology of Angiosperms*. 4<sup>a</sup> Edición. Vikas Publishing House Pvt. Ltd. Nueva Delhi.
- Bonnet, H., Kofer, W., Hakansson, G. y Glimelius, K. 1991. Mitochondrial involvement in petal and stamen development studied by sexual and somatic hybridization of *Nicotiana* species. *Plan Sci* 80:119-130.
- Bowman, J., Smyth, D. y Meyerowitz, E. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Develop* 112:1-20.
- Bravo-Hollis, H. 1978. *Las Cactáceas de México*. 2<sup>a</sup> Edición. Volumen 1. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Britton, N. y Rose, J. 1937. *The Cactaceae*. 4 Vols. Dover Publications, Inc. EUA.
- Buchanan, B., Gruissem, W. y Russell, J. 2002. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Corier. p:1044-1099.
- Burk, L. 1967. An interspecific bridge-cross *Nicotiana repanda* through *N. sylvestris* ta *N. tabacum*. *J Hered* 58:215-218.
- Calderon-Urrea A. y Dellaporta, S. 1999. Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. *Development* 126:435-441

- Caporali, E., Carboni, A., Galli, M., Rossi, G., Spada, A. y Marziani, L. 1994. Development of male and female flower in *Asparagus officinalis*. Search for point of transition from hermaphroditic to unisexual developmental pathway. *Sexual Plant Reproduction* 7:239-249.
- Caryl, A., Jones, G. y Franklin, F. 2003. Dissecting plant meiosis using *Arabidopsis thaliana* mutants. *J Exp Bot.* 54:25-38.
- Charlesworth, B. y Charlesworth, D. 1979. Population genetics of partial male sterility and the evolution of monoecy and dioecy. *Heredity* 41:137-154.
- Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 88: 94-101.
- Charlesworth, D. y Guttman D. 1999. The evolution of dioecy and plant sex chromosome system. In:Ainsworth CC, ed. *Sex determination in plants*. Oxford:Bios Scientific Publishers.
- Chaudhury, A. 1993. Nuclear genes controlling male fertility. *The Plant Cell* 5:1277-1283.
- Chaudhury, A., Craig, S., Farrell, L., Bloemer, K. and Dennis, E. 1992. Genetic control of male-sterility in higher plants. *Aust J Plant Physiol* 19, 419-425.
- Chen, Y. y McCormick S. 1996. *sidecar* pollen, an *Arabidopsis thaliana* male gametophytic mutant with aberrant cell divisions during pollen development. *Development.* 1:3243-53.
- Cigan, A., Unger, E., Xu, R., Kendall, T. y Fox, T. 2001. Phenotypic complementation ms45 maize requires tapetal expression of MS45. *Sex Plant Reprod* 14:135-142.
- Coen, E. y Meyerowitz, E. 1991. The war of the whorls:genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353:31-37.
- Coimbra, S., torrao, L. y Abreu, I. 2004. Programmed cell death induces male sterility in *Actinidia deliciosa* female flowers. *Plant Physiology and Biochemical* 42:537-541.
- Couteau, F., Belzile, F., Horlow, C., Grandjean, O., Vezon, D. y Doutriaux, M. 1999. Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a dmc1 mutant of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 9:1623-34.
- Dafni, A. 1992. *Pollination Ecology. A practical approach*. Oxford University Press. EUA.
- Dawson, J., Wilson, Z., Aarts, M., Braithwaite, A., Briarty, L. y Mulligan, B. 1993. Microspore and pollen development in six male sterile mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Can J Bot* 71:629-638.
- Decker, K. y Pilson, D. 2000. Biased sex ratios in the dioecious annual *Croton texensis* (Euphorbiaceae) are not due to environmental sex determination. *American Journal of Botany* 87: 221-229.
- Del Castillo, R. 1986. La selección natural de los sistemas de cruzamiento de *Opuntia robusta*. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Chapingo. México.

- Del Castillo, R. 1996. Ensayo sobre el fenómeno calcícola-calcífuga en cactáceas mexicanas. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 41: 3-11.
- Del Castillo, R. y González. M. 1988. Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia* 71: 185-196.
- Delicheré, C., Veuskens, J., Hernould, M., Barbacar, N., Mouras, A. y Negrutiu, I. 1999. *SIY1*, the first active gene cloned from a plant Y chromosome, encodes a WD-repet protein. *EMBO J* 18:4169-4179.
- Dewey, R., Timothy, D. y Levings, C. 1987. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T-cytoplasm of maize. *Proc Natl Acad Sci.* 84:5374-5378.
- Díaz L. Coccuci A. 2001. Dioecia funcional en *Opuntia quimilo* (Cactaceae). Resumen en XXVIII Jornadas Argentinas de Botánica. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 36 (supl.):34.
- Domínguez, C. 1985. Ecología reproductiva de *Croton suberosus* (Euphorbiaceae). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Dorken M., Friedman, J. y S. Barret. 2002. The evolution and maintenance of monoecy and dioecy in *Sagittaria latifolia* (Alimantaceae). *Evolution* 56:31-41.
- Dubrovsky, J., Doerner, P., Colón-Carmona, A. y Rost T. 2000. Pericycle Cell Proliferation and Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 1648–1657.
- Edelmann, W., Cohen, P., Kane, M., Lau, K., Morrow, B., Bennet, S., Umar, A., Kunkel, T., Cattoretti, G. y Chaganti, R. 1996. Meiotic pachytene arrest in *MLH1*-deficient mice. *Cell* 85:1125-1134.
- El-Keblawy, A., Lovett-Doust, J. y Lovett-Doust, L. 1996. Gender variation and the evolution of dioecy in *Thymelaea hirsuta* (Thymelaeaceae). *Can J Bot* 74:1596-1601.
- Farbos, I., Mouras, A., Bereterbide, A. y Glimelius, K. 2001. Defective cell proliferation in the floral meristem of alloplasmic plants of *Nicotiana tabacum* leads to abnormal floral organ development and male sterility. *Plant J* 26:131-142.
- Filatov, D., Laporte, V., Vitte, C. y Charlesworth D. 2001. DNA diversity in sex-linked and autosomal genes of the plant species *Silene latifolia* and *Silene dioica*. *Mol. Biol. Evol.* 18:1442-1454.
- Fleming, T., Maurice, S. y Hamrick, J. 1998. Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Evolutionary Ecology* 12:279-289.
- Fleming, T., Maurice, S., Buchmann, S. y Tuttle, M. 1994. Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 81:858-867.
- Flores, L. 2002. Embriología de *Opuntia tomentosa* Salm-Dick var. *tomentosa* Salm-Dick (Cactaceae). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

- Freeman, D. y Vitale, J. 1985. The influence of environment on the sex ratio and fitness of spinach. *Botanical Gazette* 146:137-142.
- Galli, M., Bracale, M., Falavigna, A., Raffaldi, F., Savini, C. y Vigo, A. 1993. Different kinds of male flowers in the dioecious plant *Asparagus officinalis* L. *Sexual Plant Reproduction* 6:16-21.
- Ganders, E. y Kennedy, H. 1978. Gynodioecy in *Mammillaria dioica* (Cactaceae). *Madroño* 25:234.
- García, V., Bruchet, H., Comescas, D., Granier, F., Bouchez, D. y Tissier, A. 2003. *AtATM* is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *Plant Cell* 15:119-132.
- Gibson, A. y Nobel, P. 1986. *The Cactus Primer*. Harvard University Press, Cambridge. EUA.
- Glover, J., Grelon, M., Craig, S., Chaudhury, A. y Dennis, E. 1998. Cloning and characterization of MS5 from *Arabidopsis* a gene critical in male meiosis. *Plant J.* 3:345-56.
- Goldberg, R., Beals, T. y Sanders P. 1993. Anther development: basis principles and practical applications. *Plant Cell* 5:1217-1229.
- Gorman, S. y McCormick, S. 1997. Male sterility in tomato. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16:31-53.
- Grant, S., Houben, A., Vyskot, B., Siroky, J., Pan, W., Macas, J. y Saedler, H. 1994. Genetics of sex determination in flowering plants. *Developmental genetics* 15:214-230.
- Greenberg J. 1996. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci* 93:12094-7.
- Grelon, M., Gendrot, G., Vezon, D., Vezon, D. y Pelletier, G. 2003. The *Arabidopsis MEI1* gene encodes a protein with five BRTC domains that is involved in meiosis-specific DNA repair events independent of *SPO11*-induced DSBs. *Plant J* 35:465-475.
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G. y Pelletier, G. 2001. *AtSPO11-1* is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J* 3:589-600.
- Greyson, R. 1994. *The development of flowers*. Oxford University Press. EUA.
- Guttman, D. y Charlesworth, D. 1998. An X-linked gene with a degenerate Y-linked homologue in a dioecious plant. *Nature* 393:263-265.
- He, S., Abad, A., Gelvin, S. y Mackenzie, S. 1996. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial protein causes pollen disruption in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci* 21:11763-8.
- Hoffman, M. 1992. Functional dioecy in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae): breeding system, sex ratios and geographic range of floral dimorphism. *American Journal of Botany* 79:1382-1388.

- Huang, S., Eric, C., Youlin, Q., Deepti, B., Carrie M., Doris, D., Hanson, K., Malloy, P. y Linda, A. 2003. Transgenic Studies on the Involvement of Cytokinin and Gibberellin in Male Development. *Plant Physiol* 131: 1270-1282.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. y Okada, K. 2001. The *DEFECTIVE IN ENTHER DEHISCENCE1* gene encodes a novel phospholipase a1 catalyzing the inicial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:2192-2209.
- Ito, T. y Shinozaki, K. 2002. The *MALE STERILITY1* gene of *Arabidopsis*, encoding a nuclear protein with a PHD-finger motif, is expressed in tapetal cells and is required for pollen maturation. *Plant Cell Physiol* 11:1285-92.
- Jiménez, K. 2002. Embriología de *Pereskia lychnidiflora* (De Candolle, 1828) Cactaceae. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Johns, C., Lu, M., Lyznik, A. y Mackenzie S. 1992. A mitochondrial DNA sequence is associated with abnormal pollen development in cytoplasmic male sterile bean plants. *Plant Cell* 4:435-449.
- Kater, M., Franken, J., Carney, K., Colombo, K. y Angenet, G. 2001. Sex determination in the monoecious species *Cucumber* is confined to specific floral whorls. *Plant Cell* 13:481-493.
- Kaul, M. 1988. *Male Sterility in Higher Plants*. Monographs on theoretical and applied genetics, vol. 10. Springer Verlag, Berlin.
- Kejnovsky, E., Vrána, J., Matsunaga, S., Soucek, P., Siroký, J., Dolezel, J. y Vyskot, B. 2001. Localization of male-specifically expressed *MROS* genes of *Silene latifolia* by PCR on flow-sorted sex chromosomes and autosomes. *Genetics* 158:1269-1277.
- Kimnach, M. 1982. *Selenicereus innesii*, an aberrant new species from the West Indies. *Cactus and Succulent Journal* 54: 3-7.
- Klimyuk, V. y Jones, J. 1999. *AtDMC1*, the *Arabidopsis* homologue of the yeast *DMC1* gene: characterization, transposon-induced allelic variation and meiosis-associated expression. *Plant Cell* 9:1623-34.
- Koelewijn, H. y van Damme J. 1996. Gender variation, partial male sterility and labile sex expression in ginodioecious *Plantago coronopus*. *New Phytologist* 132:67-76.
- Ku, S., Yoon, H., Suh, H. y Chung Y. 2003. Male-sterility of thermosensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum. *Planta* 217:559-565.
- Lardon, A., Georgiev, S., Aghmir, A., Merr, G. y Negrutiu, I. 1999. Sexual dimorphism in white campion: complex control of carpel number is revealed by Y chromosome deletions. *Genetics* 151:1173-1185.
- Laser, K. y Lersten, N. 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *The Botanical Review* 38:425-454.

- Lebel-Hardenack, S., Hauser, E., Law, T., Schmid, J. y Grant, S. 2002. Mapping of sex determination loci on the white campion (*Silene latifolia*) Y chromosome using amplified fragment length polymorphism. *Genetics* 160:717-725.
- Lebel-Hardenack, S. y Grant, S. 1997. Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends in Plant Science* 2:130-13.
- Leuenberger, B. 1986. *Pereskia (Cactaceae)*. Memoirs of the New York Botanical Garden. 41:1-141.
- Lindsay, G. y Dawson, E. 1952. Mammillarias of the islands off northwestern Baja California, Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 24:76-84.
- Liscum, M. 1999. *PCR applications. Amplified Fragment Length Polymorphism: studies on plant development*. Academic Press. p:505-519.
- Liston, A., Rieseberg, L. y Elias, T. 1990. Functional androdiacy in the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature* 334:641-642.
- Liu, F. y Schnable, P. 2002. Functional specialization of maize mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Plant Physiology* 130:1657-1674.
- Liu, L., Guo, W., Zhu, X. y Zhang, T. 2003. Inheritance and the fine mapping of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in *Gossypium hirsutum* L. *Theor Appl Genet* 106:461-469.
- López, M., Márquez, J. y Murguía, G. 1998. *Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas*. Las Prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Magnard, J., Yang, M., Chen, Y., Leary, M. y McCormick, S. 2001. The *Arabidopsis* gene tardy asynchronous meiosis is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis. *Plant Physiol* 127:1157-1166.
- Maier, C., Chapman K. y Smith, D. 1997. Phytoestrogens and floral development in dioecious *Maclura pomifera* (Raf.) and *Morus rubra* L. (Moraceae). *Plant Science* 130: 27-40.
- Matsunaga, S., Isono, E., Kejnovsky, E., Vyskoy, B., Dolezel, J., Kawano, S. y Charlesworth, D. 2003. Duplicative transfer of a MADS box gene to a plant Y chromosome. *Mol Biol Evol* 20:1062-1069.
- Matsunaga, S., Kawano, S., Takano, H. y Uchida, H. 1996. Isolation and developmental expression of male reproductive organ-specific genes in a dioecious campion, *Melandrium album* (*Silene latifolia*). *Plant J* 10:679-689.
- McConn, M. y Browse, J. 1996. The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an *Arabidopsis* Mutant. *Plant Cell* 3:403-416.
- McCormick, S. 1993. Male gametophyte development. *Plant Cell* 5:1265-1275.
- Mercier, R., Armstrong, S., Horlow, C., Jackson, N., Makaroff, C., Vezon, D., Pelletier, G., Jones, G. y Franklin, F. 2003. The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in *Arabidopsis*. *Development* 14:3309-18.

- Moore, R., Kozyreva, O., Lebel-Herdenack, S., Siroky, J., Hoza, R., Vyskot, B. y Grant, S. 2003. Genetic and functional analysis of *DD44*, a sex-linked gene from the dioecious plant *Silene latifolia*, provides clues to early events in sex chromosomes evolution. *Genetics* 163:321-334.
- Negrutiu, I., Vyskoy, B., Barbacar, N., Georgiev, S. y Moneger, F. 2001. Dioecious Plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiology* 127:1418-2424.
- Neuffer, M., Coe, E. y Wessler, S. 1997. *The mutants of maize*. Cold Spring Harbor Lab Press, Plainview, NY.
- Nonomura, K., Miyoshi, K., Eiguchi, M., Suzuki, T., Miyao, A., Hirochika, H. y Kurata, N. 2003. The *MSP1* gene is necessary to restrict the number of cell entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. *Plant Cell* 16:1728-1739.
- Noodén, L. 2004. *Plant cell death processes*. Elsevier Academic Press. USA.
- Núñez, C. 2004. Cactaceae columnares de México: estudio embriológico comparativo de cinco especies de la tribu Pachycereeae. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Núñez, C., Engleman E. y Márquez, J. 2001. Embriología de *Pachycereus militaris* (Audot) Hunt (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 68: 5-13.
- Nyffeler, R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnK/matK* y *trnL/trnF* sequences. *American Journal of Botany* 89: 312-326.
- Orozco A. 2002. Sistema reproductivo de *Opuntia stenopetala* Engelmann (Cactaceae). Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Palmer, R. y Horner, H. 2000. Genetics and cytology of a genic male-sterile, female-sterile mutant from a transposon-containing soybean population. *J Hered* 5:378-83.
- Pannell, J. 2000. A hypothesis for the evolution of androdioecy: the joint influence of reproductive assurance and local mate competition in a metapopulation. *Evolutionary Ecology* 14:195-211.
- Parfitt, B. 1985. Dioecy in North American Cactaceae: a Review. *SIDA*. 11:200-206.
- Parker, J. 1990. Sex chromosomes and sexual differentiation in flowering plants. *Chromosomes Today* 10:187-198.
- Peirson, B., Bowling, S. y Makaroff, C. 1997. A defect in synapsis causes male sterility in a T-DNA-tagged *Arabidopsis thaliana* mutant. *Plant J* 4:659-69.
- Pendleton, R., Freeman, D., McArthur, E. y Sanderson, S. 2000. Gender specialization in heterodichogamous *Grayia brandegei* (Chenopodiaceae): evidence for an alternative pathway to dioecy. *American Journal of Botany* 87:508-516.



- Pinkava, D., Baker, M., Parfitt, B., Mohlenbrock, M. y Worthington, R. 1985. Chromosome number in some cacti of western North America. *Systematic Botany* 10:471-483.
- Pires, N., Pagliarini, M. y Alves de Almeida, L. 2002. An original mutation in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) involving degeneration of generative cell and causing male sterility. *Genome* 45:1257-1261.
- Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., y Davis, R. 1999. A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signalling during fertilization. *Genes Dev* 7:974-985.
- Rebman, J. 1998. A new cholla (Cactaceae) from Baja California, México. *Haseltonia* 6:17-21.
- Regan, S., y Moffatt, B. 1990. Cytochemical analyses of pollen development in wild-type *Arabidopsis* and a male-sterile mutant. *Plant Cell* 2:877-889.
- Renner, S. y Ricklefs, R. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany* 82: 596-606.
- Rhee, S. y Somerville, C. 1998. Tetrad pollen formation in quartet mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. *Plant J* 1:79-88.
- Rick, C. 1948. Genetics and development of nine male-sterile tomato mutants. *Hilgardia* 18, 599-633.
- Ross, R. 1982. Initiation of stamens, carpels and receptacle in the Cactaceae. *American Journal of Botany* 63: 369-379.
- Sakai, H., Krizet, B., Jacobsen, S. y Meyerowitz, E. 2000. Regulation of *SUP* expression identifies multiple regulators involved in *Arabidopsis* floral meristem development. *Plant Cell* 12:1607-1608.
- Sanders, P., Bui, A., Weterings, K., Hsu, Y., Lee, Y., Troung, M., Beals, T. y Goldberg R. 1999. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex Plant Reprod* 11:2997-2322.
- Sawhney, V. y Bhadula, S. 1988. Microsporogenesis in the normal and male-sterile stamenless mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Can J. Bot.* 66:2013-2021.
- Schiefthaler, U., Balasubramanian, S., Sieber, P., Chevalier, D., Wisman, E. y Schneitz, K. 1999. Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 13:2108-17.
- Schnable, P. y Wise R. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci* 3:175-180.
- Schommer, C., Beven, A., Lawrenson, T., Shaw, P. y Sablowski, R. 2003. *AHP2* is required for bivalent formation and for segregation of homologous chromosomes in *Arabidopsis* meiosis. *Plant J* 1:1-11.

- Sheppard, L., Brunner, A., Krutovskii, K., Rottman, W., Skinner, J., Vollmer, S. y Strauss, S. 2000. A *DEFICIENS* homolog from the dioecious tree black cottonwood is expressed in female and male floral meristems of the two-whorled, unisexual flowers. *Plant Physiology* 124:627-639.
- Sorensen, A., Krober, S., Unte, U., Huijser, P., Dekker, K. y Saedler, H. 2003. The *Arabidopsis* *ABORTED MICROSPORES* (AMS) gene encodes a MYC class transcription factor. *Plant J* 2:413-23.
- Steiner-Lange, S., Unte, U., Eckstein, L., Yang, C., Wilson, Z., Schmelzer, E., Dekker, K. y Saedler, H. 2003. Disruption of *Arabidopsis thaliana* *MYB26* results in male sterility due to non-dehiscent anthers. *Plant J* 4:519-28.
- Stevens, R., Grelon, M., Vezon, D., Oh, J., Meyer, P., Perennes, C., Domenichini, S. y Bergounioux, C. 2004. A *CDC45* homolog in *Arabidopsis* is essential for meiosis as shown by RNA interference-induced gene silencing. *Plant Cell* 16:99-113.
- Stintzi, A. y Browse, J. 2000. The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc Natl Acad Sci* 19:10625-30.
- Strittmatter, L., Negrón-Ortiz, N. y Hickey, R. 2002. Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): Breeding system and embryological studies. *Am J Bot* 89:1373-1387.
- Tan, K. 1980. Studies in the Thymelaeaceae II: a revision of the genus Thymelaea. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh* 38:189-246.
- Taylor, P., Glover, J., Lavithis, M., Craig, S., Singh, M., Knox, R., Dennis, E. y Chaudhury, A. 1998. Genetic control of male fertility in *Arabidopsis thaliana*: structural analyses of postmeiotic developmental mutants. *Planta* 4:492-505.
- Testolini, R., Cipriani, G. y Messina, R. 1999. Sex Control in *Actinidia* is monofactorial and remains so in polyploids, in: C. C. Ainsworth (Ed.), *Sex Determination in Plants*, Bios Scientific Publishers, Oxford, Washington, D. C. 173-181.
- Tiagi, Y. 1970. Cactaceae. En: B. R. Seshachar (ed.) *Proceedings of the Symposium on Comparative Embryology of Angiosperms*. *Indian National Science Academy Bulletin* 41:29-35.
- Valiente-Banuet, A., Rojas, A. Del Coro M. y Dávila P. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, Central Mexico. *American Journal of Botany* 84:452-455.
- Vaux, D. y Korsmeyer, S. 1999. Cell death in development. *Cell* 96:245-254.
- Venkata, T., Kaur, J., Agashe, B., Sundaresan, V. y Siddiqi, I. 2003. The *DUET* is necessary for chromosome organization and progression during male meiosis in *Arabidopsis* and encodes a PHD finger protein. *Develop* 130:5975-5987.

- von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K. y Keller, B. 2002. The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the *ALLENE OXIDE SYNTHASE* gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta*. 1:187-92.
- Vos, P., Hogers. R., Bleeker. M., Reijans. M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J. y Kuiper, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids Res* 23:4407-4414.
- Wilson, Z., Morroll, S., Dawson, J., Swarup, R. y Tighe, P. 2001. The *Arabidopsis* *MALE STERILITY1 (MS1)* gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *Plant J* 1:27-39.
- Wolf, D., Satkoski, J., White, K. y Reisenberg, L. 2001. Sex determination in the androdioecious plant *Datisca glomerata*, and its dioecious sister species, *D. cannabina*. *Genetics* 159:1243-1257.
- Worrall, D., Hird, D., Hodge, R., Paul, W., Draper, J. y Scott, R. 1992. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* 7:759-71.
- Wu, H., y Cheung, Y. 2000. Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology* 44:267-281.
- Xu, H., Knox, R., Taylor, P. y Singh, M. 1995. *Bcp1*, a gene required for male fertility in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6:2106-10.
- Yang, S., Xie, L. y Mao, H. 2003. *TAPETUM DETERMINANT1* is required for cell specialization in the *Arabidopsis* anther. *Plant Cell* 15:2792-2804.
- Yang, W., Ye, D., Xu, J. y Sundaresan, V. 1999. The *SPOROCTELESS* gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev.* 13:2108-17.
- Yang, X., Makaroff, C. y Ma, H. 2003. The *Arabidopsis* *MALE MEIOCYTE DEATH1* gene encodes a PHD-finger protein that is required for male meiosis. *Plant Cell*. 6:1281-95.
- Zhang, Y., DiStilio, V., Rehman, F., Avery, F., Mulcahy, D. y Kesseli, R. 1998. Y chromosome specific markers and the evolution of dioecy in the genus *Silene*. *Génome* 41:141-147.
- Zhao, D., Wang, G., Speal, B. y Ma, H. 2002. The *EXCESS MICROSPOROCTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev* 15:2021-31.

## APÉNDICE I

Esta información contiene una muestra representativa de los genes involucrados en esterilidad masculina en angiospermas, la búsqueda de bibliografía fue realizada hasta 2004.

### MUTANTES QUE AFECTAN ESTADOS PREMEIÓTICOS

| Especie                        | Mutante                    | Fenotipo   | Autores  |
|--------------------------------|----------------------------|--|--|
| <i>Arabidopsis</i>             | <i>pi</i> y <i>ap-3</i>    | Reemplazan a los pétalos y estambres por sépalos y carpelos.   | Bouwman <i>et al.</i> , 1989                                   |
| <i>Zea mays</i>                | <i>antherless (at)</i>     | Tiene filamentos normales pero carece de anteras.  | Kaul, 1988   |
| <i>Zea mays</i>                | <i>dwarf (d2, d3 y d5)</i> | Mutantes deficientes en giberilinas que no desarrollan tejido esporógeno.  | Kaul, 1988   |
| <i>Zea mays</i>                | <i>an1</i> y <i>an2</i>    | Se desarrollan anteras normales que no poseen polen.   | Kaul, 1988   |
| <i>Rumex acetosa</i>           | <i>rap1</i>                | Se expresa en carpelos y estambres, la falta de este en alguno de éstos órganos, puede ser la causa del arresto en su desarrollo.                | Ainsworth <i>et al.</i> , 1995                                 |
| <i>Arabidopsis</i>             | <i>gai</i>                 | Su expresión en polen y anteras resulta en la degeneración de estos tejidos.   | Huang <i>et al.</i> , 2003                                     |
| algodón                        | <i>ms4</i>                 | Se diferencian los estambres pero las anteras están mal formadas.  | Allison y Fisher, 1964   |
| Tomate                         | <i>ms3, ms5 y ms29</i>     | La meiosis no ocurre, se degenera la célula madre de las microsporas.  | Rick, 1948; en Chaudhury, 1993                                 |
| <i>Arabidopsis</i>             | <i>at</i>                  | Se encuentran filamentos sin anteras o convertidos en sépalos.   | Chaudhury, 1992  |
| tomate                         | <i>stamenless-2</i>        | Estambres cortos y descoloridos. Las microsporas no funcionales se restauran con <i>GAS</i> .  | Sawhney y Bhadula, 1988 en Chaudhury, 1993                     |
| <i>Arabidopsis</i>             | <i>ckx1</i>                | Su acumulación en tejidos reproductivos provoca esterilidad masculina  | Huang <i>et al.</i> , 2003                                     |
| <i>Liquidambar styraciflua</i> | <i>agamous</i>             | Su baja expresión está relacionada con el arresto del crecimiento de los estambres por muerte celular.   | Liu <i>et al.</i> , 1999                                       |
| <i>Arabidopsis</i>             | <i>spl/nzz</i>             | Factor de transcripción requerido para la iniciación de la esporogénesis. Expresado durante la micro y megasporogenesis. Carecen de esporocitos. | Schiefthaler <i>et al.</i> , 1999<br>Yang <i>et al.</i> , 1999 |

## MUTANTES QUE AFECTAN LA MEIOSIS

| Especie            | Mutante                | Fenotipo   | Autores  |
|--------------------|------------------------|--|--|
| <i>Arabidopsis</i> | <i>ms5</i>             | Al final de la meiosis II de las células madres de las microsporas se lleva acabo una tercera división sin la previa replicación de DNA, originando 8 microsporas con contenido variable de DNA. | Glover <i>et al.</i> , 1998<br>Ross <i>et al.</i> , 1997 en Caryl <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>pollenless 3</i>    | Relacionado en la meiosis masculina  | Sanders <i>et al.</i> , 1999   |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>ask1 (skp1)</i>     | Altera la correcta separación de los cromosomas en la meiosis masculina  | Yang <i>et al.</i> , 1999  |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>atdmc1</i>          | Involucrado en la formación estabilización bivalente durante la meiosis en meiocitos masculinos y femeninos.   | Couteau <i>et al.</i> , 1999<br>Klimyuk y Jones, 1997                                  |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>mmd1</i>            | Después de la diacinesis los meiocitos presentan defectos en los cromosomas, citoplasma colapsado, fragmentación de la cromatina, muerte celular antes de la citocinesis.                        | Yang <i>et al.</i> , 2003  |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>duet</i>            | Carece de polen. Aberrante meiosis. En ocasiones se producen 2 células en lugar de 4 pero degeneran. Los defectos en la organización de los cromosomas comienzan en el diploteno.                | Venkata <i>et al.</i> , 2003   |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>swi1</i>            | Involucrada en el establecimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas   | Mercier <i>et al.</i> , 2003   |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>swi2</i>            | Carece de formación bivalente de cromátidas durante la metafase  | Mercier <i>et al.</i> , 2003   |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>ahp21</i>           | Es requerido para la formación bivalente en profase I. Segregación de los cromosomas homólogos desbalanceada en anafase I y II.  | Schommer <i>et al.</i> , 2003  |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>mei1 (mcd1)</i>     | Fragmentación de los cromosomas durante la meiosis.  | Grelon <i>et al.</i> , 2003  |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>syn1</i>            | Se altera la meiosis interviniendo en la cohesión errónea de las cromátidas hermanas.  | Bai <i>et al.</i> , 1999   |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>rad21-like gene</i> | Formación de "tétradas" con 8 microsporas anormales con diferente contenido de DNA.  | Peirson <i>et al.</i> , 1996, 1997   |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>atspoll-1</i>       | Se forman pocas bivalentes durante la meiosis de las flores. Existe la formación de "poliadas" con variable contenido de DNA.  | Grelon <i>et al.</i> , 2001  |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>ms1, ms7, ms8</i>   | Se forman tétradas aberrantes y se liberan.  | Chaudhury, 1992  |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>msw y msy</i>       | Presenta alteraciones durante la meiosis.  | Dawson <i>et al.</i> , 1993  |

|                     |                            |  |                               |
|---------------------|----------------------------|--|-------------------------------|
| <i>Arabidopsis</i>  | <i>ms3, ms4, ms5, ms15</i> | Las células arquesporales son normales pero las tétradas son aberrantes.   | Chaudhury, 1992               |
| <i>Zea mays</i>     | <i>ms8</i>                 | Las anomalías ocurren durante el leptoteno, las células madres de las microsporas son más pequeñas y sus márgenes poco delineados. Las microsporas liberadas tienen forma irregular y degeneran. | Alberts and Phillips, 1981    |
| <i>Zea mays</i>     | <i>ms9</i>                 | Se generan células madres de las microsporas más pequeñas que en el tipo silvestre. Las divisiones mitóticas del grano de polen no ocurren.  | Alberts and Phillips, 1981    |
| <i>Zea mays</i>     | <i>ms17</i>                | Tiene exceso de microtúbulos por lo que se genera un huso meiótico anormal, con la consecuente impropia segregación de la cromatina.   | Alberts and Phillips, 1981    |
| <i>Glycine max</i>  | <i>st</i>                  | Afecta procesos sinápticos impidiendo el correcto apareamiento de los cromosomas en profase I  | Palmer y Horner, 2000         |
| <i>Arabidopsis</i>  | <i>dif1</i>                | Cromosomas univalentes y fragmentación de cromosomas en metafase I. Segregación afectada.  | Bhatt <i>et al.</i> , 1999    |
| <i>Arabidopsis</i>  | <i>scp</i>                 | Se generan aberrantes divisiones meióticas durante el desarrollo del polen que puede ser abortado o con un solo núcleo vegetativo o con núcleos pero sin pared celular.                          | Chen y Mc Comick, 1996        |
| <i>Oriza sativa</i> | <i>mspl</i>                | Número excesivo de esporocitos femeninos y masculinos, capas de la pared de la antera en desorden, el tapete no se forma. Se arresta la meiosis en Profase I.                                    | Nonomura <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Arabidopsis</i>  | <i>atcdc45</i>             | Segregación anormal de los cromosomas. Deficiente desarrollo de polen y óvulos.  | Stevens <i>et al.</i> , 2004  |
| <i>Arabidopsis</i>  | <i>tam</i>                 | Asincrónica división celular durante la meiosis, formando diadas las células entran a metafase en diferentes tiempos.  | Magnard <i>et al.</i> , 2001  |
| <i>Arabidopsis</i>  | <i>sds</i>                 | Defectos en la sinapsis, recombinación y formación de bivalentes en la profase I. Productos meióticos anormales.   | Azumi <i>et al.</i> , 2002    |

## MUTACIONES QUE AFECTAN LA MADURACIÓN DEL GRANO DE POLEN

| Especie                 | Mutante                | Fenotipo   | Autores  |
|-------------------------|------------------------|--|--|
| <i>Arabidopsis</i>      | <i>qrt</i>             | Se forman microsporas que no se separan aunque se degrade la calosa por falta de degradación de la pectina.  | Rhee y Somerville, 1998                                  |
| <i>Arabidopsis</i>      | <i>ms1</i>             | Degeneración del polen después de la liberación de microsporas (desarrollan citoplasma granular y vacuolado). El tapete en esta etapa se vacuoliza anormalmente. | Wilson <i>et al.</i> , 2001                              |
| <i>Nicotiana tabaco</i> | <i>atp9</i>            | Promueve que el polen se aborte.   | Hernould <i>et al.</i> , 1993                            |
| <i>Nicotiana tabaco</i> | <i>orf239</i>          | Causa la destrucción del grano de polen.   | He <i>et al.</i> , 1996                                  |
| <i>Zea mays</i>         | <i>ms2 y ms7</i>       | En las tétradas los cromosomas se condensan anormalmente con una pared celular muy delgada.  | Albertsen y Phillips, 1981                               |
| <i>Zea mays</i>         | <i>ms11</i>            | El núcleo y el citoplasma se degradan y sólo queda la pared de la microspora normal.   | Albertsen y Phillips, 1981                               |
| <i>Zea mays</i>         | <i>ms10 y ms13</i>     | La pared de las microsporas se engruesa anormalmente.  | Albertsen y Phillips, 1981                               |
| <i>Zea mays</i>         | <i>ms6 o po</i>        | La mitosis del grano de polen ocurre en estado de tétrada.   | Kaul, 1988   |
| <i>Zea mays</i>         | <i>ms5, ms11, ms14</i> | Se detiene el desarrollo de la microspora.   | Albertsen y Phillips, 1981                               |
| <i>Arabidopsis</i>      | <i>apt</i>             | Después de la liberación de las microsporas se aborta el polen.  | Regan y Moffatt, 1990                                    |
| <i>Zea mays</i>         | <i>ms45</i>            | las microsporas se desarrollan pero los granos de polen ausentes   | Cigan <i>et al.</i> , 2001                               |
| <i>Arabidopsis</i>      | <i>ms2</i>             | Se aborta el polen joven, además el tapete es defectuoso.  | Aarts <i>et al.</i> , 1993                               |
| <i>Glycine max</i>      | <i>ms-?</i>            | La segunda mitosis del polen no ocurre, la célula generatriz degenera.   | Pires <i>et al.</i> , 2002                               |
| <i>Arabidopsis</i>      | <i>opr3</i>            | Involucrado en la elongación de los filamentos de las anteras, la apertura del estomio y la producción de polen viable.  | Stintzi y Browse, 2000                                   |
| Tomate                  | <i>lat52</i>           | Controla la fertilidad a nivel gametofítico.   | Hamilton <i>et al.</i> , 1990 en Xu <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Arabidopsis</i>      | <i>ms1</i>             | Las microsporas se separan y su posterior desarrollo es anormal. La microspora y el tapete se vacuolizan gradualmente.   | Ito y Shinozak, 2002                                     |

#### MUTACIONES QUE AFECTAN LA PARED DEL GRANO DE POLEN

| Especie                 | Mutante     | Fenotipo   | Autores                      |
|-------------------------|-------------|--|------------------------------|
| <i>Arabidopsis</i>      | <i>pop1</i> | Interrumpe la interacción polen-pistilo eliminando la formación de la cubierta extracelular del polen (trifina).                 | Preuss <i>et al.</i> , 1999  |
| <i>Arabidopsis</i>      | <i>ms9</i>  | Una vez que se separan las microsporas carece exina.   | Taylor <i>et al.</i> , 1998  |
| <i>Arabidopsis</i>      | <i>ms12</i> | La microspora carece de normal ornamentación de la exina.  | Taylor <i>et al.</i> , 1998  |
| <i>Arabidopsis</i>      | <i>ms8</i>  | El desarrollo de la intina se ve alterado y el polen se rompe previo a la madurez.   | Taylor <i>et al.</i> , 1998  |
| <i>Zea mays</i>         | <i>ms45</i> | Se expresa en el tapete y genera ausencia de polen debido a que la pared celular del gametofito de forma escasamente.            | Cigan <i>et al.</i> , 2001   |
| <i>Nicotiana tabaco</i> | ----        | Se expresa la glucanasa a destiempo y por lo tanto se degrada la calosa prematuramente, generando microsporas con pared anormal. | Worrall <i>et al.</i> , 1992 |

#### MUTACIONES QUE AFECTAN AL TAPETE

| Especie            | Mutante            | Fenotipo  | Autores                       |
|--------------------|--------------------|---|-------------------------------|
| <i>Arabidopsis</i> | <i>ms7</i>         | El citoplasma del tapete se desintegra y aparentemente causa la degeneración de microsporas y granos de polen.  | Taylor <i>et al.</i> , 1998   |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>ms11</i>        | Se degrada el DNA del tapete y de las microsporas.  | Taylor <i>et al.</i> , 1998   |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>bcp1</i>        | El tapete y las microsporas carecen de citoplasma en la madurez.  | Xu <i>et al.</i> , 1995       |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>ems1</i>        | Produce exceso de microsporocitos y carece de células de tapete, mantiene las células de la capa media. En la formación de las tétradas no ocurre la citocinesis. | Zhao <i>et al.</i> , 2002     |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>ams</i>         | Prematura degradación del tapete y microsporas. Reducida elongación de los filamentos.  | Sorensen <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>ms9 y ms15</i>  | El tapete degenera prematuramente.  | Taylor <i>et al.</i> , 1998   |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>fat tapetum</i> | Tapete y capa media crecen más allá de su tamaño normal colapsando los productos meióticos.   | Sanders <i>et al.</i> , 1999  |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>tpd1</i>        | Células precursoras del tapete se desarrollan como microsporas.   | Yang <i>et al.</i> , 2003     |



## DEHISCENCIA

| Especie            | Mutante                   | Fenotipo   | Autores                             |
|--------------------|---------------------------|--|-------------------------------------|
| <i>Arabidopsis</i> | <i>msh o ms35</i>         | Granos de polen funcionales no se liberan aunque hay estomio debido a la falta de engrosamientos de paredes secundarias en el endotecio.   | Dawson <i>et al.</i> , 1993         |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>ps</i>                 | Carece de dehiscencia  | Larsen and Paur, en Chaudhury, 1993 |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>fad3-2 fad7-2 fad8</i> | Los filamentos no se elongan lo suficiente, los lóculos de la antera no tienen dehiscencia en el tiempo adecuado. Los granos de polen son trinucleados pero inviables.                                       | McConn y Browse, 1996               |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>dde2-2</i>             | Deficiente en la dehiscencia y elongación del filamento  | Von Malek <i>et al.</i> , 2002      |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>atmyb26</i>            | Polen viable pero no hay dehiscencia.  | Steiner-Lange <i>et al.</i> , 2003  |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>non-dehiscense 1</i>   | Poca elongación de los filamentos, las anteras entran al programa de dehiscencia (expansión del endotecio y degeneración de la región del septo), sin embargo, el endotecio y el tejido conectivo degeneran. | Sanders <i>et al.</i> , 1999        |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>por1</i>               | No hay dehiscencia y además los granos de polen no son funcionales.  | Park <i>et al.</i> , 1996           |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>dad1</i>               | Alteraciones en la dehiscencia   | Ishiguro <i>et al.</i> , 2001       |

## MUTACIONES QUE EN LA INTERACCIÓN POLEN ESTIGMA

| Especie               | Mutante                          | Fenotipo   | Autores                     |
|-----------------------|----------------------------------|--|-----------------------------|
| <i>Arabidopsis</i>    | <i>ms1b</i>                      | El polen normal es liberado de la antera pero se afecta la interacción con el estigma                                    | Taylor <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Arabidopsis</i>    | "deficiente en tryphine"         | Se daña la germinación del grano de polen y se forma calosa en las células del estigma que tienen contacto con el polen. | Preuss <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Petunia y maíz</i> | "deficiente en chalcona sintasa" | No se produce germinación del tubo polínico.   | Taylor and Jorgensen, 1992  |

## **APÉNDICE II**

### **PBS 1X**

|         |  |
|---------|--|
| 137 mM  | NaCl   |
| 1,47 mM | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      |
| 8,09 mM | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O |
| 68 mM   | KCl  |

## **APÉNDICE III**

### **Working strength TdT enzyme**

77 µl Buffer de reacción

33 µl Enzima TdT

### **Working strength stop/wash buffer**

1 ml Stop/wash buffer

34 ml Agua destilada

### **Working strength fluorescein**

68 µl Solución de bloqueo

62 µl Anti-Dioxigenina conjugada

### **Medio de montaje**

0.5 µg DAPI

1 ml Propilgalato con glicerina

## **APÉNDICE IV**

### Purificación de RNA mensajero

Se realizó una técnica de extracción de RNA total específica para las anteras la cual consistió en:

- 1) La maceración de 1 gramo de anteras de *Opuntia stenopetala*, que se encontraban a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta la obtención de un polvo fino.
- 2) El polvo se colocó en un tubo de 40 ml que contenía 15 ml de buffer de extracción y se añadieron 15 ml de fenol/cloroformo/isoamílico (PCI) más 0.2 g de CTAB (vortex).
- 3) Se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos a  $15^{\circ}\text{C}$ .
- 4) Se recuperó el sobrenadante y se colocó en otro tubo con 15 ml de PCI (vortex).
- 5) Se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos a  $15^{\circ}\text{C}$ .
- 6) Se recuperó el sobrenadante y se colocó en otro tubo con 5 ml de Agua dietil-pirocarbonatada ( $\text{H}_2\text{O}$  DEPC) más 10 ml de cloroformo (vortex).
- 7) Se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos a  $15^{\circ}\text{C}$ .
- 8) Los pasos 6 y 7 se repitieron otras dos veces.
- 9) El sobrenadante se pasó a un tubo con 1ml de acetato de amonio y se agregó un volumen de isopropanol.
- 10) Las hebras de ácidos nucleicos que se forman se recuperaron rápidamente y se resuspendieron en 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC.

### **Gel de agarosa 2% (RNA)**

3% Formaldehído

10% MAE 10X

2% Agarosa

+ Agua DEPC

**10X MAE**

0.2 M MOPS

50mM NAOAc

10mM EDTA

pH 6.5

**Buffer de carga**

2.2 ml Formamida

0.8 ml Formaldehído

0.5 ml MAE 10X

0.4 ml glicerol (80%)

una pizca de bromofenol

+ Agua DEPC hasta 4 ml

almacenar a -20 °C

## APÉNDICE V

### Cadena sencilla

Para obtener cDNA a partir de RNA se tomaron 16  $\mu$ l de RNA, 1  $\mu$ l de primer (1 $\mu$ g/ $\mu$ l oligo d[t] 2-18) y 7  $\mu$ l de agua (DEPC), se calentó la mezcla a 70°C por 10 minutos, se enfrió, se centrifugó levemente y se le adicionaron 8  $\mu$ l de buffer para cadena sencilla 5X, más 4  $\mu$ l de DTT 0.1M y 2  $\mu$ l de dNTPs 10mM. Se incubó la reacción por 2 minutos a 42 °C y posteriormente se le agregó 1  $\mu$ l de transcriptasa reversa (200U/ $\mu$ l, GIBCO). Se incubó por 1 hora a 42°C.

### Cadena doble

Pasada la hora se colocó el tubo en hielo y se le adicionaron 15  $\mu$ l de buffer de cDNA 10X, 3.5  $\mu$ l de DNA polimerasa I, 1.5  $\mu$ l de Rnasa H, 1 $\mu$ l de dNTPs 25 mM y 89  $\mu$ l de agua bidestilada. La mezcla se incubó por 2 horas a 16°C. Se le agregaron 5  $\mu$ l de glicógeno y se realizó una extracción con fenol cloroformo.

#### Buffer de cDNA cadena doble (10X)

350 mM Tris-HCl pH 7.4

40 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>

30 mM DTT

### Digestión/ligamiento

A 1  $\mu$ g de cDNA se adicionaron 8  $\mu$ l del buffer de digestión/ligamiento 0.5  $\mu$ l de la enzima EcoR1 (10U), 1  $\mu$ l de la enzima MseI (5U) y 25.5  $\mu$ l de agua desionizada, para obtener un volumen final de 40  $\mu$ l. La digestión se llevó a cabo por 3 horas a 37° C. Pasado este tiempo, a cada muestra se agregó 1  $\mu$ l del adaptador para EcoR1 (5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'), 1  $\mu$ l del adaptador para MseI (5' GACGATGAGTCCTGAG 3'), 2  $\mu$ l de ATP (10mM), 4  $\mu$ l del buffer de digestión/ligamiento, 1 unidad de T4 DNA-ligasa y 1  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O; se obtuvo un volumen final de 50  $\mu$ l. La reacción de ligado se llevó a cabo toda la noche a 37° C.

## APÉNDICE VI

### Preamplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para evaluar la eficiencia de ligado de los adaptadores al DNA digerido, se tomaron 5  $\mu$ l del DNA quimérico (digerido y ligado) y se agregaron 0.5  $\mu$ l del primer EcoR1 Core + adaptador (5'CTCGTAGACTGCGTACCAATTC 3') (50 ng), 0.5  $\mu$ l de MseI Core + adaptador (5' GACGATGAGTCCTGAGTAA 3') (50 ng), 0.8  $\mu$ l de dNTP's (5 mM), 2  $\mu$ l del buffer de PCR 10x (apéndice III), 0.6  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.4  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa (1U) y 10.2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O; se obtuvo un volumen final de 20  $\mu$ l.

Las condiciones de preamplificación fueron las siguientes:

90° C 2 minutos ---- 1 ciclo  
94° C 30 segundos }  
56° C 1.0 minuto } 30 ciclos  
72° C 1 minuto }  
72° C 2 minutos

Se separaron electroforéticamente 10  $\mu$ l del producto de PCR un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (10mg/ml) a 100 volts durante 1 hora. El producto de la reacción de PCR se diluyó 5 veces (1:5).

## APÉNDICE VII

### Gel de agarosa al 1.2% (DNA)

0.6 g Agarosa  
30 ml TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X  
1.5  $\mu$ l Bromuro de Etidio (0.2 g de bromuro de etidio en 20 ml de agua)

### TBE

53.9 g Tris base  
27.5 g Ácido bórico  
20 ml EDTA 0.5 M pH 8.0

## APÉNDICE VIII

### PCR-AFLP

Se tomaron 5  $\mu$ l del cDNA diluido (1:5) del paso anterior y se le adicionaron 0.25  $\mu$ l del primer EcoR1-AFLPx (50 ng) marcado con el radioisótopo  $^{33}\text{P}$ , 0.30  $\mu$ l del primer Msel-AFLPz (50 ng) no marcado, 0.4  $\mu$ l de dNTP's, 1.0  $\mu$ l de buffer de PCR 10x, 0.3  $\mu$ l de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0.3 unidades de Taq DNA polimerasa (1 U) y 2.45  $\mu$ l de  $\text{dH}_2\text{O}$  con lo que se obtuvo un volumen final de 10  $\mu$ l. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

|                   |   |  |
|-------------------|---|--|
| 94° C 2 minutos   | } | 12 ciclos reduciendo la temperatura de alineamiento 0.7° C por ciclo |
| 94° C 30 segundos |   |  |
| 65° C 30 segundos |   |  |
| 72° C 1 minuto    | } | 25 ciclos  |
| 94° C 30 segundos |   |  |
| 56° C 30 segundos |   |  |
| 72° C 1 minuto    |   |  |
| 72° C 2 minutos   |   |  |

## APÉNDICE IX

### Acrilamida 5% (500ml)

|   |               |
|---|---------------|
| 23.75 g                                   | Acrilamida    |
| 1.25 g                                    | Bisacrilamida |
| 225 g                                     | Urea 7.5 M    |
| 50ml                                      | TBE 10X       |
| Aforar con $\text{H}_2\text{O}$ destilada |               |

## **APÉNDICE X**

### **Medio LB**

10 g/l triptona

5 g/l extracto de levadura

5 g/l de ClNa

### **Digestión de plásmidos**

10.0  $\mu$ l DNA plásmido

2.0  $\mu$ l amortiguador 10X

0.15  $\mu$ l Eco RI (1U/ $\mu$ l)

7.85  $\mu$ l Agua