

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**Instituto de Biología**

**Estrategias para el análisis  
molecular de semillas y embriones  
somáticos de diferentes especies de  
cícadas en peligro de extinción.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**PRESENTA**

**JULIO CÉSAR FLORES SÁNCHEZ**

**DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ AVILA**

**MEXICO D.F.**

**FEBRERO, 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## CON AGRADECIMIENTO

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias por el apoyo que se me dio para realizar ésta investigación.

A CONACYT y DGEP por las becas otorgadas.

A los miembros del Comité Tutoral y miembros del Jurado:

Dr. Víctor Manuel Chávez Avila Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM.

Dr. Mario Rocha Sosa Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dra. María del Rocío Cruz Ortega Laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología, UNAM.

Dr. Ángel Salvador Arias Montes Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM.

M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres

Hipólito Miguel Flores Juárez

Elia Sánchez Varela

A mi hermano

Miguel Ángel Flores Sánchez

A mis compañeros y amigos de los Institutos donde realicé esta investigación, en especial a Edgar Baldemar Sepulveda García por todo el apoyo, consejos y amistad que me brindó durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología.

A Elda Patricia Rueda Benítez del Instituto de Biotecnología por su apoyo y amistad.

A Allan Chavarría Sánchez por su amistad y apoyo.

## ÍNDICE

• Abreviaturas	2
• Resumen	3
• Summary	4
• Introducción	5
• Antecedentes	7
○ Características de las Cícadas	7
○ Clasificación taxonómica	10
○ Distribución	12
○ Estado de conservación	15
○ Usos	19
○ Cultivo de tejidos en cícadas	21
○ Desarrollo del embrión somático y cigótico en cícadas	22
○ Estudios de biología molecular y bioquímica en cícadas	26
• Justificación	28
• Objetivos	30
• Materiales y métodos	31
○ Differential display	31
○ Genoteca	35
• Resultados	37
• Discusión	54
• Conclusiones	63
• Apéndice I	64
• Apéndice II	71
• Apéndice III	77
• Apéndice IV	81
• Apéndice V	82
• Bibliografía	83

**ABREVIATURAS**

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
AFLP	Amplified fragment length polymorphism PCR
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
EST's	Expressed Sequence Tags
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

## RESUMEN

### **Estrategias para el análisis molecular de semillas y embriones somáticos de diferentes especies de cícadadas en peligro de extinción.**

En el presente estudio se logró establecer un protocolo de extracción de RNA de embriones somáticos de *Ceratozamia euryphyllidia* y *Zamia pumila* así como de embriones cigóticos de *C. euryphyllidia* utilizando un buffer de extracción que contiene 1% TNS, 6% PAS, 100mM Tris pH 7.6, 50mM EGTA, 1% SDS y 50mM  $\beta$ - mercaptoetanol. A partir del RNA extraído de *Z. pumila* se realizó RT-PCR utilizando 7 diferentes combinaciones de oligonucleótidos para crear una genoteca de cDNA. Antes de ser clonado el cDNA fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa 1% del cual se cortaron y purificaron las bandas que se encontraban en un rango de 500-2000 pb. Estos fragmentos de cDNA fueron clonados en el vector pGEM, posteriormente se transformaron cepas de *E. coli* con dicho vector. Se sembraron las bacterias en cajas petri que contenían medio LB adicionado con ampicilina, X-gal e IPTG, se seleccionaron las cepas que fueron transformadas con el vector que contenía cDNA. Se purificó el plásmido de 5 colonias seleccionadas al azar para secuenciar el fragmento de cDNA contenido en él. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa BLAST lo que dio como resultado que éstas tenían una alta similitud con la secuencia del gen que codifica para rRNA 26S de *Zamia integrifolia*. Estos resultados a partir de embriones somáticos de cícadadas son los primeros a nivel global que se han reportado, ya que las secuencias parciales que se han obtenido de las cícadadas provienen de DNA extraído de hojas y solo existe un reporte sobre la extracción de RNA también obtenido de hojas. Por lo que el presente estudio puede ser tomado como el pionero de los estudios moleculares sobre la embriogénesis somática de las cícadadas y que está encaminado a comprender dicho proceso para su posterior aplicación en la conservación y comercialización de este grupo de plantas.

## SUMMARY

### **Strategies used in the molecular analysis of seeds and somatic embryos from different species of endangered cycads.**

Total RNA was extracted from somatic embryos of *Ceratozamia euryphyllidia* and *Zamia pumila* and zygotic embryos of *C. euryphyllidia* using a buffer that contains 1% TNS, 6% PAS, 100 mM Tris pH 7.6, 50mM EGTA, 1% SDS and 50mM  $\beta$ - mercaptoetanol. The RNA extracted from somatic embryos was used to construct a cDNA library using 7 different nucleotide combinations. Before cloning cDNA was size fractionated by electrophoresis over an agarose 1% gel. Fragments ranging from 500-2000bp were purified and then cloned into the plasmid pGEM, this vector was used to transform *E. coli* strains. The bacteria were grown on Petri dishes that contain LB media added with ampicillin, X-gal and IPTG in order to select the strains that were transformed with the plasmids that contains cDNA cloned. Five strains were randomly selected to purify the plasmid in order to sequence the cDNA fragment contained within the vector. A BLAST analysis was performed using the sequences obtained giving as results a high degree of similitude with *Zamia integrifolia* 26S rRNA gen. These results are the first obtained from somatic embryos of cycads since the partial sequences reported in the Gene Bank were obtained from DNA extracted from leaves and there is only one report of RNA extraction to obtain partial sequences which was done from immature leaves. Therefore, we can consider this to be a pioneer molecular study regarding somatic embryogenesis of cicadas aimed to understand this process for further conservation and commercial applications of these plants.



## INTRODUCCIÓN

Los bosques tropicales son muy importantes y aunque sólo cubren alrededor del 7% de la superficie terrestre, albergan cerca del 50% de las especies del mundo (Whitmore, 1990). Este ecosistema es el más rico en diversidad biológica, el más complejo, pero también el más frágil en cuanto al mantenimiento de su equilibrio entre las poblaciones y comunidades que la integran (Chávez, 1993).

México tiene una gran importancia a nivel mundial en términos de biodiversidad, por su variedad de tipos de vegetación asociados a su topografía y posee un alto número de especies endémicas (Ramamoorthy *et al.*, 1993). La flora vascular de México está representada por cerca de 20,000 especies, 9,300 de ellas endémicas del país (Rzedowski, 1991, 1996) por ejemplo cactáceas, orquídeas, asteráceas y cícadaceas; muchas de ellas habitan en las regiones tropicales entre las que se encuentran más de la mitad de las especies de cícadas que existen en nuestro país (Chávez, 1993).

México es un país considerado megadiverso (Mittermeir y Mittermeir, 1992; Rzedowski, 1991, 1993; Ramamoorthy *et al.*, 1993), debido a que, además de ser una zona de transición o convergencia entre flora y fauna neártica y neotropical (Halffter, 1987), tiene una larga y compleja historia de aislamiento en algunas regiones, lo que ha favorecido la evolución de un gran número de especies endémicas (WCMC, 1992 citado por Soberón y Llorente, 1993).

Sin embargo, en México, los bosques, selvas y demás ambientes naturales han sido destruidos en más de un 50% en los últimos 50 años. En 1995 (World Bank) se estimaba una tasa de deforestación de 230,000 hectáreas anuales. Los bosques tropicales de México ocupan una pequeña parte del territorio pero se calcula que son los ecosistemas más devastados del país. Masera *et al.* (1997) estimaron que se perdía anualmente alrededor del 2% de los bosques tropicales, para el año de 2002 (Mas *et al.*) reportaron tasas anuales de deforestación del 0.27% para bosques templados y 0.76% para bosques tropicales, aunque aparentemente la tasa de deforestación ha bajado, sigue siendo una amenaza para estas regiones del país.

Por desgracia las alteraciones y la pérdida del equilibrio en la naturaleza están ocurriendo a una gran velocidad, que rebasa la capacidad de los

sistemas biológicos para restablecer su orden natural. En forma lamentable son las distintas actividades del hombre las que han puesto en serio peligro de extinción, prácticamente a todas las formas de vida del planeta (Ehrlich y Wilson, 1991).

Entre las especies en mayor peligro de desaparecer, en poco tiempo, de sus hábitats, debido sobre todo a la destrucción de éstos y en algunos casos a la sobrecolecta se encuentran las cícadas, uno de los grupos de gimnospermas más antiguos que existe (Vovides, 2000).

En nuestro país habitan aproximadamente el 20% de las especies de cícadas del mundo, más del 80% de éstas son endémicas. Las cícadas comprenden pocas especies y son consideradas como basales en el árbol evolutivo de las plantas con semilla dado que conservan caracteres ancestrales (Vovides, 2000) por lo que son consideradas fósiles vivientes.

Características como el hecho de que la anatomía de la semilla de las cícadas es muy similar a la de las semillas fósiles de los helechos (Vovides, 2000) hacen que este grupo de plantas sea muy importante para realizar estudios acerca de la evolución y taxonomía de las plantas con semilla.

Con el advenimiento y avance de la biología molecular los estudios sobre taxonomía, ecología, filogenia y evolución de las cícadas incorporado estas técnicas en sus investigaciones (González-Astorga *et al.*, 2003; González-Astorga *et al.*, 2006; Kokubugata *et al.*, 2004; Brenner *et al.*, 2003).

Desafortunadamente muchas de las especies de cícadas se encuentran en peligro de extinción, entre ellas *Ceratozamia euryphyllidia*, *Ceratozamia mexicana*, *Zamia fischeri* y *Zamia pumila*, por lo que es urgente que se realicen investigaciones encaminadas a comprender la biología de este grupo de plantas y así poder proponer acciones que ayuden a salvarlas de la extinción.

## ANTECEDENTES

### Características de las cícadas

Las cícadas usualmente son denominadas “fósiles vivientes”, lo que implica que han cambiado muy poco a lo largo de millones de años, este antiguo grupo de gimnospermas ha sobrevivido por cerca de 300 millones de años (Brenner *et al.*, 2003). Junto con *Gingko* se consideran las plantas vivientes con semilla más antiguas que se conocen (Arnold, 1953).

El registro fósil de este grupo se extiende desde principios del periodo Pérmico alrededor de 280 millones de años (Zhifeng y Thomas, 1989), y posiblemente al periodo tardío del Carbonífero entre 300-325 millones de años (Norstog y Nicholls, 1997) e incluso 345 millones de años (Mamay, 1976). Formaban una importante parte de la vegetación del planeta durante la Era Mesozoica (hace 160 millones de años) (Vovides, 2000).

Las cícadas, son plantas poco leñosas o arborescentes, de tallos gruesos, tuberosos y la mayoría parcial o completamente subterráneos como *Zamia pumila* subsp. *pygmaea* (Sims) Eckenwalder cuyo tallo subterráneo alcanza 25cm de longitud; o bien con tallos columnares generalmente no ramificados, con una corona terminal de hojas que tienen una apariencia semejante a las palmas, como la especie australiana *Lepidozamia hopei* Regel alcanza hasta 18m de altura (Chávez, 1993).

Pueden llegar a edades muy avanzadas (500-1000 años o más); son de muy lento crecimiento, por ejemplo, a individuos de *Dioon edule* Lindley de unos 2 m de altura se les calcula una edad de más de 2000 años (Vovides y Peters, 1987; Vovides com pers. citado por Chávez, 1993). Presentan hojas pinnadas alternas que forman una espiral en forma de corona en el ápice del tronco, las hojas son persistentes (3-10 años), en algunas especies las hojas alcanzan hasta 3 m de longitud como en *Encephalartos villosus* Lem., al caer permanecen las bases que brindan soporte estructural al tronco el cual está reforzado internamente por una compleja serie de trazas foliares. El crecimiento secundario es escaso en comparación con otras gimnospermas y plantas leñosas en general. Aún cuando en algunos taxa están presentes zonas definidas de crecimiento concéntrico éstas no constituyen incrementos estacionales y no se encuentran los típicos anillos de crecimiento de las plantas leñosas (Chávez, 1993).

Las cícadas comparten una serie de características (CITES, 2003):

- Son de crecimiento lento.
- Tienen una corteza rica en almidón, lo que las hace vulnerables a ataques por hongos. Esta característica provoca que la sobrevivencia sea baja cuando son trasplantadas si el tallo es dañado, por lo que la mayoría de las especies crecen en suelos bien drenados.
- Son dióicas, forman órganos reproductores en conos o estróbilos, las microesporófilas de los conos masculinos llevan abundantes microesporangios dispersos que producen grandes células espermáticas móviles como las de sus ancestros helechos, en los conos ovulados las esporófilas llevan óvulos desnudos marginales que después de la fertilización se desarrollan en semillas en forma de drupa, algunas de color brillante, contienen un verdadero embrión como las plantas con flor (Chávez, 1993).
- Las semillas no tienen periodo de dormancia (recalcitrantes). Esto significa que los embriones se desarrollan lenta pero continuamente desde el momento de la fecundación hasta la germinación, lo que ocurre a pocos meses de ser dispersadas. Esto tiene como consecuencia que las semillas tengan una viabilidad muy corta y sean susceptibles a daño por desecación.
- Poseen raíces apogeotróficas que albergan cianobacterias simbiotas. Las cianobacterias pueden fijar nitrógeno atmosférico lo que permite a las cícadas crecer en ambientes pobres en nutrientes.
- Todas poseen raíces contráctiles, al menos cuando son plántulas, lo que provoca que el ápice se quede dentro del suelo, esto lo protege de la desecación y del daño por fuego.

Las cícadas no existen de manera aislada y es importante considerar las interacciones que presentan con otros organismos. Son entomófilas y sus polinizadores son escarabajos (Curculionidae y Languridae) también primitivos, lo que indica una coevolución muy antigua (Vovides, 2000). Durante las pasadas décadas las investigaciones han demostrado que las cícadas desarrollaron relaciones simbióticas con cianobacterias fijadoras de nitrógeno,

micorrizas arbusculares, pájaros y mamíferos dispersores de semillas y con varios insectos polinizadores (Norstog *et al.*, 1986; Tang, 1987; Donalson *et al.*, 1995; Donalson, 1997; Vovides *et al.*, 1997; Mound *et al.*, 2001). Prácticamente carecen de depredadores naturales ya que son altamente tóxicas (Norstog *et al.*, 1989; Gómez-Pompa *et al.*, 2000).

Muchas de las interacciones conocidas son específicas de una o pocas especies de cícadras (Oberprieler, 1995a; 1995b) y han influenciado la evolución de atributos químicos, morfológicos y de comportamiento únicos (Rothschild *et al.*, 1986; Donalson, 1991; Ackery *et al.*, 1993; Stevenson *et al.*, 1999). Estas interacciones deben ser vistas como únicas para el grupo de las cícadras y tratadas como tales dentro de los planes de conservación (Donalson *et al.*, 2003).

### **Clasificación taxonómica de las cícadas**

Las cícadas pertenecen a la Clase Cycadopsida, Orden Cycadales. Son un grupo natural de plantas cuyo origen monofilético ha sido confirmado mediante estudios morfológicos y moleculares (Stevenson, 1990; Chase *et al.* 1993). El ancestro de las cícadas es desconocido y las relaciones filogenéticas de este grupo con otras plantas es incierto (Donalson *et al.* 2003).

Las relaciones entre los géneros de cícadas son bien conocidas, Stevenson (1992) (Tabla 1) presentó un detallado estudio y clasificación de los géneros y familias. Basados en esta clasificación, las cícadas vivientes pueden ser clasificadas dentro de tres familias, Cycadaceae, Stangeriaceae y Zamiaceae, conteniendo 11 géneros y alrededor de 297 especies y subespecies. Estos taxa están distribuidos en las regiones cálidas de Norte y Sur América, África, Asia y Australia, así como en una gran cantidad de islas oceánicas (Donalson *et al.* 2003).

El número de especies de cícadas descritas a nivel mundial ha aumentado considerablemente durante los últimos 30 años (figura 1), pero a pesar de estos avances el conocimiento sobre la diversidad de las cícadas es pobre, sobre todo en las especies asiáticas del género *Cycas* y los géneros americanos *Zamia* y *Ceratozamia* (Donalson *et al.*, 2003).

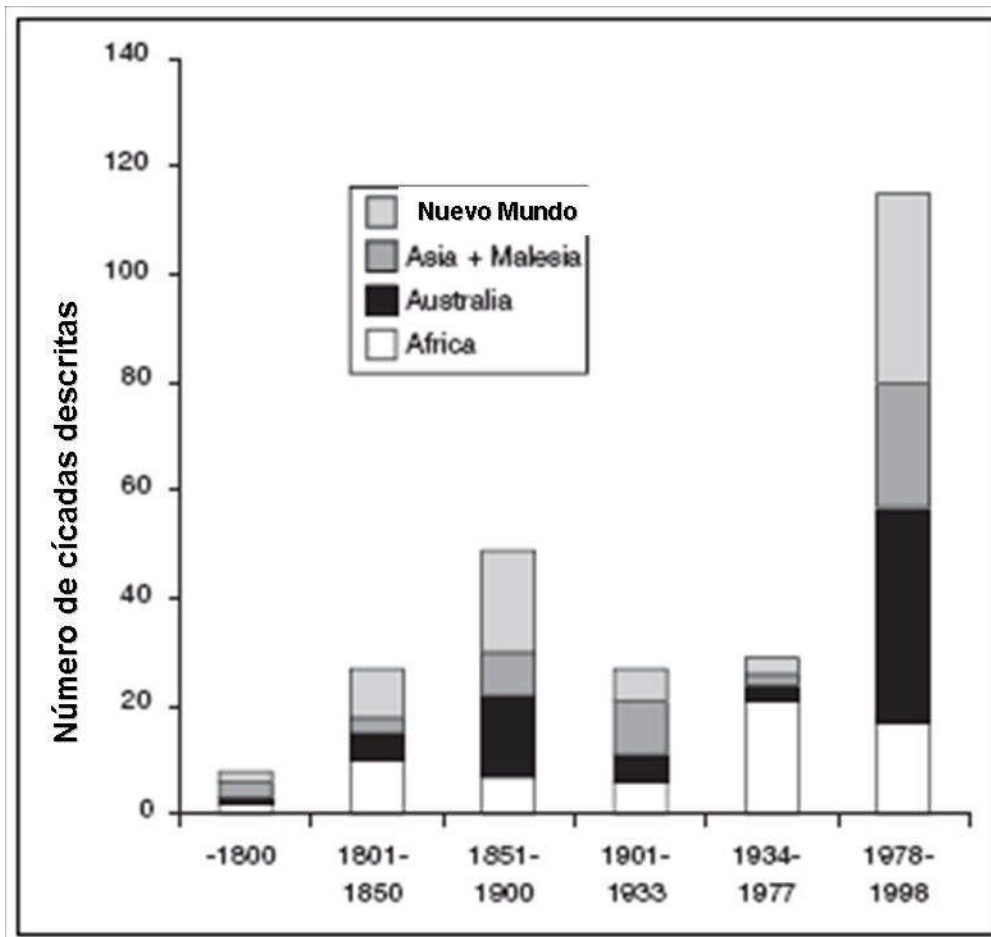


Figura 1. Número de especies de cícadas descritas por región y año (modificada Donalson *et al.*, 2003).





### **Distribución**

Las cícadras pueden encontrarse en una gran variedad de hábitats, desde bosques tropicales hasta pastizales e incluso matorral semidesértico. Muchas especies están restringidas a cierto tipo de sustrato tales como suelos pobres en nutrientes, piedra caliza, afloramientos de serpentina, dunas y riscos muy inclinados (CITES, 2003).

En México las cícadras ocupan diversos ambientes (Figura 2), desde selvas tropicales altas, medias y bajas hasta bosques mesófilos de montaña, bosques de pino y encino, y matorrales; cerca del 80% de las especies son endémicas (Vovides, 2000).



**Figura 2. Mapa de la distribución de las cícadras en México y el resto de América (Stevenson *et al.*, 2003).**

Existen centros de diversidad en el sur de África, Australia y en las regiones tropicales de América. Las tres familias de cícadras están representadas en Australia y África mientras que Asia y América poseen una

familia cada una (Cycadaceae y Zamiaceae respectivamente). A nivel de género, América posee la mayor diversidad con cinco géneros (*Ceratozamia*, *Chigua*, *Dioon*, *Microcycas* y *Zamia*) (Donalson *et al.*, 2003), *Zamia* se encuentra en Florida, México, el Caribe, América Central y en gran parte de América del Sur. *Microcycas* es endémica de Cuba. *Chigua* sólo se reporta en Colombia. *Ceratozamia* y *Dioon* tienen una distribución restringida a América Central, principalmente en México (Chávez, 1993); Australia tiene cuatro géneros incluyendo *Cycas*, siendo que *Macrozamia*, *Lepidozamia* y *Bowenia* son endémicos de éste continente; tres géneros se encuentran en África: *Cycas*, *Encephalartos* y *Stangeria*, siendo los dos últimos endémicos; mientras que sólo *Cycas* habita en Asia, (Donalson *et al.* 2003).

Las más altas densidades en términos de proliferación de géneros se encuentran en Queensland, Australia con 11 especies de 4 géneros; México cuenta con 42 especies de 3 géneros, *Ceratozamia*, *Dioon* y *Zamia*; y Sudáfrica, 29 especies de 2 géneros. México se encuentra en el segundo lugar en cuanto a diversidad de especies de cícadas detrás de Australia (52 especies de cuatro géneros) (Vovides, 2000) y cuenta con el 50% de estas plantas existentes en América (Bladuzzi *et al.*, 1982 citados por Vázquez Torres, 1990). En nuestro país habitan aproximadamente el 20% de las especies de cícadas del mundo (Vovides, 2000).

### **Estado de conservación**

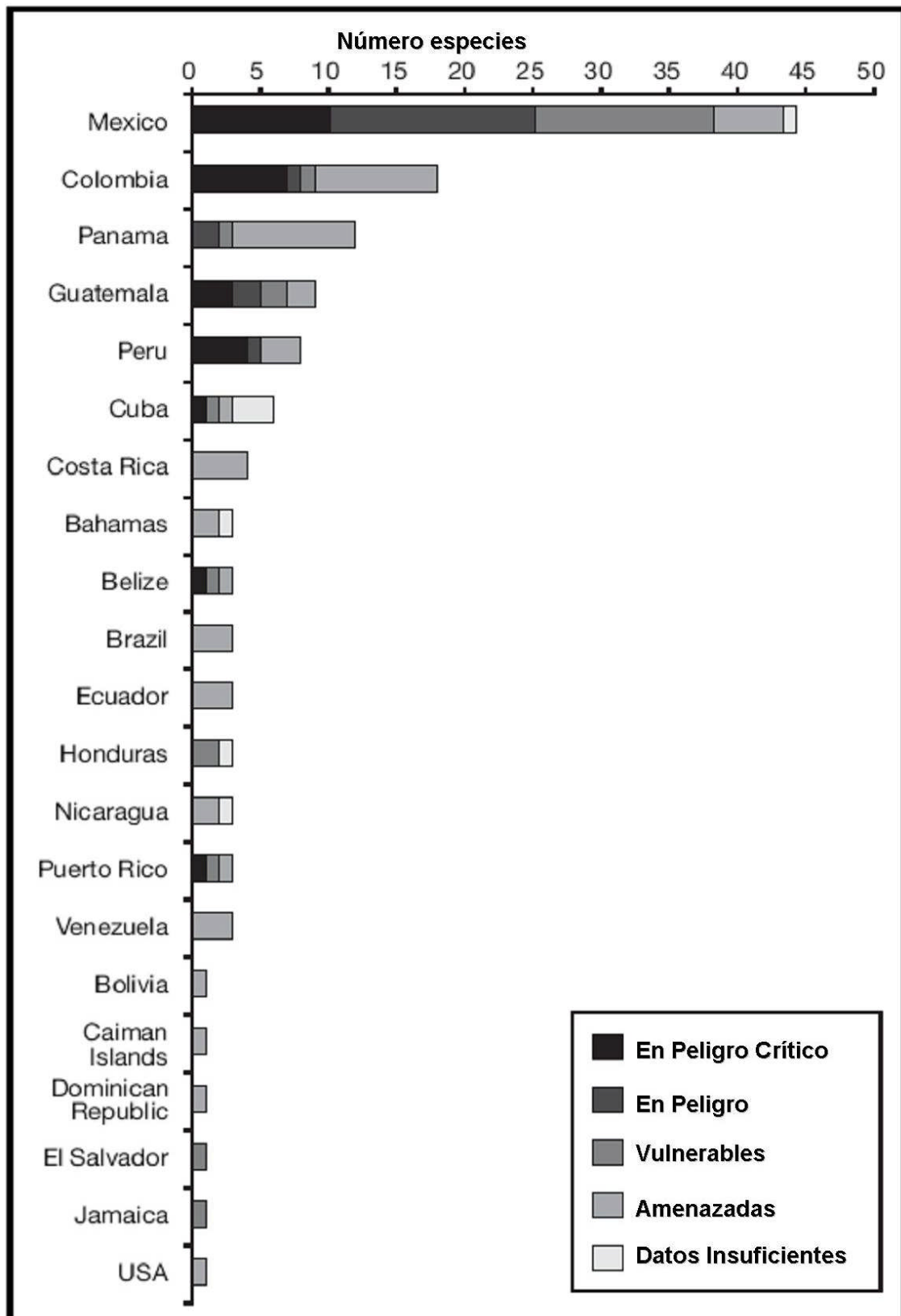
Las cícadadas, por el hecho de que ocupan nichos ecológicos específicos con patrones de distribución altamente restringidos en los trópicos, están en inminente peligro de desaparecer de sus habitats a consecuencia de múltiples actividades del hombre (Osborne, 1990).

La Lista Roja de Especies Amenazadas publicada por IUCN en 1997 contenía 64 especies de cícadadas Neotropicales de América. La figura 3 muestra la situación en el año de 2003, 59 especies se encuentran amenazadas (65%), 25 especies están cerca de ser amenazadas (25%) y de 5 especies no se tienen suficientes datos (Stevenson *et al.*, 2003).

Los datos obtenidos demuestran que la principal causa del declive de las poblaciones de cícadadas se debe a la destrucción de su hábitat. La deforestación para producción de maderas y la apertura de nuevos campos de cultivo ha tenido un impacto dramático en las poblaciones de muchas especies de cícadadas en toda América, sobre todo en aquellas especies que crecen en bosques y selvas (Stevenson *et al.*, 2003).

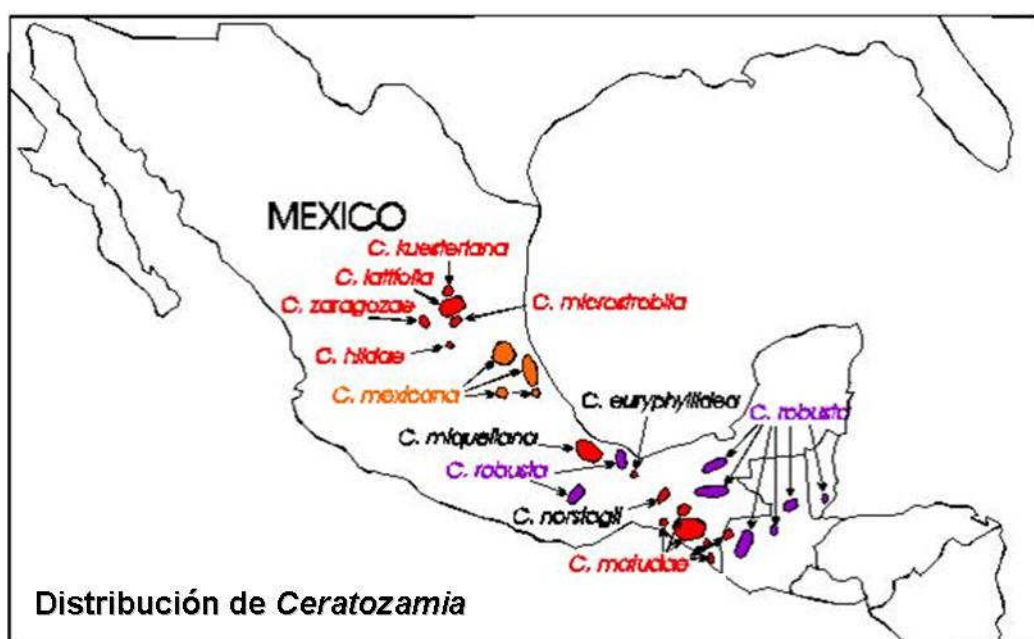
La colecta ilegal ha contribuido al declive de muchas poblaciones de cícadadas en México, donde se han destruido sistemáticamente poblaciones de especies tales como *Dioon sonorensis*, *D. merolae*, *D. spinulosum*, *Ceratozamia norstogii*, *C. miqueliana*, y *Zamia furfuracea* (Stevenson *et al.*, 2003).

Como resultado de la destrucción del hábitat y la colecta ilegal, en América existen 23 especies listadas en **peligro crítico**, 18 en **peligro** y 18 **vulnerables**, de las cuales México tiene 10, 15 y 13 especies respectivamente. Las plantas categorizadas en **peligro crítico** usualmente tienen menos de 250 individuos maduros, generalmente en una sola población o en poblaciones pequeñas y aisladas. Esto plantea problemas para la sobrevivencia debido a factores como: son plantas dióicas, las plantas individuales tienden a reproducirse con menor frecuencia, muchas especies necesitan de ciertas especies de escarabajos para la polinización. Estos factores elevan la probabilidad de que la reproducción falle y cualquier disminución en el número de organismos maduros acelerará la extinción de estas especies (Stevenson *et al.*, 2003).



**Figura 3. Diversidad y grado de amenaza en que se encuentran las cícadas de América de acuerdo con la UICN (modificada de Stevenson *et al.*, 2003).**

Es necesaria una especial atención con respecto a las especies del género *Ceratozamia* (Figura 4) ya que el crecimiento de las plantaciones de café han disminuido el hábitat de especies como *C. zoquorum* en Chiapas, y *C. mexicana* y *C. moretii* en Veracruz. Aunque alrededor del 50% de las especies se encuentra en reservas, no hay garantía de su sobrevivencia a largo plazo debido a la deforestación clandestina y otras actividades ilegales (Stevenson *et al.*, 2003).



**Figura 4. Mapa de la distribución en México de las diferentes especies del género *Ceratozamia*.**

Sin embargo, *Ceratozamia matudae*, *C. mirandae*, *Dioon merolae* y *Zamia zoconuscencis*, que se encuentran en las Reservas de la Biosfera de El Triunfo y La Sepultura en el estado de Chiapas, están siendo manejadas sustentablemente por campesinos en viveros de cícadas, así como *D. edule*, *C. mexicana* y *Z. furfuracea* en Veracruz (Stevenson *et al.*, 2003).

*C. euryphyllidia* (figura 5) es una especie que se encuentra críticamente amenazada (Osborne, 1995; Stevenson *et al.*, 1986 citados por Chávez *et al.*, 1998). La especie fue primero descrita por Stevenson (1986 citado por Chávez *et al.*, 1998) quien “deliberadamente omitió el dato de la localización exacta en un intento de prevenir la erradicación de las poblaciones por comerciantes

ilegales”. Stevenson *et al.*, (1986 citado por Chávez *et al.*, 1998) menciona que sólo pudieron encontrar 30 individuos, y creían que “los colectores comerciales intencional o inintencionalmente causarían eventualmente su extinción”.



**Figura 5. Ejemplar adulto de *Ceratozamia euryphyllidia* (centro).**

De acuerdo con el último reporte de Osborne (1995), sólo se sabía de 20 especímenes que existían en la naturaleza. Posteriormente se reportó que *C. euryphyllidia* podría haberse extinguido de su hábitat natural debido a la colecta ilegal, excepto por unos pocos árboles que se encuentran en los jardines botánicos (Vovides com. pers. citado por Chávez *et al.*, 1998).

En el Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero de Jalapa, Veracruz, se logró la polinización artificial de ejemplares de *C. euryphyllidia* que se conservan en sus invernaderos (Vovides com. pers. 2005).

## Usos

En los más importantes códices indígenas y documentos de la época de la Colonia no se ofrecen pruebas del conocimiento de estas plantas, es muy probable que éste haya sido transmitido en forma oral de generación en generación, como parece demostrarlo la información recabada con indígenas y campesinos que habitan las regiones en las que se encuentran las cícadas (Chávez, 1993), lo que ha permitido aprender y documentar distintas formas de uso: comestible (Tabla 2), medicinal (Tabla 3), y ornamental (Tabla 4) (Vázquez-Torres, 1990 citado por Chávez, 1993). Los conos de las cícadas asemejan mazorcas de maíz por lo que los nombres vulgares con los que les refiere son “maíz viejo”, “maíz de los abuelos”, “maíz del monte” y “maíz antiguo” (Vázquez-Torres, 1989a, 1989b). En Chiapas, las hojas de algunas especies (*D. merolae*) son utilizadas como decoración en las altares, sobre todo en la celebración del día de la Santa Cruz (Pérez-Farrera, 1994, 1999). Las semillas de *D. edule* son utilizadas como fuente de almidón comestible y para texturizar ropa, mientras que los conos de *C. mexicana* se utilizan como insecticidas.

**Tabla 2. Ejemplos de cícadas comestibles (Vázquez-Torres, 1990).**

\*Vovides *et al.*, 1983; - no citada; \*\*Thieret, 1958.

Especie	Parte comestible	Localidad
<i>Ceratozamia mexicana</i> var. <i>robusta</i> (Miq.) Dyer	Semillas	Chiapas*
<i>Ceratozamia microstrobila</i> Vovides y Rees	Semillas	SO Tamaulipas
<i>Dioon edule</i> var. <i>agustifolium</i> Miq.	Semillas	SO Tamaulipas
<i>D. edule</i> var. <i>edule</i> Lindley	Semillas	SO Tamaulipas
<i>Dioon spinulosum</i> Dyer	Semillas	Oaxaca, Veracruz
<i>Zamia loddigesii</i> Miq.	Semillas	-
<i>Zamia pumila</i> L.	Tallo subterráneo (harina)	Florida**

**Tabla 3. Ejemplos de cícadas con uso medicinal (Chávez, 1993).**

Especie	Uso	Referencia
<i>Ceratozamía mexicana</i> var. <i>mexicana</i>	Vermífugo	Vovides <i>et al.</i> , 1983
<i>C. mexicana</i> var. <i>robusta</i>	Vermífugo	Vovides <i>et al.</i> , 1983
<i>D. edule</i>	Antineurálgico	Vázquez-Torres, 1990
<i>Zamia spartea</i> A. DC.	Contra mordedura de serpientes	Vázquez-Torres, 1990

**Tabla 4. Algunos ejemplos de las especies de cícadas más apreciadas como ornamentales (Chávez, 1993).**

<i>Ceratozamía kuesteriana</i> Regel	<i>D. spinulosum</i> Dyer
<i>Ceratozamía latifolia</i> Miq.	<i>D. tomaselli</i> var. <i>tomaselli</i> De Luca <i>et al.</i>
<i>Ceratozamía miquelina</i> Wendl.	<i>Z. cremnophila</i> Vovides, Schutzman y Dehgan
<i>Ceratozamía matudae</i> Lundell	<i>Z. furfuracea</i> L.
<i>C. mexicana</i> Brongn.	<i>Z. inermis</i> Vovides, Rees y Vázquez-Torres
<i>C. mexicana</i> var. <i>robusta</i> (Miq.) Dyer	<i>Z. pacijuga</i> Wieland
<i>D. edule</i> Lindl.	<i>Z. splendens</i> Schutzman
<i>Dioon merolae</i> De Luca, Sabato y Vázquez-Torres	



### **Cultivo de tejidos en cícadas**

Se han realizado pocos estudios de cícadas dentro de esta área de la biotecnología, LaRue (1948) inició los estudios de cultivo de tejidos en cícadas donde reportó la regeneración de raíces, plántulas y un embrión somático a partir de megagametofito de *Zamia pumila*, en 1954 reportó la formación de yemas y raíces en megagametofitos de *Z. pumila*. Norstog y Rhamstine (1962) obtuvieron cultivos embriogénicos a partir de embriones cigóticos. Durante la década de 1980 los estudios se incrementaron, se obtuvo la formación de callo a partir de *Zamia pumila* (Web *et al.*, 1983) y algunas especies de *Encephalartos* (Koleman y Small, 1982) y la regeneración *in vitro* de *Stangeria eriopus* (Osborne y van Staden, 1989).

Chávez *et al.* (1992a) reportaron la formación de brotes, raíces y embriones somáticos de *Ceratozamia hildae* y *Ceratozamia mexicana* a partir de megagametofitos y embriones cigóticos; embriogénesis somática y organogénesis de *Zamia fischeri*, *Zamia furfuracea* y *Zamia pumila* (1992b) y la embriogénesis somática a partir de callo proveniente de hojas de *C. mexicana* var. *robusta* (1992c). Posteriormente Chávez *et al.* (1998) obtuvieron la regeneración vía embriogénesis somática de cultivos provenientes de hojas de *C. euryphyllidia* y organogénesis usando megagametofitos y embriones cigóticos de *D. edule* (1999).

Rinaldi y Leva (1995) obtuvieron la regeneración via organogénesis indirecta de *Cycas revoluta* a partir de embriones cigóticos y posteriormente Rinaldi (1999) a partir de cotiledones y epicótilos de plántulas. Jaeger y van Staden (1996a, 1996b) reportaron la embriogénesis somática y organogénesis de varias especies del género *Encephalartos*.

### **Desarrollo del embrión somático y cigótico en cícadas**

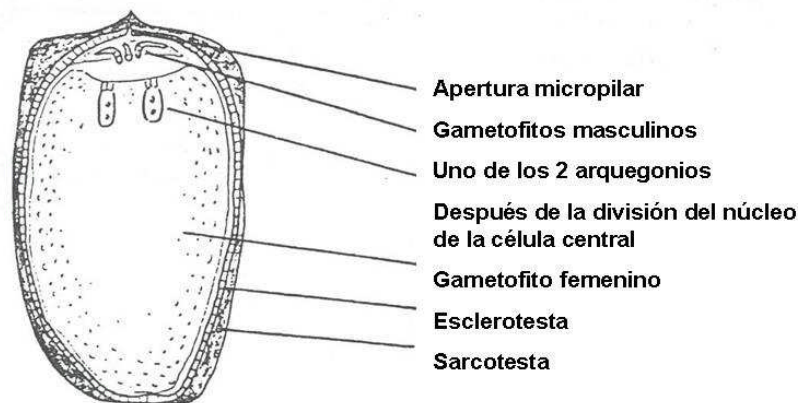
La embriogénesis somática en cícadas ha sido poco estudiada, siendo el principal objetivo de estas investigaciones el establecimiento de protocolos de regeneración *in vitro* y propagación masiva (Chávez *et al.*, 1992b, 1992c, 1998; Jaeger y van Staden, 1996a, 1996b). Muy pocos estudios se han enfocado a describir y estudiar la ultraestructura de los embriones somáticos. Chávez (1993) reporta las diferentes fases que presentan los cultivos embriogénicos provenientes de hojas de *C. mexicana* var. *robusta*, siendo la primera de éstas la proliferación de células que dan origen a un callo friable blanco amarillento con zonas cristalinas y hialinas; conteniendo grandes células vacuoladas, transparentes, redondas y otras alargadas. De la superficie del callo se diferencian proembriones de forma nodular hialinos o de color blanco amarillento de aproximadamente 1mm de diámetro, los proembriones están unidos a un largo suspensor formados por células alargadas y transparentes. Posteriormente los proembriones se desarrollan para formar la etapa precotiledonar, donde el cuerpo del embrión mide de 1.5-3mm de ancho, presenta forma de saco de color blanco, el suspensor crece de manera que ambas estructuras juntas miden de 3-10mm de longitud (Chávez, 1993).

El embrión continúa desarrollándose hasta la aparición de los primordios de dos cotiledones, aunque en algunos casos solo se desarrolla un cotiledón. Conforme los cotiledones crecen, el suspensor se deseca y se hace evidente la formación del meristemo radicular. En la base del embrión se forma la coleoriza la cual se observa como un ensanchamiento de 3-6mm del cuál emerge la radícula. Los embriones en esta fase tienen un tamaño variable que va desde 1.5cm hasta los 3cm. Finalmente de entre los cotiledones aparece el meristemo apical y en la base del cuerpo del embrión se desarrolla y crece la raíz (Chávez, 1993).

En cuanto a la embriogénesis cigótica Chamberlain (1957) y a Norstog (1982) reportan que después de la fertilización hay un periodo de divisiones de núcleos libres que pueden llegar a 1024, dependiendo de la especie. En *Zamia pumila* es de 256 y en *Bowenia serrulata* es de 64, que es el menor número encontrado en cícadas.

Después de que los núcleos han aumentado hasta un número en que hay una pequeña cantidad de citoplasma para cada uno, entonces empieza la

formación de las paredes celulares y el embrión se vuelve celular (Chávez, 1993). La primera estructura en diferenciarse es el suspensor como producto del alargamiento de las células que forman una fila o haz de varias hileras de células tubulares. Esta etapa de desarrollo coincide con la desintegración del cono y la caída de las semillas. En un corte longitudinal la presencia del suspensor enrollado es evidente (figura 6) Los embriones de las cícadas son recalcitrantes, lo que significa que el desarrollo de la semilla continúa cuando ha caído del cono a diferencia de muchas otras semillas que presentan un periodo de latencia o dormancia (Osborne, 1986).

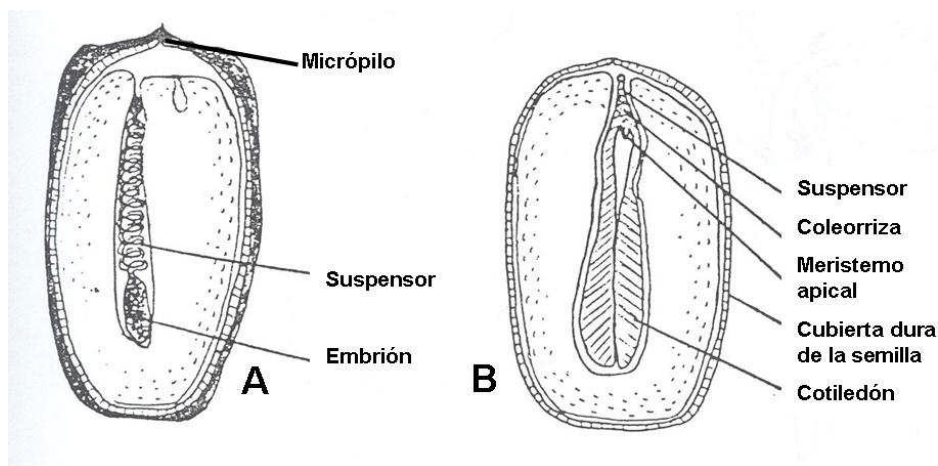


**Figura 6. Sección longitudinal del óvulo después de la fecundación (modificada de Osborne, 1986).**

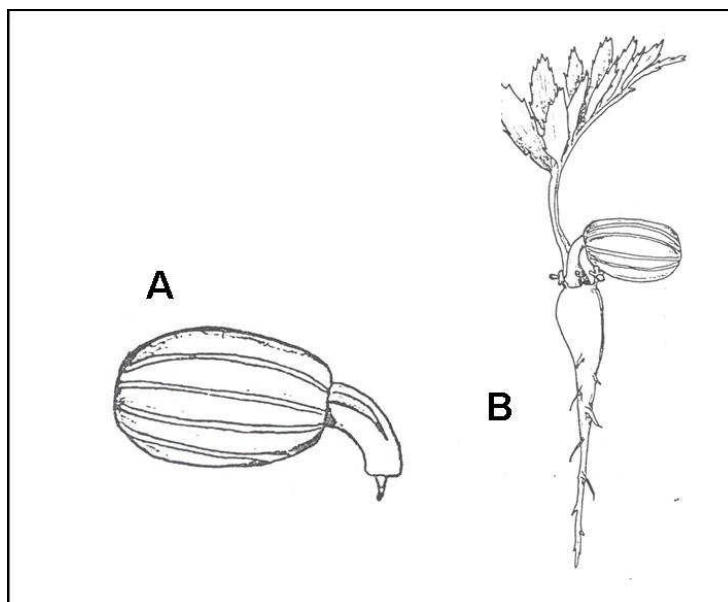
El suspensor continúa creciendo y eventualmente se distingue en él un botón compacto de células pequeñas en el extremo distal. El desarrollo de las regiones del cuerpo y en general de todo el embrión ocurre lentamente. El embrión crece presionando al suspensor enrollado hacia el micrópilo (figura 7A). El embrión desarrolla un par de cotiledones relativamente grandes que protegen al meristemo apical joven, debajo del cual se encuentra una zona denominada coleorriza (figura 7B) (Osborne, 1986).

La consecuente expansión del embrión provoca que la coleorriza comience a ejercer presión contra la testa de la semilla forzando la apertura del orificio micropilar (figura 8A). Es en esta etapa que se reconoce el inicio de la germinación. Una particularidad de las cícadas es que el par de cotiledones

nunca emerge de la semilla (figura 8B), permanecen dentro para continuar el proceso de absorción de nutrientes de las reservas contenidas dentro de la semilla (Osborne, 1986). El embrión maduro es dicotiledóneo, en ocasiones se presentan 3 cotiledones como en *Encephalartos*. *Ceratozamia* puede presentar 1 o 2 cotiledones, mientras que *C. mexicana* es monocotiledónea (Chávez, 1993).



**Figura 7. A: etapa temprana del desarrollo del embrión al momento de que la semilla cae del cono. B: etapa tardía del desarrollo del embrión, justo antes de la germinación (modificada de Osborne, 1986).**



**Figura 8. Germinación de las cícadas. A: raíz emergiendo a través de la coleorriza. B: después de 3 meses de haber germinado (modificada de Osborne, 1986).**

No hay requerimientos de post-maduración y la germinación ocurre cuando el embrión ha madurado y existe un sustrato adecuado. No retiene viabilidad por mucho tiempo aunque algunas semillas germinan después de 1 a 2 años. Usualmente después de surgir la radícula aparece una sola hoja y parte de los cotiledones salen de la semilla, pero la mayor parte permanece dentro del gametofito (Chávez, 1993).

### **Estudios bioquímicos y de biología molecular en cícadas**

En estudios filogenéticos se ha analizado la variación entre géneros de cícadas utilizando RFPL's y datos de secuencias parciales o completas que se han reportado (Caputo *et al.*, 1991, 1993; Moretti *et al.*, 1993; De Luca *et al.*, 1995; Bogler y Ortega 2004). Prakash y Van Staden (2006) utilizaron RAPD's para encontrar un marcador que les permitió distinguir entre ejemplares femeninos y masculinos de individuos de *Encephalartos natalensis* antes de que éstos alcancen la madurez sexual. En años recientes se han realizado estudios de microsatélites para comprobar la estructura genética de *D. edule* y *Zamia integrifolia* para responder preguntas taxonómicas, biogeográficas y de conservación (Moynihan *et al.*, 2007; Merrow y Nakamura, 2007). Wu *et al.* (2007) secuenciaron por completo el genoma del cloroplasto de *Cycas taitungensis* y lo compararon con 56 genes que codifican para proteínas de cloroplasto de *Gnetum parvifolium* para realizar análisis filogenéticos por 3 diferentes métodos. Dichos análisis apoyan las teorías de que las gimnospermas extintas constituyen un clado monofilético y de que las plantas con semilla modernas comparten un solo ancestro lo que significa que la semilla evoluciono solo una vez.

En cuanto a los análisis bioquímicos se sabe que las cícadas producen una gran cantidad de compuestos secundarios algunos de los cuales pueden ser muy tóxicos (Norstog y Nichols, 1997). Principal atención ha recibido un compuesto denominado Ácido S(+)-beta-metil-alfa, beta-diaminopropiónico o Beta-metilamino-L-alanina (BMAA por sus siglas en inglés) que puede estar relacionado con la enfermedad denominada Demencia de Guam (Vega y Bell, 1967; Spencer *et al.*, 1987). Este compuesto está presente en los tejidos de hojas y semillas de todo los géneros de la familia Cycadaceae (Charlton *et al.*, 1992), es neurotóxico para los mamíferos ya que tiene una acción agónica de los receptores de glutamato (Whiting, 1963; Seawright *et al.*, 1999; Copani *et al.*, 1990; Manzoni *et al.*, 1991) y en primates causa convulsiones y neurodegeneración (Spenser *et al.*, 1987).

En *Arabidopsis thaliana* se ha observado que la adición de BMAA bloquea la expansión de los cotiledones y provoca el acortamiento del hipocótilo y en concentraciones de 50µM induce la elongación del hipocótilo 2-3 veces más que en plantas sin tratar y en altas concentraciones (200 µM) inhibe

el crecimiento de la raíz y el tallo (Brenner *et al.*, 2000). Estos reportes y el hecho de que se han encontrado genes similares a los receptores de glutamato de humano en *A. thaliana* sugieren que el glutamato puede tener un papel en alguna vía de transducción de señales en dicha especie (Lam *et al.*, 1998; Lacombe *et al.*, 2001; Chiu *et al.*, 2002, Brenner *et al.*, 2000). La producción de BMAA es única de la cícadas por lo que se ha utilizado como carácter sinapomórfico en la clasificación de esta familia (Loconte y Stevenson, 1990). En cícadas se han identificado otras posibles sustancias neurotóxicas como el metil-axozymetanol (Seawright *et al.*, 1999) y el estero-D-glucosido (Khabazian *et al.*, 2002).

Brenner *et al.* (2003) purificaron mRNA a partir de hojas de *Cycas rumphii* del cual obtuvieron 4200 EST's y posteriormente las agruparon en 2458 "contigs" para realizar un análisis con BLAST con el cual encontraron muchos genes conservados a lo largo de la escala evolutiva de las plantas y algunos genes potencialmente nuevos, así mismo encontraron un EST que posiblemente esta involucrado en la síntesis de un agonista del receptor de glutamato (BMAA) y un EST que codifica para un gen parecido al receptor de glutamato, lo que sugiere que los compuestos neuroactivos que contienen éstas plantas no solo juegan un papel defensivo contra la herbivoría, sino que también tienen actividad en las vías de transducción de señales tal como se sugiere en los estudios hechos con *A. thaliana*.

## JUSTIFICACIÓN

Son reconocidas y ampliamente documentadas las fuertes limitantes en la capacidad reproductiva de las cícadadas, así como su largo y extremadamente lento ciclo de vida. En las últimas dos décadas, estudios con especies mexicanas sobre cultivos *in vitro* de estructuras ligadas a las semillas (embriones y megagametofitos) así como de estructuras somáticas (hojas de individuos adultos), han revelado su capacidad de regeneración a través de la formación de embriones somáticos que a su vez se multiplican de manera repetitiva por un proceso de poliembriogénesis por lo que las implicaciones son obvias para la conservación de estas especies y para la silvicultura. Sin embargo, el hecho de que los embriones somáticos rara vez continúen su desarrollo y germinen, ha impuesto una fuerte limitante para la aplicación de estos protocolos de regeneración *in vitro* ya sea para la propagación y reintroducción de plantas a sus ambientes naturales o para la venta de plantas ornamentales.

A pesar de la importancia evolutiva y el papel que tienen en algunos desordenes neurológicos que provocan en seres humanos, nada o muy poco se sabe de los genes responsables de estas características ya que existen muy pocos estudios de biología molecular en este grupo de plantas y ninguno que haya estudiado los procesos de embriogénesis cigótica y somática. Por lo que es muy importante realizar estudios encaminados a conocer más acerca de los mecanismos que controlan estos procesos que puedan ayudar a micropropagar estas plantas de manera eficiente y en tiempos cortos para evitar las posibles mutaciones que pueden aparecer en cultivos que se mantienen por mucho tiempo. Así mismo, al conocer qué genes están involucrados en la inducción de la embriogénesis somática y en la maduración de los cultivos *in vitro* de cícadadas, se podrían aislar éstos y con ellos transformar tejidos de otras especies de cícadadas y de otras gimnospermas que se encuentren en peligro de extinción o que tengan un alto valor económico y micropropagarlas. El presente estudio pretende caracterizar los distintos estados de desarrollo de los embriones somáticos de cícadadas, así como aislar el RNA de éstos lo que permitirá establecer las bases que permitan entender los mecanismos moleculares que regulan el proceso de embriogénesis somática de las cícadadas



para su posterior utilización en el manejo y conservación de este grupo de plantas.

## **OBJETIVOS**

- Caracterizar morfológicamente y mediante marcadores moleculares distintos estadios embrionarios de *C. euryphyllidia*.

### **Objetivos particulares**

- Reconocer morfológicamente los diferentes estadios embrionarios de *C. eruphyllidia* y *Z. pumila*.
- Ensayar diferentes protocolos de extracción de RNA para probar su eficiencia con semillas y embriones somáticos de cícadadas.
- Iniciar una genoteca a partir de embriones somáticos de cícadadas.
- Determinar si cada estadio tiene su correspondencia a nivel molecular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Clasificación y separación de los embriones somáticos

A partir de cultivos de embriones somáticos de *C. euryphyllidia* y *Z. pumila* que tenían alrededor de 8 años de haber sido generados, se realizaron observaciones bajo microscopio de disección y fueron separados de acuerdo a su morfología. Una vez hecho esto los embriones se utilizaron para realizar extracciones de RNA el cual se utilizaría para realizar un despliegue diferencial.

### Despliegue diferencial

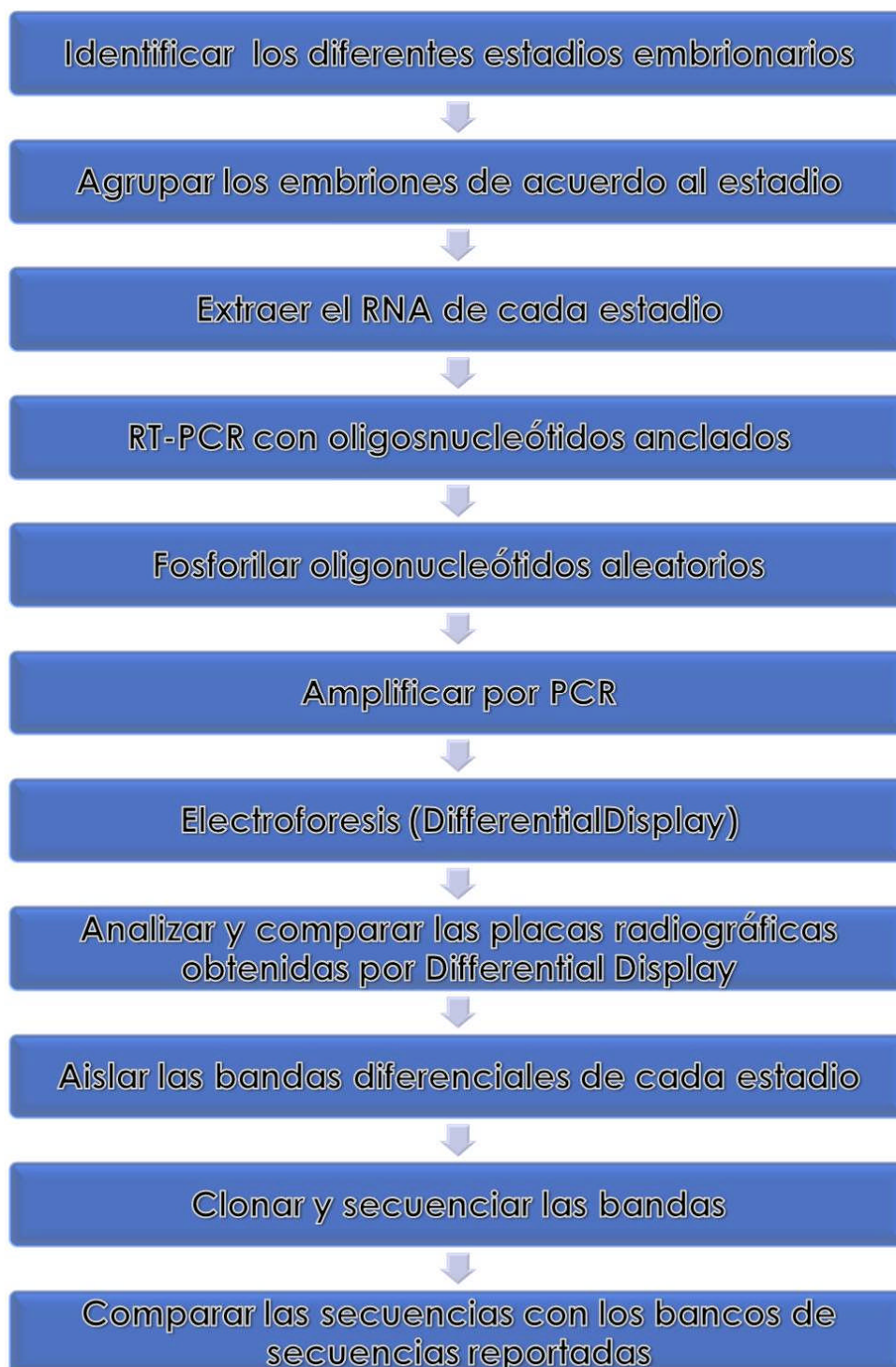
La primera estrategia utilizada para cumplir el objetivo de esta investigación está representada en la figura 9.

### ***Extracción de RNA de embriones somáticos y de hojas de C. euryphyllidia***

Se probaron los **protocolos 1, 3 y 4** (Apéndice I) en el Departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV Unidad Irapuato. Para los **protocolos 1 y 4** se utilizaron 2g de embriones somáticos de *C. euryphyllidia* y se siguió la metodología detallada en el apéndice I. En el **protocolo 3** se emplearon 100mg de embriones somáticos de *C. euryphyllidia* de acuerdo al manual del kit de extracción de RNA.

El **protocolo 2** fue probado en el Laboratorio de Biología Molecular de Instituto de Biología de la UNAM, para el cual se utilizaron 100mg de embriones somáticos de *C. euryphyllidia* y además tejido proveniente de hojas de *C. mexicana* (500mg) en ambos casos se siguió la metodología indicada por el manual del kit (Apéndice I).

El **protocolo 5** (Apéndice I) fue probado en el Laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la UNAM, se utilizaron 500mg de embriones somáticos de *C. euryphyllidia*. Para todas las extracciones se utilizaron embriones somáticos de todas las etapas. Al final de todas las extracciones se realizó electroforesis en gel de agarosa 1.2% para revisar la integridad del RNA.



**Figura 9. Diagrama de flujo de los pasos a seguir para identificar genes que se expresan de manera diferencial en embriones somáticos de *C. euryphyllidia*.**

#### ***Extracción de RNA de embriones cigóticos***

Los protocolos 6-10 (Apéndice I) fueron probados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en embriones cigóticos de *C. euryphyllidia* y *C.*

*norstogii*. El Dr. Vovides investigador del Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero de Jalapa, Veracruz donó las semillas de ambas especies, las cuales tenían alrededor de 1 año y medio de haber sido colectadas del cono.

Previo a la extracción de RNA, se lavaron las semillas con agua y detergente, se desinfectaron con alcohol al 70%. Se abrieron las semillas con un cascanueces teniendo cuidado de no dañar al embrión y se separó el megagametofito del embrión.

Se probó el **protocolo 6** con semillas de *C. euryphyllidia*. Para el **protocolo 7** se utilizaron semillas de *C. euryphyllidia* y *C. norstogii*. Los **protocolos 9** y **10** fueron probados con muestras de megagametofito de *C. norstogii*. Para los **protocolos 9** y **10** durante el paso de precipitación se compararon dos procedimientos: isopropanol y acetato de sodio 3M pH 5.5 y CILi 12M (toda la noche). En todos los protocolos se utilizaron 500mg de tejido.

### ***Reducción de la oxidación de los embriones somáticos de C. euryphyllidia***

Para reducir el grado de oxidación de los embriones somáticos de *C. euryphyllidia* se implementaron dos estrategias:

1. Subcultivo mensual en medio Litz (Apéndice IV) adicionado de PVP (1g/l).
2. Subcultivo en medio Litz líquido adicionado con PVP (1g/l) por 1 mes y posteriormente subcultivo en medio Litz semisólido sin PVP.

Una vez que se redujo el grado de oxidación de los embriones somáticos éstos fueron separados de acuerdo a su estadio y se practicó la extracción de RNA con los **protocolos 6-8**.

### ***Extracción de RNA de embriones somáticos***

Para los **protocolos 6-8** se emplearon embriones somáticos de *C. euryphyllidia* (1g). Con el objetivo de determinar la eficiencia de extracción de tejido se utilizaron dos métodos de homogenización para el **protocolo 6**: nitrógeno líquido y un politrón y hielo seco con una moladora de café, además se empleó PVP en la mitad de las muestras para ambos métodos, ya que se ha reportado que el PVP ayuda a la extracción de RNA de tejidos con alto

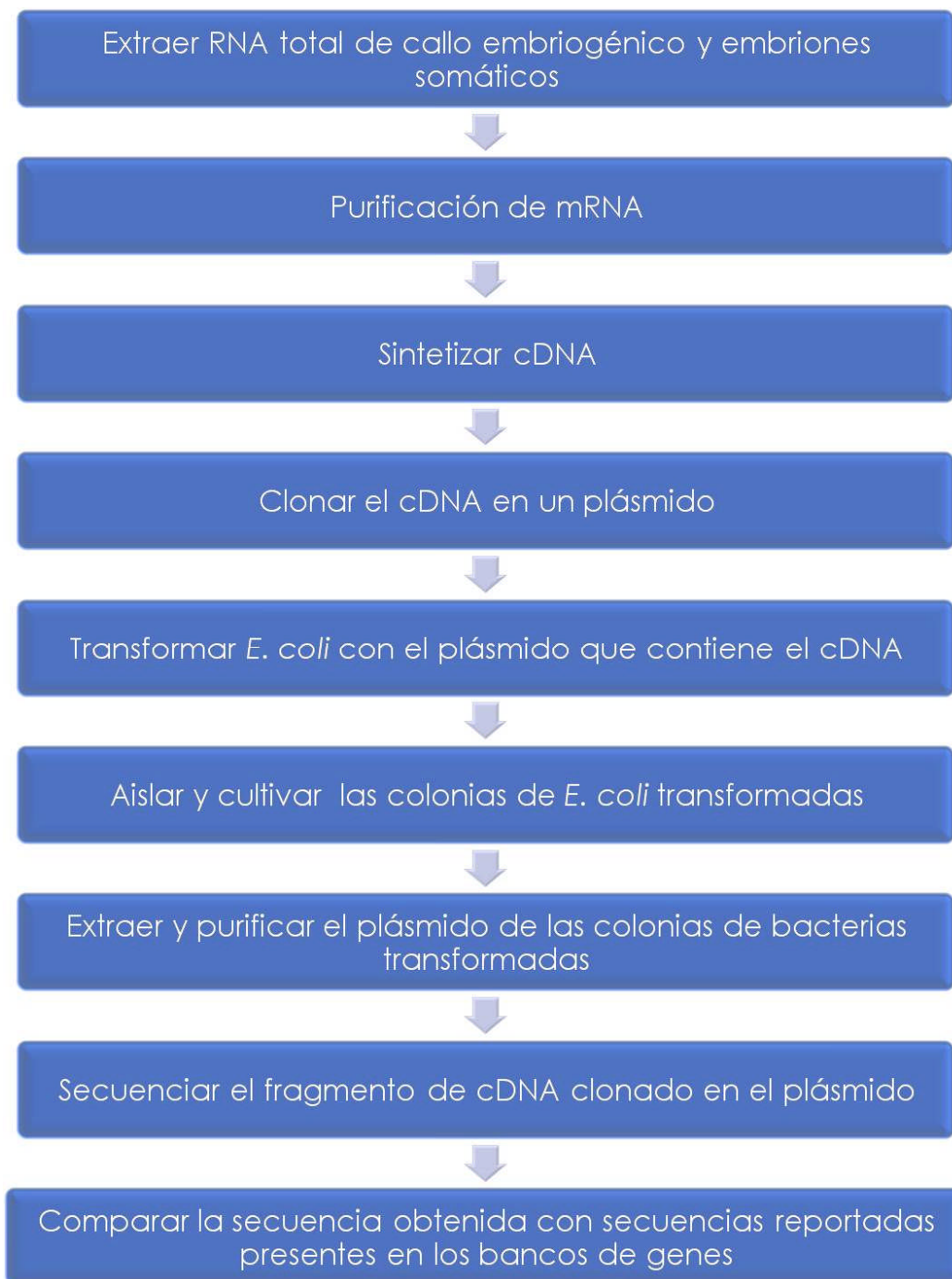
contenido de fenoles y polisacáridos (Chang *et al.*, 1993). Para el **protocolo 7** se utilizaron embriones somáticos de *Zamia fisheri* (2g).

### ***Despliegue diferencial***

El despliegue diferencial (Figura 9) se hizo en el Departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV Unidad Irapuato. Se separaron 500mg de hojas maduras, de embriones cigóticos, megagametofito y de los diferentes estadios de los embriones somáticos de *C. euryphyllidia* para extraer RNA utilizando el **protocolo 11** con el fin de hacer el despliegue diferencial. Se cuantificó la concentración de RNA en cada una de las muestras con ayuda del espectrofotómetro, se tomaron alícuotas que se aforaron con ddH<sub>2</sub>O tratada con DEPC para igualar la concentración de RNA a 0.1 µg/µl en cada una de ellas. Posteriormente se realizó el RT-PCR y se continuó el protocolo (Apéndice II) hasta obtener 2 geles de diferencial display.

## Genoteca

Se inició la creación de una genoteca siguiendo el procedimiento que muestra la figura 10.



**Figura 10. Diagrama de flujo de los pasos que se siguieron para crear una genoteca a partir de embriones somáticos de *Z. pumila*.**

Con **el protocolo 11** se extrajo RNA a partir de todos los estadios de embriones somáticos de *Zamia pumila*. Se purificó el mRNA utilizando el kit de purificación de mRNA (mRNA purification kit Amersham Biosciences) y se realizó la RT-PCR utilizando 7 combinaciones de los oligos dT, Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> y Z<sub>4</sub> (Apéndice V). El cDNA sintetizado a partir del RT-PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% del cual se purificaron las bandas que se encontraban en un rango de 500-2000 pb.

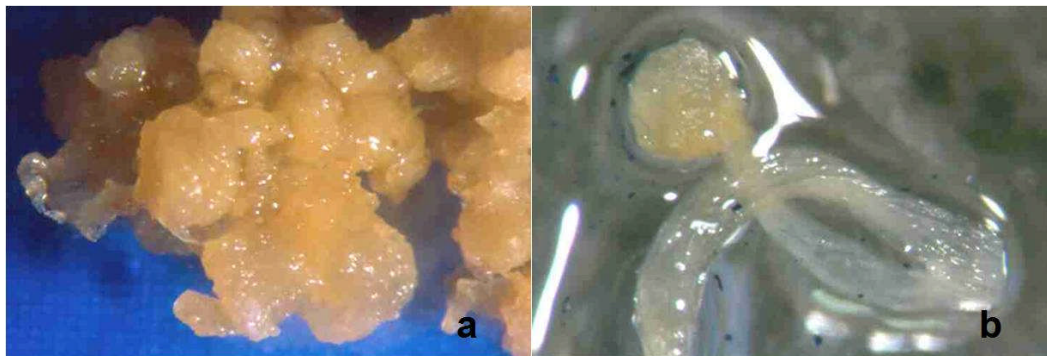
Todas las bandas purificadas se concentraron en un solo tubo de donde se tomó una muestra para clonar los fragmentos de cDNA en el plásmido pGEM y después realizar la transformación de células electrocompetentes de *E. coli*. Las células se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo LB adicionado de X-Gal, IPTG y ampicilina para seleccionar las colonias transformadas con el vector que tenía fragmentos de cDNA clonado. Los cultivos se colocaron en una incubadora a 37°C por 12hr, una vez transcurrido este tiempo se revisaron los cultivos para aislar las colonias transformadas seleccionando aquellas que se observaran blancas y descartando las colonias azules. Se seleccionó una colonia al azar para secuenciar el cDNA inserto en el plásmido. A la secuencia que se obtuvo se le hizo un análisis BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).



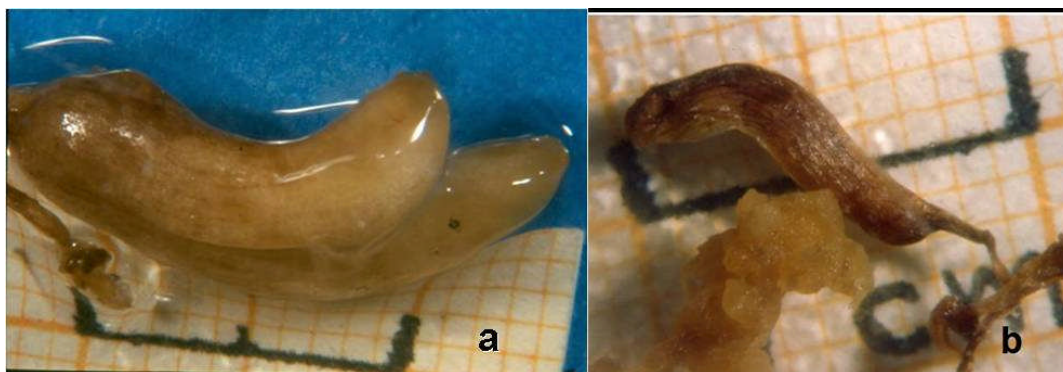
## RESULTADOS

### ***Clasificación de embriones somáticos de C. euryphyllidia***

Los embriones fueron clasificados de acuerdo a Chávez (1993) separándolos de acuerdo a su morfología (Figuras 11 y 12).



**Figura 11. (a) Masas proembriogénicas, (b) embrión en estadio globular.**



**Figura 12. (a) Embrión en germinación, (b) Embrión en estadio cotiledonar.**

Cabe destacar el grado de estrés oxidativo que presentan algunos de los embriones (Figura 11b, 12a, y Figura 13b), siendo éste el común denominador de la gran mayoría de los cultivos que se conservan en el laboratorio. En la figura 12 se pueden observar las diferencia entre embriones bajo estrés oxidativo y aquellos que no lo presentan.

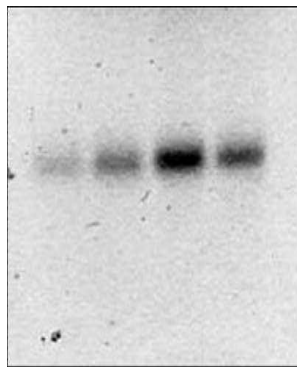


**Figura 13. (a) Aspecto de embriones somáticos sin estrés oxidativo y (b) bajo estrés oxidativo.**

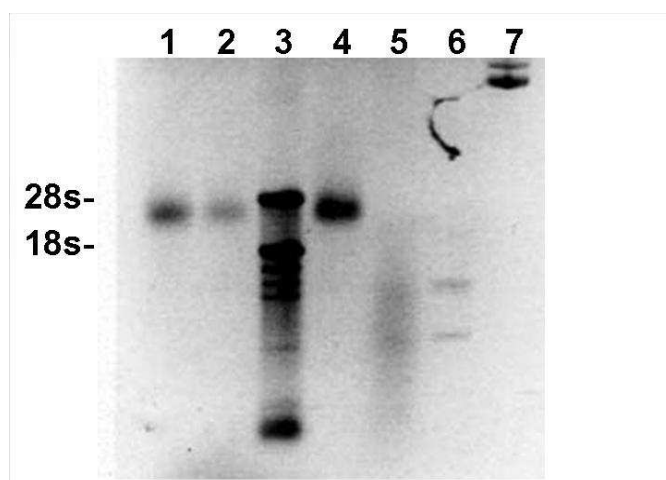
### ***Extracción de RNA***

Los **protocolos 1-5** dieron resultados negativos, no se logró extraer RNA en ninguno de los intentos realizados con los embriones somáticos, no obstante, el kit de extracción de Eppendorf logró la extracción de RNA de las hojas de *C. mexicana*. En ninguno de los casos, excepto el **protocolo 5**, se observó una pastilla al final del proceso de extracción, éste era blanco y fácil de resuspender pero el resultado de la electroforesis fue negativo, se utilizaron 2g de embriones somáticos.

Con el **protocolo 6** se obtuvo la presencia de una sola banda (figura 14). Se compararon las muestras obtenidas con una muestra control de RNA, de DNA y DNA plasmídico y se realizó una digestión de las muestras de los embriones y el control de RNA (Figura 15). La muestra obtenida de los embriones somáticos migró a la misma altura que la subunidad 28s, pero no respondió al tratamiento con RNAsa a diferencia del RNA control (Figura 15).

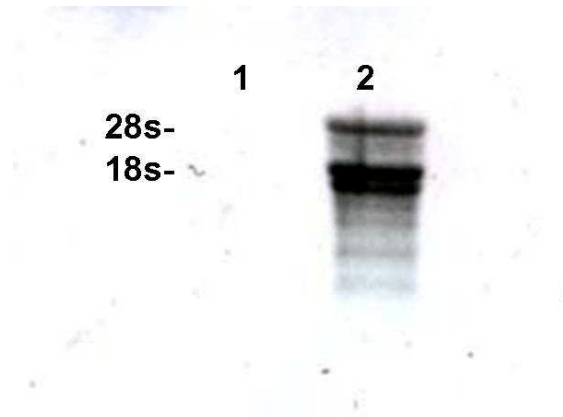


**Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de muestras de RNA de embriones somáticos de *C. euryphyllidia*.**



**Figura 15. Comparación de las muestras de RNA de embriones somáticos de *C. euryphyllidia* (1,2) y con RNAsa (4), muestras de RNA control (3) y con RNAsa (5), DNA (6) y DNA plasmídico (7).**

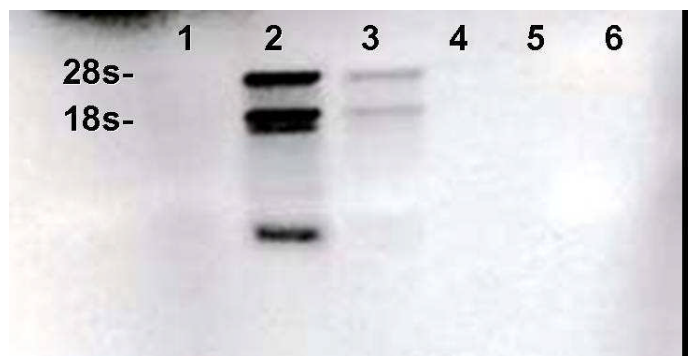
Al agregar el buffer del **protocolo 6** (Apéndice I) al megagametofito *C. euryphyllidia* se formó una masa pastosa, debido al alto contenido de polisacáridos y/o proteínas presentes en el tejido, y no fue posible extraer RNA. Por sugerencia de un asesor se adicionó el buffer del **protocolo 8** (Apéndice I) lo que provocó que se volviera más fluida la muestra. A pesar de esto las pastillas obtenidas de los embriones eran muy difíciles de resuspender y formaron un gel. El megagametofito produjo pastillas fáciles de resuspender y las muestras no eran tan viscosas. Al realizar la electroforesis la muestra de los embriones no mostró ninguna banda de RNA, mientras que la proveniente de megagametofito si las presentaron (Figura 16).



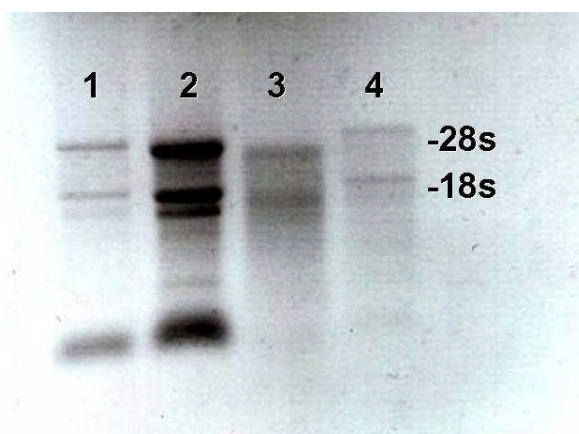
**Figura 16. Muestras de RNA de semillas *C. euryphyllidia*. 1 embrión, 2 megagametofito.**

Durante el proceso de extracción para el **protocolo 7**, las muestras provenientes de megagametofito formaban un líquido viscoso y blanquecino (debido a proteínas y carbohidratos). Al final del proceso las pastillas de los embriones cigóticos eran grisáceas y pequeñas, al resuspenderlos se obtuvo una muestra ligeramente viscosa. Las pastillas obtenidas de los megagametofitos eran grandes y muy blancas, resuspenderlas fue muy difícil teniendo que emplearse hasta 1ml de H<sub>2</sub>O, la muestra era tan viscosa que se formó una masa gelatinosa generada por la alta concentración de carbohidratos. Las muestras provenientes de los embriones somáticos formaron pastillas muy pequeñas y semitransparentes, fáciles de resuspender. La electroforesis mostró RNA proveniente sólo de los embriones cigóticos y de megagametofito de *C. euryphyllidia* (Figura 17).

Para los **protocolos 9 y 10** se utilizaron megagametofitos de *C. norstogii*, durante el paso de precipitación se compararon dos procedimientos: isopropanol y acetato de sodio 3M pH 5.5 y CLi 12M, ambos durante toda la noche. La electroforesis reveló que en ambos protocolos se lograba la extracción de RNA, sin embargo, con el buffer del **protocolo 9** extrajo una menor cantidad de RNA que con el buffer del **protocolo 10**. Al comparar los procesos de precipitación se observó que el isopropanol-acetato de sodio 3M pH 5.5 favoreció la extracción de una mayor cantidad de RNA que con el cloruro de litio (Figura 18).

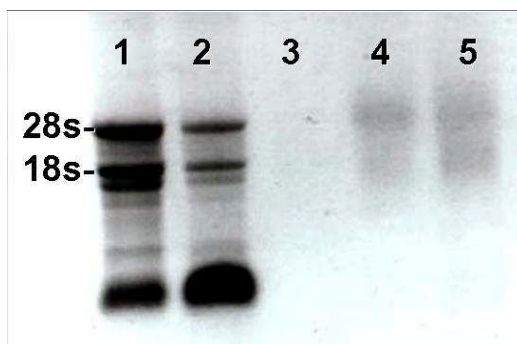


**Figura 17. Electroforesis de muestras de RNA. (1) Embriones somáticos de *Z. fisheri*; *C. euryphyllidia* (2) embrión cigótico, (3) megagametofito; (4, 5, 6) megagametofito *C. norstogi*.**



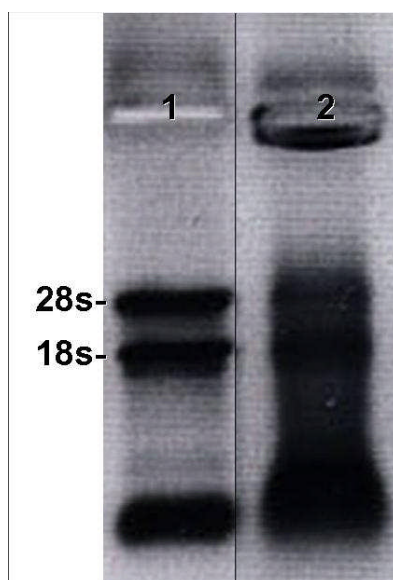
**Figura 18. Electroforesis de muestras de RNA de megagametofito de *C. norstogii*. (1) protocolo 9 y (2) protocolo 10 precipitación con isopropanol y acetato de sodio 3M pH 5.5; (3) protocolo 9 y (4) protocolo 10 precipitación con CILi 12M.**

Debido a estos resultados se probó el **protocolo 10** con semillas de *C. norstogii* (megagametofito 500mg) y embriones somáticos de *Z. fisheri* (5g) se utilizó isopropanol y acetato de sodio para la precipitación. En el caso de *C. norstogii* las pastillas eran pequeñas, ligeramente blancas y fáciles de resuspender. Los embriones somáticos produjeron pastillas pequeñas, casi transparentes y resuspenderlos resultó muy fácil. La electroforesis reveló bandas muy claras en las muestras de *C. norstogii* (Figura 19). No obstante que se obtuvieron bandas muy difusas, este resultado fue alentador en el análisis de los embriones somáticos (Figura 19).



**Figura 19. Electroforesis de muestras de RNA (1, 2) megagametofito de *C. norstogii*.; (4, 5) embriones somáticos de *Z. fischeri*.**

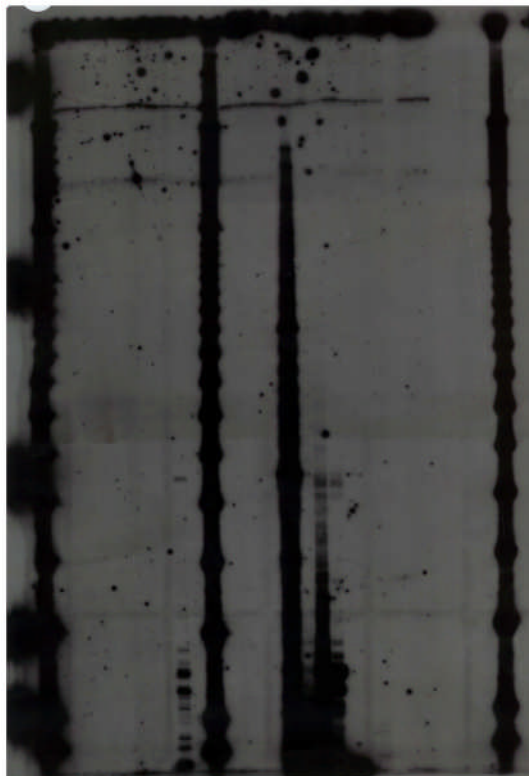
El **protocolo 11** (Apéndice I) se empleó como alternativa para la extracción, se utiliza un buffer empleado para el aislamiento de RNA de hojas de agave, ya que son plantas cuyos tejidos presentan altas concentraciones de polisacáridos y proteínas, este buffer fue empleado por primera vez para el aislamiento de RNA total de cofía, raíz y hoja de *Zea mays* (Rochester *et al.* 1986). Con el **protocolo 11** se logró la obtención de RNA a partir de la hoja y embriones somáticos de *C. euryphyllidia*, sin, embargo las muestras obtenidas aún presentaban contaminación de carbohidratos y proteínas por lo que se procedió a realizar una segunda purificación a partir del primer lavado con fenol:cloroformo y realizando una segunda precipitación toda la noche con isopropanol y acetato de sodio 3M pH 5.5 (figura 20).



**Figura 20. RNA de *C. euryphyllidia*; 1 hoja, 2 embrión somático.**

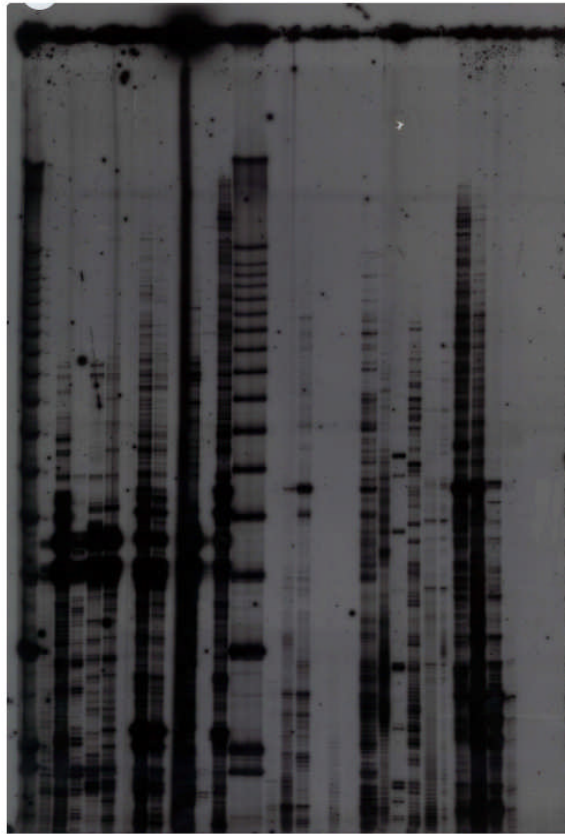
### ***Despliegue diferencial***

Los geles se expusieron a placas radiográficas para obtener los patrones de expresión de las muestras analizadas. Las placas mostraron bandas discretas de bajo peso molecular en algunas de las muestras, pero gran parte de la señal radioactiva se acumuló a la altura de los pozos del gel (Figura 21), esto pudo ser el resultado de acumulación de urea en los pozos lo que impidió el desplazamiento de las muestras.



**Figura 21. Despliegue diferencial en gel de poliacrilamida 6% de urea 8M**

Se repitió el procedimiento lavando los pozos justo antes de cargar las muestras, se sometió al proceso de desnaturalización a la mitad de las muestras y mientras éstas fueron cargadas se desnaturalizó a la otra mitad. Las placas del segundo (Figura 22) despliegue diferencial mostraron que una mayor cantidad de las muestras se desplazaron por el gel pero aún se obtuvieron carriles en blanco. Se presentó un fenómeno extraño, las muestras se corrieron por duplicado para eliminar la posibilidad de falsos positivos, pero en muchos casos uno de los duplicados apareció en blanco mientras que el otro mostró bandas discretas.



**Figura 22. Despliegue diferencial en gel de poliacrilamida 6% de urea 8M.**



### Genoteca

Se logró la extracción de RNA de embriones somáticos de *Zamia pumila* utilizando el protocolo 11 (Figura 23). La condición de dichos embriones difería de los anteriormente empleados para realizar el Despliegue diferencial, presentaban muy baja o nula señal de estrés oxidativo (Figura 24).

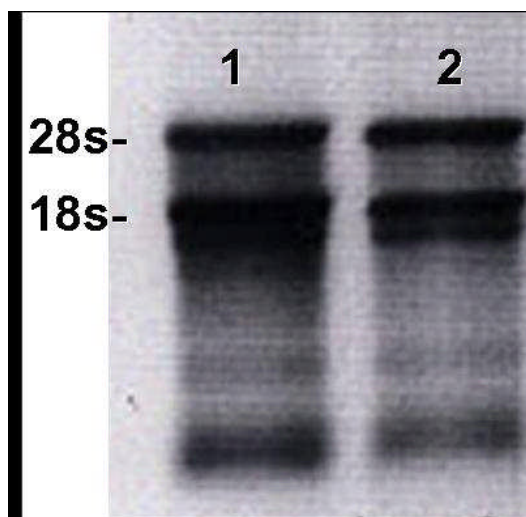


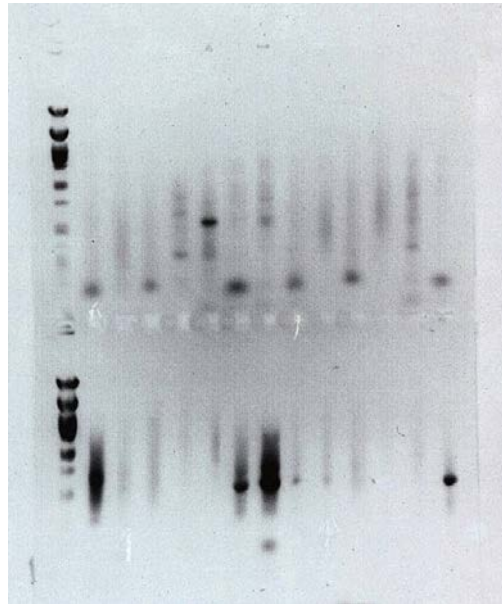
Figura 23. Muestras de RNA de embriones somáticos de *Z. pumila*.



Figura 24. Embriones somáticos de *Z. pumila*

A partir del RNA total se purificó RNA poli-A y se realizó RT-PCR para obtener cDNA, la figura 25 muestra que todas las combinaciones de

oligonucleótidos utilizadas amplificaron obteniendo un gran rango de fragmentos de cDNA.



**Figura 25. Gel de electroforesis de cDNA de embriones somáticos de *Z. pumila*.**

La comparación de las secuencias de las colonias de *E. coli* transformadas con el plásmido pGEM que contenían los fragmentos de cDNA obtenido de los embriones somáticos de *Z. pumila* mediante análisis BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en el banco de genes mostró que ésta correspondía al gen de la enzima TAQ polimerasa (Figura 26). En el laboratorio se poseen cepas de *E.coli* transformadas con este gen para sintetizar la enzima, por lo que se sospechó que las bacterias utilizadas para la transformación o el medio de cultivo empleado estaban contaminados con esta cepa. Se seleccionaron 10 colonias al azar de diferentes cajas de Petri, se purificó el plásmido y se llevó a cabo un análisis de restricción utilizando la endonucleasa (EcoR1) para ver el porcentaje de contaminación por la cepa transformada con TAQ polimerasa.

La figura 27 muestra el gel de electroforesis que se obtuvo a partir de los plásmidos purificados, a pesar de que en algunas muestras la cantidad de plásmido es muy pequeña se puede observar que todas las muestras tienen el mismo patrón de bandas, siendo la banda de mayor peso molecular la

correspondiente al plásmido sin inserto y la de menor peso molecular la del fragmento de DNA clonado. La banda correspondiente al plásmido se encuentra en un rango de 5kb lo que indica es el vector utilizado para clonar la enzima TAQ polimersa y no el plásmido pGEM empleado para la clonación del cDNA de los embriones somáticos de *Z. pumila*.

```

> gb|J04639.1|TTHTAQPIA Thermus aquaticus DNA polymerase (PolI) gene
Length=2626

Score = 1386 bits (750), Expect = 0.0
Identities = 762/767 (99%), Gaps = 3/767 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 33  GGGGATGCTGCCCTCTTTGAGCCCAAGGCGGGTCTCCTGGTGGACGGCCACCACCT 92
          |||
Sbjct 126  GGGGATGCTGCCCTCTTTGAGCCCAAGGCGGGTCTCCTGGTGGACGGCCACCACCT 185

Query 93  GGCCTACCGCACCTTCCACGCCCTGAAGGCTCACCACCAGCCGGGGGAGCCGGTGCA 152
          |||
Sbjct 186  GGCCTACCGCACCTTCCACGCCCTGAAGGCTCACCACCAGCCGGGGGAGCCGGTGCA 245

Query 153  GCGGCTACGGCTTCGCCAAGAGCCTCCTCAAGGCCTCAAGGAGACGGGGACGCGGT 212
          |||
Sbjct 246  GCGGCTACGGCTTCGCCAAGAGCCTCCTCAAGGCCTCAAGGAGACGGGGACGCGGT 305

Query 213  GATCGTGGTCTTTGACGCCAAGGCCCTCCTTCCGCCACGAGGCCTACGGGGGTACAA 272
          |||
Sbjct 306  GATCGTGGTCTTTGACGCCAAGGCCCTCCTTCCGCCACGAGGCCTACGGGGGTACAA 365

Query 273  AGCGGGCCGGGCCCCACGCGGAGGACTTCCCGGCAACTCGCCCTCATCAAGGAGCT 332
          |||
Sbjct 366  AGCGGGCCGGGCCCCACGCGGAGGACTTCCCGGCAACTCGCCCTCATCAAGGAGCT 425

Query 333  GGTGGACCTCCTGGGCTGGCGGCCTCGAGTCCC GGGCTACGAGGCGGACGACCTCT 392
          |||
Sbjct 426  GGTGGACCTCCTGGGCTGGCGGCCTCGAGTCCC GGGCTACGAGGCGGACGACCTCT 485

Query 393  GGCCAGCCTGGCCAAGAAGCGGAAAAGGAGGCTACGAGGTCCACATCCTCACCCCGA 452
          |||
Sbjct 486  GGCCAGCCTGGCCAAGAAGCGGAAAAGGAGGCTACGAGGTCCGATCCTCACCCCGA 545

Query 453  CAAAGACCTTTACAGCTCCTTTCCGACCGCATCCACGTCTCCACCCCGAGGGGTACCT 512
          |||
Sbjct 546  CAAAGACCTTTACAGCTCCTTTCCGACCGCATCCACGTCTCCACCCCGAGGGGTACCT 605

Query 513  CATCACCCCGGCCTGGCTTTGGGAAAAGTACGGCCTGAGGCCCGACAGTGGGGCGACTA 572
          |||
Sbjct 606  CATCACCCCGGCCTGGCTTTGGGAAAAGTACGGCCTGAGGCCCGACAGTGGGGCGACTA 665

Query 573  CCGGGCCCTGACCGGGGACGAGTCCGACAACCTTCCCGGGTCAAGGGCATCGGGGAGAA 632
          |||
Sbjct 666  CCGGGCCCTGACCGGGGACGAGTCCGACAACCTTCCCGGGTCAAGGGCATCGGGGAGAA 725

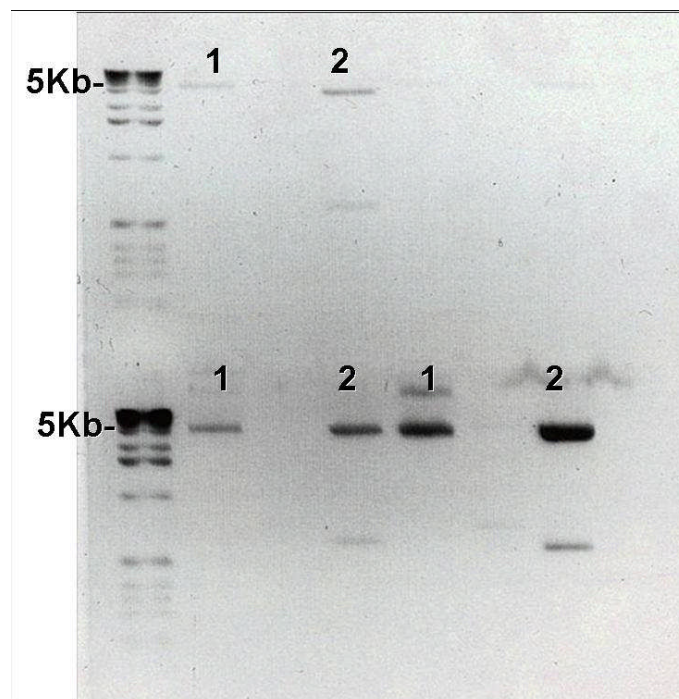
Query 633  GACGGCGAGGAACTTCTGGAGGAGTGGGGAGCCTGGAAGCCCTCCTCAAAGAACCTGG 692
          |||
Sbjct 726  GACGGCGAGGAACTTCTGGAGGAGTGGGGAGCCTGGAAGCCCTCCTCAAAG-AACTGG 784

Query 693  ACCGGCTGAAGCCCGCCATCCGGGAGAAGATCCTGGCCCACCATGGACGATCTGAAGCTC 752
          |||
Sbjct 785  ACCGGCTGAAGCCCGCCATCCGGGAGAAGATCCTGGCCCAC-ATGGACGATCTGAAGCTC 843

Query 753  TCCTGGGACCTGGCCAAGGTGCGCACCGAC-TGCCCTGGAGGTGGA 798
          |||
Sbjct 844  TCCTGGGACCTGGCCAAGGTGCGCACCGACCTGCCCTGGAGGTGGA 890

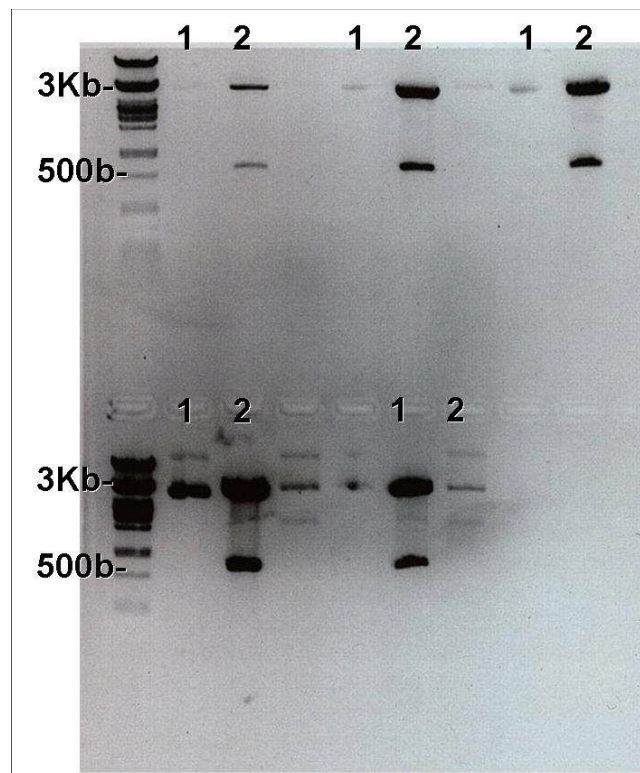
```

**Figura 26. Análisis BLAST del DNA extraído y secuenciado a partir de los cultivos de *E. coli* contaminados con cepas transformadas con el gen de TAQ polimerasa .**



**Figura 27. Análisis con enzimas de restricción del plásmido ligado al gen de la enzima TAQ polimerasa. 1 plásmido sin procesar, 2 plásmido cortado con enzimas de restricción.**

Dado que se contaba con más de 500 colonias con DNA clonado y seleccionar de éstas las que tenían el gen de la enzima TAQ polimerasa consumiría muchos recursos, se optó por llevar a cabo otra transformación utilizando células electrocompetentes nuevas. Se hizo el mismo proceso de selección de colonias transformadas y se tomaron 5 colonias al azar para hacer un análisis con enzimas de restricción. En la figura 28 se observan los patrones de bandas del plásmido y el DNA que estaba inserto en él, la banda correspondiente al plásmido sin inserto se encuentra en el rango de 3kb lo que corresponde al vector pGEM utilizado para clonar el cDNA de los embriones somáticos. Se purificó el plásmido de estas colonias y se mandó secuenciar el DNA inserto. A las secuencias obtenidas se les hizo un análisis con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dando como resultado secuencias parciales de diferentes partes del gen de rRNA 26s de *Zamia integrifolia* (figuras 29-32).



**Figura 28. Análisis con enzimas de restricción del plásmido PGEM. 1 plásmido sin procesar, 2 plásmido cortado con enzimas de restricción.**

```

gb|DQ008666.1| Zamia integrifolia 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=3123

Score = 861 bits (466), Expect = 0.0
Identities = 503/521 (96%), Gaps = 1/521 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 144 GCGGCCGAGTGTAGGTCGCGCGCTTCAGCGCCATCCATTTTCGGGGCTAGTTGATTTCGGC 203
          |||
Sbjct 1330 GCGGCCGAGTGTAGGTCGCGTGCTTCAGCGCCATTCATTTTCGGGGCTAGTTGATTTCGGC 1271

Query 204 AGGTGAGTTGTTACACACTCCTTAGCGGATTCGACTTCCATGACCACCGTCCCTGCTGTC 263
          |||
Sbjct 1270 AGGTGAGTTGTTACACACTCCTTAGCAGATTCGACTTCCATGACCACCGTCCCTACTGTC 1211

Query 264 TTAATCAACCAACACCCCTTTGTGGGATCTGGGTTAGCGCGCAGTCCGGCACCGTAACCTCG 323
          |||
Sbjct 1210 TTAATCAACCAACACCCCTTTGTGGGATCTGGGTTAGCGCGCAGTCCGACACCGTATCTCG 1151

Query 324 GCTTTCGGTTCATCCCGCATCGCCAGTTCTGCTTACCAAAAATGGCCACTTGAAGCTCT 383
          |||
Sbjct 1150 GCTTTCGGTTCATCCACATCGCCAGTTCTGCTTACCAAAAATGGCCACTTGAAGCTCT 1091

Query 384 CGATTCGCGGCACGGCTCAACCAAGCAGCCAGCCGCTTACCTATTTAAAGTTTGAGA 443
          |||
Sbjct 1090 CGATTCGCGGCACAGCTCAACCAAGCAGCCAGCCGCTTACCTATTTAAAGTTTGAGA 1031

Query 444 ATAGGTCGAGGGCGTTGCGTCCCGATGCCTCTAATCATTGCTTTACCTGATAAAACTC 503
          |||
Sbjct 1030 ATAGGTCGAGGGCGTTGCGTCCCGATGCCTCTAATCATTGCTTTACCTGATAAAACT- 972

Query 504 CGCAAGCGAGCTCCAGCTATCCTGAGGGAAACTTCGGAGGAAACCAGCTACTAGACGGTT 563
          |||
Sbjct 971 CGCAAGCGAGCTCTAGCTATCCTGAGGAAACTTCGGAGGAAACCAGCTACTAGACGGTT 912

Query 564 CGATTAGTCTTTTCGCCCTATACCCAAGTCAGACGAACGATTTGCACGTCAGTATCGCTA 623
          |||
Sbjct 911 CGATTAGTCTTTTCGCCCTATACCCAAGTCAGACGAACGATTTGCACGTCAGTATCGCTA 852

Query 624 CGGGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCACCCCTGCCCGG 664
          |||
Sbjct 851 CGGGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCACCCCTGCCCGG 811

```

**Figura 29. Análisis BLAST de las secuencias contenidas en los plásmidos pGEM mostrando la obtención de una secuencia parcial del gen 26S de RNA ribosomal de *Z. integrifolia*.**

```

> gb|DQ008666.1| Zamia integrifolia 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=3123

Score = 863 bits (467), Expect = 0.0
Identities = 504/522 (96%), Gaps = 1/522 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 143   GCGGCCGAGTGTAGGTCGCGCGCTTCAGCGCCATCCATTTTCGGGGCTAGTTGATTCGGC 202
          |||
Sbjct 1330   GCGGCCGAGTGTAGGTCGCGTGCCTCAGCGCCATTCATTTTCGGGGCTAGTTGATTCGGC 1271

Query 203   AGGTGAGTTGTTACACACTCCTTAGCGGATTCGACTTCCATGACCACCGTCC TGCTGTC 262
          |||
Sbjct 1270   AGGTGAGTTGTTACACACTCCTTAGCAGATTCGACTTCCATGACCACCGTCC TACTGTC 1211

Query 263   TTAATCAACCAACACCCCTTTGTGGGATCTGGGTTAGCGCGCAGTCCGGCACCGTAACTCG 322
          |||
Sbjct 1210   TTAATCAACCAACACCCCTTTGTGGGATCTGGGTTAGCGCGCAGTCCGACACCGTATCTCG 1151

Query 323   GCTTTCGGTTCATCCCACATCGCCAGTTCTGCTTACCAAAAATGGCCACTTGAAGCTCT 382
          |||
Sbjct 1150   GCTTTCGGTTCATCCCACATCGCCAGTTCTGCTTACCAAAAATGGCCACTTGAAGCTCT 1091

Query 383   CGATTCCGCGGCACGGCTCAACCAAGCAGCCAGCCGCTTACCTATTTAAAGTTTGAGA 442
          |||
Sbjct 1090   CGATTCCGCGGCACAGCTCAACCAAGCAGCCAGCCGCTTACCTATTTAAAGTTTGAGA 1031

Query 443   ATAGGTCGAGGGCGTTGCGTCCCGATGCCTCTAATCATTTCGCTTTACCTGATAAAACTC 502
          |||
Sbjct 1030   ATAGGTCGAGGGCGTTGCGTCC TAGATGCCTCTAATCATTTCGCTTTACCTGATAAAACT- 972

Query 503   CGCAAGCGAGCTCCAGCTATCCTGAGGGAAACTTCGGAGGAAACCAGCTACTAGACGGTT 562
          |||
Sbjct 971   CGCAAGCGAGCTCTAGCTATCCTGAGGAAACTTCGGAGGAAACCACTACTAGACGGTT 912

Query 563   CGATTAGTCTTTTCGCCCTATACCCAAGTCAGACGAACGATTTGCACGTCAGTATCGCTA 622
          |||
Sbjct 911   CGATTAGTCTTTTCGCCCTATACCCAAGTCAGACGAACGATTTGCACGTC AATATCGCTA 852

Query 623   CGGGCCTCCACCAGAGTTTCTCTGGCTTCACCCGTGCCCGGG 664
          |||
Sbjct 851   CGGGCCTCCACCAGAGTTTCTCTGGCTTCACCCGTGCTCGGG 810

```

**Figura 30. Análisis BLAST de las secuencias contenidas en los plásmidos pGEM mostrando la obtención de una secuencia parcial del gen 26S de RNA ribosomal de *Z. integrifolia*.**

```

> gb|DQ008839.1| Zamia integrifolia large subunit ribosomal RNA gene,
partial
sequence; mitochondrial
Length=2779

Score = 893 bits (483), Expect = 0.0
Identities = 493/497 (99%), Gaps = 3/497 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 143 ATCAACGCAGAGTGAATCGGTCCTAAGGAACCCCGAAAGGGCTGCCGTCCGATGGGTA 202
      ||| |||
Sbjct 1422 ATCTACGCAGAGTGAATCGGTCCTAAGGAACCCCGAAAGGGCTGCCGTCCGATGGGTA 1481

Query 203 CACGAAAGTGACGAAGTTGCTTCGACTACTGAACCATGCGTGTCCGTGAAGTGAATTGG 262
      ||| |||
Sbjct 1482 CACGAAAGTGACGAAGTTGCTTCGACTACTGAACCATGCGTGTCCGTGAAGTGAATTGG 1541

Query 263 ATGATTGGGCCGAGGGCTGCCCCCTCTCCCTTCGCTCTCTTTCCCTAAGAATTGAATG 322
      ||| |||
Sbjct 1542 ATGATTGGGCCGAGGGCTGCCCCCTCTCCCTTCGCTCTCTTTCCCTAAGAATTGAATG 1601

Query 323 AATTGCCGCAAGAAGAAGCGCACTTTTGTGGGGTTCAACTTACAGGAAAAAACTTCGA 382
      ||| |||
Sbjct 1602 AATTGCCGCAAGAAGAAGCGCACTTTTGTGGGGTTCAACTTACAGGAAAAAACTTCGA 1661

Query 383 ATTGGGAGGGCGATCCTCCCGGTGAACCTAACCGTACCCCAAACCGACACAGGTGAACAGG 442
      ||| |||
Sbjct 1662 ATTGGGAGGGCGATCCTCCCGGTGAACCTAACCGTACCCCAAACCGACACAGGTGAACAGG 1721

Query 443 TAGAGTATACTAGGGCGCTTGAGAGAACCATGTTGAAGGAACTCGGC AAAATGACCCCGT 502
      ||| |||
Sbjct 1722 TAGAGTATACTAGGGCGCTTGAGAGAACCATGTTGAAGGAACTCGGC AAAATGACCCCGT 1781

Query 503 AACTTCGGGGAGAAGGGGTGCTCTCCTATCTCTGGATCGGGAGAGCGGCACATTACCAGG 562
      ||| |||
Sbjct 1782 AACTTCGGG-AGAAGGGGTGCTCTCCTATCTCTGGATCGGGAGAGCGGCACAT-ACCAGG 1839

Query 563 GGGTAGCGACTGTTTATTA AAAACACAGGACTCTGCTAAGTGGTAACACGATGTATAGAG 622
      ||| |||
Sbjct 1840 GGGTAGCGACTGTTTATTA AAAACACAGGACTCTGCTAAGTGGTAACACGATGTATAGAG 1899

Query 623 TCTGACACCTGCCCCG 639
      ||| |||
Sbjct 1900 TCTGACACC-TGCCCG 1915

```

**Figura 31. Análisis BLAST de las secuencias contenidas en los plásmidos pGEM mostrando la obtención de una secuencia parcial del gen 26S de RNA ribosomal de *Z. integrifolia*.**



```

> gb|DQ629322.1| Zamia integrifolia large subunit ribosomal RNA gene,
partial
sequence; chloroplast
Length=2426

Score = 974 bits (527), Expect = 0.0
Identities = 541/541 (100%), Gaps = 0/541 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 128 CGCCCGGGCCTGGTCACTGCGACCTCCTTTGTGAGGAGGCACCCCTTCTCCCGAAGTTAC 187
      |||
Sbjct 1464 CGCCCGGGCCTGGTCACTGCGACCTCCTTTGTGAGGAGGCACCCCTTCTCCCGAAGTTAC 1405

Query 188 GGGGCTATTTTGCCGAGTTCCTTAGAGAGAGTTGTCTCGGCCCTAGGTATTCTCTACC 247
      |||
Sbjct 1404 GGGGCTATTTTGCCGAGTTCCTTAGAGAGAGTTGTCTCGGCCCTAGGTATTCTCTACC 1345

Query 248 TACCTACCTGTGTCCGTTTCGGGTACAGGTACCCGTTTGTGAAGGTCGTCGAGCTTTT 307
      |||
Sbjct 1344 TACCTACCTGTGTCCGTTTCGGGTACAGGTACCCGTTTGTGAAGGTCGTCGAGCTTTT 1285

Query 308 CCTGGGAGTATGGCATGGGTTACTTCGGCGCGTAGCGCCTGGTACTCGGACATTGGCTC 367
      |||
Sbjct 1284 CCTGGGAGTATGGCATGGGTTACTTCGGCGCGTAGCGCCTGGTACTCGGACATTGGCTC 1225

Query 368 GAGGCATTTTCTCTACCTCTTCTTACCTGaaaaaaaaGCAAGGTCACCTTGCCTCCTTGA 427
      |||
Sbjct 1224 GAGGCATTTTCTCTACCTCTTCTTACCTGAAAAAAGCAAGGTCACCTTGCCTCCTTGA 1165

Query 428 ACCGATAACCATCTTTTCGGCTAACCTAGCCTCCTTCGTCCTCGGGACCAACAAGGGGTA 487
      |||
Sbjct 1164 ACCGATAACCATCTTTTCGGCTAACCTAGCCTCCTTCGTCCTCGGGACCAACAAGGGGTA 1105

Query 488 GTACAGGAATATTCACCTGTTGTCCATCGACTACGCCTTTCGGCCTGATCTTAGGCCCTG 547
      |||
Sbjct 1104 GTACAGGAATATTCACCTGTTGTCCATCGACTACGCCTTTCGGCCTGATCTTAGGCCCTG 1045

Query 548 ACTCACCTCCGTTGGACGAACTTCGGGAGGAACCCTTAGGTTTTCGGGGCATTGGATTTC 607
      |||
Sbjct 1044 ACTCACCTCCGTTGGACGAACTTCGGGAGGAACCCTTAGGTTTTCGGGGCATTGGATTTC 985

Query 608 TCACCAATGTTTGCCTTACTCAAGCCGACATTCTCGCTTCGGCTTCGTCCACACCTGCCC 667
      |||
Sbjct 984 TCACCAATGTTTGCCTTACTCAAGCCGACATTCTCGCTTCGGCTTCGTCCACACCTGCCC 925

Query 668 G 668
      |
Sbjct 924 G 924

```

**Figura 32. Análisis BLAST de las secuencias contenidas en los plásmidos pGEM mostrando la obtención de una secuencia parcial del gen 26S de RNA ribosomal de *Z. integrifolia*.**

## DISCUSIÓN

Los bosques y selvas han sido parte integral de la historia del ser humano así como un recipiente de la biodiversidad del planeta, han proveído de materias primas y alimento al hombre. Sin embargo el deterioro ambiental y la deforestación han destruido total o parcialmente gran parte de los bosques y selvas de nuestro planeta. Además se está perdiendo la variabilidad genética de muchas especies ya que las poblaciones se han reducido dramáticamente y los pocos especímenes que sobreviven lo hacen en pequeños grupos aislados unos de otros por lo que el flujo genético resulta muy difícil. Para conservar y mantener a los bosques y selvas se han utilizado diferentes métodos convencionales para propagar e incrementar las poblaciones naturales de especies en peligro de extinción así como de las especies económicamente importantes, sin embargo la mayoría de los esfuerzos se concentran en las últimas.

La conservación de las cícadas en México está influenciada por muchos aspectos, entre los más importantes podemos mencionar (Programa Nacional de Cícadas, 2000):

1. Rareza natural de especies.
2. Destrucción del hábitat.
3. Colecta ilegal de especies por traficantes especializados.
4. Legislación ineficiente para la protección del entorno natural.
5. Escaso desarrollo del conocimiento del grupo dada la falta de especialistas.
6. La falta de criterios adecuados para establecer viveros.

Estos factores han puesto en serio peligro a gran parte de las especies de cícadas que habitan nuestro país.

Se ha sugerido que si la demanda de ejemplares de cícadas se cubriera mediante la propagación artificial y la producción a gran escala entonces no habría necesidad de saquear las poblaciones naturales (Dehgan 1983, 1996a, 1996b; Dehgan y Almira 1993; Giddy 1993). A pesar a los esfuerzos iniciados en México a principios de la década de los 90 del siglo pasado, por grupos de investigación del Instituto de Ecología, A. C., el Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Veracruzana, ambos en Xalapa, Ver., que fundaron viveros rústicos para ayudar al la propagación con fines comerciales y

para la reintroducción de especies como *Dioon edule*, *Dioon spinulosum*, *Ceratozamia mexicana* y *Zamia furfuracea* en el estado de Veracruz; y en Chiapas el Instituto de Historia Natural, a través del Departamento de Áreas Naturales, y en colaboración con la Escuela de Biología de la Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas y el Instituto Nacional de Ecología que crearon viveros para propagar especies como *Dioon merolae*, *Ceratozamia nortogii*, *Zamia soconuscensis* y *Ceratozamia matudai* en comunidades de la Reserva de la Biósfera La Sepultura y El Triunfo (Vovides *et al.*, 1999), no se ha logrado disminuir las presiones que se ejercen sobre las poblaciones naturales.

Los métodos tradicionales para propagar árboles son lentos, poco productivos y no pueden ser utilizados para mejorar genéticamente a los mismos. Esto es debido a que la mayoría de las especies son de lento crecimiento, tienen largos ciclos de vida, y no pueden ser auto-polinizadas, por lo que para superar estas limitaciones se han buscado alternativas biotecnológicas tales como el cultivo de tejidos vegetales y la transformación genética.

Aunque se han obtenido algunos resultados positivos para la micropropagación de la cícadas de México (Chávez *et al.*, 1992a, 1992b, 1992c, 1998), éstos no han sido utilizados para desarrollar protocolos comerciales o para la reintroducción de las especies amenazadas, ya que los cultivos de embriones han demostrado ser altamente recalcitrantes. La oxidación de los explantes durante el inicio de los cultivos es causa frecuente de que los cultivos se vuelvan recalcitrantes de manera temprana en tejidos que contienen una alta concentración de compuestos fenólicos (Kumar *et al.*, 1998), tal como se ha observado en los cultivos embriogénicos con los que se trabajó. Aunque por lo general este problema se asocia con tejidos de especies leñosas ya que producen una gran cantidad de compuesto fenólicos durante la lignificación, se ha observado que especies que producen algún metabolito secundario se han oxidado cuando entran en contacto con el medio de cultivo (Bhat y Chandel, 1991).

Resulta difícil comenzar investigaciones en campos como la biología molecular y el cultivo de tejidos vegetales en especies poco estudiadas y que se encuentran en peligro de extinción ya que el material biológico es limitado o

difícil de conseguir y se debe ser cuidadoso para no desperdiciarlo. La escasez de estudios de biología molecular en este grupo de plantas es debido, en parte, a que las cícadas son recalcitrantes para los estudios de biología molecular, ya que a diferencia de muchas plantas usadas como modelo por los investigadores, las cícadas son dioicas, producen números limitados de semillas y tardan hasta 30 años para alcanzar la madurez sexual (Brenner *et al.*, 2003), por lo que muy pocas personas se aventuran a realizar dichas investigaciones. Además los genomas de las cícadas son muy grandes (20 000-30 000 millones de pares de bases) (Ohri y Khoshoo, 1986; Murray, 1998) en comparación de los de plantas como *Arabidopsis* (125 millones de pares de bases) (Nature, 2000).

Se sabe que el aislamiento de RNA intacto y sin contaminación es esencial para analizar la expresión de genes y la clonación de dichos genes. Sin embargo, el tejido de especies leñosas y semileñosas en general es notorio porque resulta muy difícil el aislamiento y obtención de RNA libre de contaminación. Esta dificultad es debida en principio a la presencia de polisacáridos y/o polifenoles que se presentan naturalmente y que son liberados cuando las células son fragmentadas (Cheng y Seemann, 1998). Los metabolitos secundarios incluyendo compuestos fenólicos y polisacáridos de alto peso molecular pueden interferir con el aislamiento de ácidos nucleicos si estos se co-purifican durante la extracción (Loomis, 1974; Stokes *et al.*, 1990). Estos compuestos forman complejos con los ácidos nucleicos durante la extracción del tejido y coprecipitan durante las siguientes etapas de precipitación con alcohol (López-Gómez y Gómez-Lim, 1992; Newbury y Possingham, 1977; Wang y Vodkin, 1994).

Los factores mencionados nos indican la dificultad natural que implica la extracción de RNA de tejidos vegetales que se encuentran en buen estado, dicha problemática puede variar de especie en especie. Se sabe que en muchas ocasiones el RNA extraído de gimnospermas por métodos convencionales sólo puede ser usado para análisis por Northern blot y la cantidad que se extrae es muy baja para otro tipo de análisis (Claros y Canovas, 1998), debido en su mayor parte a la presencia de polisacáridos, metabolitos secundarios y pigmentos que co-purifican con el RNA y que inhiben las enzimas requeridas para otras aplicaciones (Pandey *et al.*, 1996), estos

problemas se observaron en todos los protocolos en los que se trató de extraer RNA de las semillas y embriones cigóticos de las diferentes especies de cícadas, donde existían dificultades para obtener muestras de RNA libres de carbohidratos y fenoles.

Estos problemas pueden acentuarse dependiendo del estado fisiológico del tejido del que se va a extraer el RNA, en el caso de los embriones somáticos que se utilizaron para hacer los ensayos para la extracción de RNA existía un proceso por el que estas dificultades se incrementaban, el estrés oxidativo.

Se sabe que la exposición de las plantas a factores abióticos incluyendo altas y bajas temperaturas causa estrés oxidativo en el cual se incrementa la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (Aroca *et al.*, 2001). Las ROS reaccionan con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos causando inmenso daño celular, por lo que las plantas han desarrollado sistemas y mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para protegerse de estas sustancias (Inzé y Van Montagu, 1995). Las ROS también pueden ser generadas por heridas y resultan en un incremento en la actividad de las enzimas catalasas y peroxidasas (Salin y Bridges, 1981; Thompson *et al.*, 1987) las cuales actúan para contrarrestar los efectos de los radicales oxidativos.

Benson (2000) propuso que las manipulaciones hechas durante el cultivo de tejidos causan grandes cambios metabólicos y del desarrollo, algunos de los cuales predisponen a los cultivos *in vitro* a la formación elevada de radicales libres, resultando en disfunciones celulares y cultivos recalcitrantes. Los embriones somáticos de cícadas que se tienen en el laboratorio han estado en cultivo proliferativo por muchos años, alrededor diez en el caso de *C. euryphyllidia* y cerca de 19 en el resto de las especies, y durante este tiempo gran parte de los cultivos han padecido de estrés oxidativo, el cual se manifiesta como un oscurecimiento del tejido.

El oscurecimiento de los cultivos seguidos de su muerte atribuido a la oxidación de compuestos fenólicos es uno de los mayores problemas para el establecimiento de cultivos de plantas leñosas (Thomas y Ravindra, 1997). Las interacciones fenólicas expresadas como oscurecimiento del explante pueden llevar a la muerte del tejido vegetal (Taji y Williams, 1996), este ha sido el caso

de muchos de los cultivos de embriones somáticos de cícadas que se tienen en el laboratorio.

La severidad de este oscurecimiento varía de acuerdo a la especie, tejido u órgano, fase del desarrollo de la planta, edad del tejido u órgano, tipo de medio y otros factores del cultivo *in vitro*. Beruto *et al.* (1996) confirmaron la formación de polímeros de fenol generados por la alta actividad de la enzima fenol oxidasa. Los compuestos fenólicos que se oxidan de manera natural y reaccionan covalentemente con quinonas se unen a los ácidos nucleicos (Loomis, 1974), estos compuestos oxidados presentes en los embriones somáticos de las diferentes especies de cícadas utilizadas pueden unirse irreversiblemente a proteínas y ácidos nucleicos para formar compuestos de alto peso molecular (Newbury y Possingham, 1977), además los polisacáridos tienden a co-precipitar con el RNA interfiriendo con la actividad de la transcriptasa reversa (Lodhi *et al.*, 1994; Richards *et al.*, 1994), de la DNA polimerasa y enzimas de restricción impidiendo de esta manera la generación de cDNA en algunas de las muestras que se utilizaron para hacer el despliegue diferencial, por lo que se observaban carriles en blanco o con muy pocas bandas. Aunque los embriones somáticos presentaban diferentes grados de oxidación no se sabía de antemano hasta que punto esto podría dificultar la extracción de RNA y otros procedimientos. En adición a esto se ocupó una mezcla de marcas radioactivas con actividades diferentes, una cuya vida media había pasado y otra que era casi nueva, por lo que el tiempo de exposición pudo no ser el adecuado para las muestras que incorporaron la marca cuya actividad era menor.

Otro factor que dificultó la obtención de resultados fue el buffer utilizado para extraer el RNA de embriones cigóticos y megagametofito que se empleó para hacer el despliegue diferencial ya que éste contenía clorhidrato de guanidina. Se ha observado que la guanidina libera componentes celulares tales como lípidos y polisacáridos que tal vez puedan inhibir algunas de las enzimas utilizadas y aplicaciones de biología molecular (Hughes y Galau, 1988). La destrucción de organelos compartimentalizados en presencia de guanidina resulta en la liberación de polifenoles que se oxidan y pueden reaccionar irreversiblemente con los ácidos nucleicos (Hughes y Galau, 1988, Logerman *et al.*, 1987). Bugos *et al.* (1995) reportó que la utilización de

guanidina en el buffer de extracción provoca una baja obtención de RNA y además observaron la presencia de contaminantes inhibitorios en tejidos con bajas concentraciones celulares incluyendo caña de azúcar y tejido de pinos (óvulos, plántulas, pinas y semillas), siendo estos problemas similares a los encontrados durante la extracción de RNA y el despliegue diferencial a partir de semillas, embriones somáticos y hojas de las diferentes especies de cícadras estudiadas. A pesar de que estos reportes pueden indicar que no es recomendable usar este compuesto para la extracción de RNA, no es posible saber con certeza si es que será un factor que impedirá el curso de la investigación hasta que no se han probado.

Al emplear embriones somáticos de *Z. pumila* sin signos de oxidación, la extracción de RNA resultó mas sencilla y éste tenía la pureza necesaria para realizar RT-PCR produciendo cDNA que pudo ser clonado y secuenciado para generar la genoteca, sin que surgieran problemas relacionados con la presencia de compuestos fenólicos. Por lo que para trabajar con plantas como las cícadras es necesario evitar los problemas de oxidación, tanto en estudios cultivo de tejidos como en biología molecular ya que de lo contrario el obtener resultados satisfactorios resultara muy difícil.

Sin embargo al evaluar la genoteca se obtuvieron solo secuencias parciales de RNA ribosomal, esto se debió a que solamente se utilizó una columna de purificación de mRNA, el manual del kit mRNA Purification Kit (Amersham Biosciences) menciona que usando una sola columna se puede obtener un 50% de RNA poli-A. Para poder evaluar adecuadamente el grado de representatividad de la genoteca se requiere hacer un gran número de secuenciaciones, desafortunadamente esto no fue posible en el presente estudio.

Existen pocas descripciones morfológicas del desarrollo de los embriones somáticos (Chávez, 1993), en el presente estudio se lograron identificar los diferentes estadios descritos por este autor. Sin embargo el proceso y los mecanismos mediante los cuales se induce la embriogénesis somática en cícadras no han sido estudiados a nivel molecular y bioquímico a diferencia de otras especies de gimnospermas, sobre todo especies maderables tales como *Picea glauca* donde se han identificado genes expresados durante el desarrollo del embrión, genes que se expresan durante

la etapa de maduración de los cultivos y también durante etapas más avanzadas del desarrollo de la planta, y genes detectados durante todas las etapas del desarrollo del embrión así como en otros tejidos de la planta (Dong and Dunstan, 1996a, b; Dong and Dunstan, 2000). La utilización de EST's para realizar microarreglos y analizar el nivel de transcritos durante el desarrollo de varias especies de *Picea* ha revelado la importancia que tienen de las etapas tempranas de la embriogénesis para el éxito de todo el proceso y se han encontrado genes que son candidatos para mejorar la calidad de los embriones que se producen (van Zyl et al., 2002; Stasolla et al., 2003).

Aunque la embriogénesis somática tiene un inmenso potencial para la micropropagación de especies forestales (Attree and Fowke 1993; Gupta et al. 1993) se han establecido pocos protocolos a nivel mundial para la propagación comercial de estas plantas incluyendo las cícadas en comparación con otras plantas (Tabla 5). Sin embargo la embriogénesis somática tiene gran importancia para la biotecnología forestal por dos razones. Primera, ofrece la capacidad de producir números ilimitados de embriones somáticos (Attree et al. 1994) y semillas artificiales (Lulsdorf 1993). Segunda, los cultivos embriogénicos pueden ser utilizados para realizar estudios de transformación ya que el desarrollo de protocolos de regeneración *in vitro* es pre-requisito para realizar dichas investigaciones. La transformación de especies forestales con genes quiméricos con importancia académica y agronómica ha sido demostrada (Pena y Seguin 2001; van Raemdonck *et al.* 2001; Fenning y Gershenzon 2002; Herschbach y Kopriva 2002; Campbell *et al.* 2003) (Tabla 6).

Por lo expuesto anteriormente es importante hacer notar que el presente trabajo puede ser tomado como el pionero de los estudios moleculares de los embriones somáticos de cícadas encaminado a establecer las bases que rigen dicho proceso y su posterior aplicación en la conservación y comercialización de este grupo de plantas.



**Tabla 5. Algunos reportes de especies de árboles micropropagadas. Nodal (N), Hoja (H), Raíz (R), Semilla (S), Brote Axilar (Ba), Entrenudo (E), Cotiledón (C), Producción de Múltiples Brotes (PMB) (Modificada de Giri *et al.* 2004)**

ESPECIE	TIPO DE EXPLANTE	COMPOSICIÓN DEL MEDIO		RESPUESTA AL CULTIVO	RESPUESTA AL ENRAIZAMIENTO		REFERENCIA
		MEDIO	RC		MEDIO	RC	
<i>Acacia auriculiformis</i>	N	MS	BA 1.1 mg/l ANA 0.2 mg/l	PMB	MS	IBA 0.5 mg/l	Reddy <i>et al.</i> 1995
<i>Azadirachta indica</i>	H	MS	BA 2.0 mg/l IAA 0.1 mg/l	PMB	MS	IBA 1.0 mg/l	Salvi <i>et al.</i> 2001
<i>Albizzia julibrissin</i>	R	B5	BA 2.8 mg/l Zeatina 2.1 mg/l TDZ 0.01 mg/l	PMB	B5	IBA 0.1 mg/l	Sankhla <i>et al.</i> 1996
<i>Litchi chinensis</i>	S	MS	BA 20.0 mg/l	PMB	1/2MS	IBA 2.0 mg/l	Das <i>et al.</i> 1999
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Ba, E	MS	IAA 0.1 mg/l KN 0.3 mg/l IBA 1.0 mg/l	PMB	MS	KN 0.1 mg/l.	Villarreal y Rojas 1996
<i>Sesbania grandiflora</i>	C, S	MS	ANA 1.0 mg/l	PMB	MS	ANA 1.0 mg/l	Detrez <i>et al.</i> 1994
<i>Tamarix gallica</i>	N	LS	BA 0.8 mg/l	PMB	LS	IBA 0.1 mg/l	Lucchesini <i>et al.</i> 1993

**Tabla 6. Reportes de especies de árboles transformados. *Agrobacterium* (Ag), Bombardeo con micro-proyectiles (BMP), Callo (C), Embrión somático (ES), Embrión somático maduro (ESM), Hipocótilo (Hp), Hoja (H). (Modificada de Giri *et al.* 2004)**

<b>ESPECIE</b>	<b>TIPO DE TEJIDO</b>	<b>MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN</b>	<b>GENES TRANSFERIDOS</b>	<b>PLANTAS TRANSGÉNICAS</b>	<b>REFERENCIA</b>
<i>Allocasurina Verticillata</i>	Hp	Ag	UidA, nptII	Si	Franché <i>et al.</i> 1999
<i>Coffea canephora</i>	H	Ag	UidA, hpt	Si	Hatanaka <i>et al.</i> 1999
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	H	Ag	nptII, UidA	C	Mullins <i>et al.</i> 1997
<i>Picea glauca</i>	ES	BMP	nptII, UidA	SE	Bommineni <i>et al.</i> 1993
<i>P. mariana</i>	ES	BMP	hpt, UidA	Si	Tian <i>et al.</i> 2000
<i>Larix kaempferi</i> , <i>L. decidua</i>	ESM	Ag	nptII	Si	Levee <i>et al.</i> 1997

## CONCLUSIONES

1. Se pudieron reconocer a nivel morfológico los diferentes estadios de los embriones somáticos de *C. eryphyllidia* y *Z. pumila*.
2. Se logró establecer un protocolo de extracción de RNA para embriones somáticos de cíadas.
3. El estado fisiológico del tejido del que se desea extraer RNA es muy importante y determina la eficiencia del método de extracción.
4. Los compuestos fenólicos oxidados producidos por el estrés oxidativo de los embriones somáticos de cíadas interfieren con la extracción de RNA y afectan la eficiencia de las enzimas utilizadas en técnicas de biología molecular tales como RT-PCR y PCR, sin importar si el grado de oxidación es bajo. Por lo que no fue posible caracterizar a nivel molecular los diferentes estadios de los embriones somáticos de cíadas.
5. No es recomendable la utilización de buffers de extracción de RNA que contengan clorhidrato de guanidina en tejidos de embriones somáticos y cigóticos de cíadas.
6. Para lograr la extracción de RNA de embriones somáticos de cíadas es necesario que éstos no presenten señales de estrés oxidativo.
7. Aunque se logró purificar RNA de los embriones somáticos de cíadas para iniciar una genoteca, no fue posible evaluarla de manera adecuada debido a que no se pudieron hacer un gran número de secuenciaciones de los fragmentos de cDNA clonados en los plásmidos.

## APÉNDICE I

### Protocolo 1: Fresa

#### *Buffer de extracción*

- Tris-HCl 1M pH 7.4.
- EDTA 0.5M pH 8.
- NaCl 5M.
- SDS 20%.
- $\beta$ -Mercaptoetanol.

#### *Buffer TE*

- Tris-HCl 10mM p7.5.
- EDTA 1mM.

#### *Metodología*

- Homogeneizar 2g de tejido con N líquido.
- Agregar el buffer de lisis.
- Agregar 140 $\mu$ l de  $\beta$ -Mercaptoetanol agitar en vortex.
- Añadir SDS 20% agitar en vortex.

#### *Eliminación de proteína*

- Incubar 15 min a 54°C.
- Añadir 3.3ml de acetato de potasio 5M agitar en vortex.
- Enfriar a -20°C 10 min.
- Centrifugar a 15,000 rpm x 30 min a 4°C.
- Recuperar sobrenadante.

#### *Recuperación de ácidos nucleicos*

- Añadir 7ml de isopropanol agitar en vortex. Enfriar 1 h a -20°C (se puede toda la noche).
- Centrifugar a 15,000 rpm x 30 min a 4°C. descartar sobrenadante. Secar la pastilla.
- Añadir 700 $\mu$ l de TE agitar en vortex para resuspender el pastilla. Enfriar en hielo de 3-5 min.
- Pasar la muestra a un tubo de 1.5ml. Repetir el paso anterior para recoger bien la muestra.
- Centrifugar 2min a 14,000 rpm. Recuperar sobrenadante.

- Añadir 15µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 500µl de isopropanol. Incubar a -20°C toda la noche.
- Centrifugar a 14,000 rpm x 15min. Descartar sobrenadante.
- Lavar el pastilla con EtOH 70% dos veces.
- Secar la pastilla a 37 °C.
- Resuspender en 2ml de H<sub>2</sub>O.

#### Precipitación de RNA

- Añadir 340µl de CILi 12M
- Incubar a 4°C toda la noche.
- Centrifugar 45min a 4°C.
- Lavar la pastilla con EtOH 70% y EtOH absoluto. Secar a 37°C.
- Resuspender en 50µl de H<sub>2</sub>O.

#### **Protocolo2: Kit de extracción de Eppendorf: Eppendorf® Perfect RNA Kits for Eukaryotic Cells Cat. No. EF3209B.**

#### **Protocolo 3: Kit de extracción de Qiagen: RNeasy Plant Mini Kit (20) Cat. No. 74903**

#### **Protocolo 4: Extracción de RNA total (Chang *et al.*, 1993)**

Las soluciones requeridas se diluirán en ddH<sub>2</sub>O tratada con dietil pirocarbonato (Sambrook *et al.*, 1989).

##### *Buffer de extracción*

- 2% de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio).
- 2% de PVP (polivinilpirrolidona K30).
- 100 mM Tris-HCl (pH 8.0).
- 25 mM EDTA.
- 2.0 M NaCl.
- 0.5 g/l espermidina.
- Mezclar y esterilizar en autoclave.
- 2% de β-mercaptoetanol (adicionar justo antes de usarse).
- Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

- 10M cloruro de litio.

## SSTE

- 1.0M NaCl.
- 0.5% SDS.
- 10mM Tris-HCl (pH 8.0).
- 1mM EDTA (pH 8.0).

### *Protocolo*

- Moler el tejido con nitrógeno líquido.
- Calentar 15ml de buffer de extracción a 65°C en baño maría, rápidamente adicionar de 2-3 gr de tejido y mezclar completamente mediante la inversión del tubo
- Extraer dos veces con un volumen igual de cloroformo:IAA separando las fases a 10,000 rpm a temperatura ambiente.
- Agregar CLi 10M en una proporción de  $\frac{1}{4}$  del volumen a la mezcla del sobrenadante. El RNA se precipita durante toda la noche a 4°C y se cosecha por centrifugación a 10,000 rpm por 20 min. Tiempos de precipitación más cortos pueden ser inadecuados para algunos propósitos; después de 1,2 y 6 horas de precipitación, el rendimiento fue, 30%, 65% y 90% respectivamente en relación al obtenido después de toda la noche.
- Disolver la pastilla en 500  $\mu$ L de SSTE. Cuando se va a extraer poli A(+) RNA, disolver el RNA total en 0.5% SDS en lugar de SSTE y proceder con la selección directamente.
- Extraer una vez con un volumen equivalente de cloroformo:IAA.
- Adicionar dos volúmenes de etanol al sobrenadante, precipitar a –70°C por al menos 30 min o por 2 h a –20°C.
- Centrifugar la pastilla de RNA en una microcentrífuga. Remover el sobrenadante y secar la pastilla. Resuspender en ddH<sub>2</sub>O tratada con dietil pirocarbonato esterilizada.

**Protocolo 5: Trizol Invitrogen**

- 100mg de tejido.
- Agregar 1000 $\mu$ l de Trizol y 10  $\mu$ l DEPC.
- Agitar y homogeneizar 20seg en vortex.
- Incubar 5min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 10,000 rpm x 10 min.
- Transferir sobrenadante a otro tubo.
- Centrifugar a 10,000 rpm x 10min y transferir fase acuosa a otro tubo.
- Agregar 200 $\mu$ l  $\text{CHCl}_3$ , agitar e incubar a temperatura ambiente x 3 min.
- Centrifugar a 10,000 rpm x 15min a 4°C.
- Transferir sobrenadante a un tubo nuevo.
- Añadir 0.5ml Fenol- $\text{CHCl}_3$ -EtOH.
- Agitar a mano y vortex de 15-30 seg.
- Centrifugar a 10,000 rpm x 15min a 4°C.
- Transferir sobrenadante y agregar  $\text{CHCl}_3$  (0.5ml).
- Centrifugar a 10,000 rpm x 15min.
- Transferir sobrenadante y agregar 120 $\mu$ l de Ac. Acético 1 M y 250 $\mu$ l EtOH abs. (precipitar de 60-90min).
- Centrifugar en refrigeración a 10,000 rpm a -4°C.
- Decantar sobrenadante y agregar 100 $\mu$ l de EtOH 75%.
- Centrifugar a 5,000 rpm x 5min.
- Quitar sobrenadante y volver a centrifugar a 5,000 rpm x 5min.
- Eliminar el exceso de EtOH c/pipeta y disolver la pastilla c/20-30  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC.

**Protocolo 6***Buffer 1*

- Isotiocianato de guanidina 5M.
- Lauril sarcocinato de sodio 0.5%.
- Sarcocil citrato de sodio 50mM pH 7
- Tris-HCl pH 8 1M 5ml.
- $\beta$ -Mercaptoetanol (20 $\mu$ l/ml de buffer).
- Aforar a 50ml.

**Protocolo 7**

*Buffer Z6* (Logemann, Schell, and Willmitzer, 1984)

- Clorhidrato de guanidina 8M.
- MES 20mM.
- EDTA 20mM.
- Aforar a 50ml.
- +  $\beta$ -Mercaptoetanol (20 $\mu$ l/ml de buffer).

**Protocolo 8**

*Buffer 1+Z6*

- Isotiocianato de guanidina 5M.
- Lauril sarcocinato de sodio 0.5%.
- Sarcocil citrato de sodio 50mM pH 7
- Tris-HCl pH 8 1M 5ml.
- Aforar a 50ml.
- Clorhidrato de guanidina 8M.
- MES 20mM.
- EDTA 20mM.
- Aforar a 50ml.
- Mezclar ambos buffers en una relación 1:1 v/v.
- Añadir  $\beta$ -Mercaptoetanol (20 $\mu$ l/ml de buffer).

**Protocolo 9**

*Buffer TEN* (Chang-Sheng and Vodkin, 1994)+Z6

- Tris-HCl 100mM pH 9.
- EDTA 20mM.
- NaCl 200mM.
- Sarcocil citrato de sodio 4% p/v.
- Aforar a 100ml.
- +  $\beta$ -Mercaptoetanol 72mM (25 $\mu$ l/5ml de buffer).
- Mezclar con buffer del protocolo 7 1:1 v/v.



**Protocolo 10**

*Buffer TES (Chirgwin et al., 1979)+Z6*

- Tris-HCl 2M pH 8.
- EDTA 0.5M pH 8.
- SDS 20%.
- Mezclar con buffer del protocolo 7 1:1 v/v.
- +  $\beta$ -Mercaptoetanol (20 $\mu$ l/ml de buffer).

**Protocolo 11**

*Rochester et al., 1983*

*Buffer de extracción (25ml)*

- 1% de TNS, 0.25gr.
- 6% de PAS, 1.5gr.
- 100 mM de Tris pH 7.6, 2.5ml.
- 50mM de EGTA, 2.5ml.
- 1% de SDS (filtrar), 2.5ml
- 50mM de  $\beta$ - mercaptoetanol, 87 $\mu$ l.

***Metodología de los protocolos 6-11***

- Congelar y moler el tejido.
- Agregar buffer de lisis (5-6ml).
- Agregar 1 vol. de Fenol-CHCl<sub>3</sub> (1:1). Agitar en vortex 20seg.
- Centrifugar a 10,000 rpm x 25min a 4°C.
- Tomar sobrenadante y se agrega un volumen de Fenol-CHCl<sub>3</sub>.
- Centrifugar 15min a 10,000 rpm x 15min.
- Tomar sobrenadante y añadir 2-Isopropanol (1 vol.) y 0.1 de acetato de sodio 3M pH 5.2.
- Precipitar de 1.30 h a toda la noche a -20°C.
- Centrifugar a 10,000 rpm x 20min y decantar sobrenadante.
- Lavar la pastilla con EtOH 70%, agitar en vortex y centrifugar 10,000 x 15 min.
- Decantar sobrenadante y agregar acetato de sodio 3M pH 5.2 y agitar en vortex. Centrifugar a 10,000 rpm x 10min.

- Decantar sobrenadante y lavar con EtOH 70% (vortex). Centrifugar 10,000 rpm x 10min.
- Transferir la pastilla a un tubo Eppendorf de 1.5ml y lavar con EtOH 70% (vortex). Centrifugar a 14,000 rpm x 5min.
- Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 30 $\mu$ l. Si no se puede, calentar a 65°C x 20min.

## APÉNDICE II

### Metodología de despliegue diferencial

#### ***Extracción de RNA de embriones cigóticos y megagametofito.***

*Buffer TES* (Chirgwin *et al.*, 1979)

- Tris-HCl 2M pH 8.
- EDTA 0.5M pH 8.
- SDS 20%.

*Buffer Z6* (Logemann, Schell, and Willmitzer, 1984)

- Clorhidrato de guanidina 8M.
- MES 20mM.
- EDTA 20mM.
- Aforar a 50ml.
- Mezclar ambos buffers en una relación 1:1 v/v.
- Añadir  $\beta$ -Mercaptoetanol (20 $\mu$ l/ml de buffer).

#### ***Extracción de RNA de embriones somáticos y hoja***

*Buffer de extracción (25ml)*

- 1% de TNS, 0.25gr.
- 6% de PAS, 1.5gr.
- 100 mM de Tris ph 7.6, 2.5ml.
- 50mM de EGTA, 2.5ml.
- 1% de SDS (filtrar), 2.5ml
- 50mM de  $\beta$ - mercaptoetanol, 87 $\mu$ l.

*Extracción*

- Congelar y moler el tejido.
- Agregar buffer de lisis (5-6ml).
- Agregar 1 vol. de Fenol-CHCl<sub>3</sub> (1:1). Agitar en vortex 20seg.
- Centrifugar a 10,000 rpm x 25min a 4°C.
- Tomar sobrenadante y se agrega un volumen de Fenol-CHCl<sub>3</sub>.
- Centrifugar 15min a 10,000 rpm x 15min.

- Tomar sobrenadante y añadir 2-Isopropanol (1 vol.) y 0.1 de acetato de sodio 3M pH 5.2.
- Precipitar de 1.30 h a toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Centrifugar a 10,000 rpm x 20min y decantar sobrenadante.
- Lavar la pastilla con EtOH 70%, agitar en vortex y centrifugar 10,000 x 15 min.
- Decantar sobrenadante y agregar acetato de sodio 3M pH 5.2 y agitar en vortex. Centrifugar a 10,000 rpm x 10min.
- Decantar sobrenadante y lavar con EtOH 70% (vortex). Centrifugar 10,000 rpm x 10min.
- Transferir el pastilla a tubo Eppendorf y lavar con EtOH 70% (vortex). Centrifugar a 14,000 rpm x 5min.
- Decantar sobrenadante y resuspender el pastilla en 30  $\mu\text{l}$ . Si no se puede, calentar a  $65^{\circ}\text{C}$  x 20min.

### ***Purificación de RNA***

- 4 $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O DEPC
- 4 $\mu\text{l}$  RNA
- 1 $\mu\text{l}$  de buffer 10x DNAsa 1
- 1 $\mu\text{l}$  DNAsa
- Incubar 15 min con DNAsa a temperatura ambiente.
- Adicionar 1 $\mu\text{l}$  de EDTA 25mM para detener la reacción inmediatamente, 10min a  $65^{\circ}\text{C}$ .
- Electroforesis en gel de agarosa para verificar pureza.
- Cuantificar en espectrofotómetro.

### ***RT-PCR con oligo anclado***

- ddH<sub>2</sub>O
- buffer 5x 1<sup>a</sup>. cadena.
- DTT 0.1M.
- dNTPs 250  $\mu\text{M}$ .
- T<sub>11</sub>XN.
- RNA (150ng/  $\mu\text{l}$ ).

- Super Script II RT.

#### ***Programa de termociclador***

- 65°C x 5min.
- 37°C x 10min.
- 20°C x 5min (agregar RT).
- 37°C x 50min (incubar).
- 95°C x 5min.
- 4°C ∞.

#### ***Fosforilación del oligonucleótido***

- ddH<sub>2</sub>O 2μl.
- Buffer forward 5x 8μl.
- Oligo dT<sub>11</sub>XN (A, C, G) 26μl.
- T<sub>4</sub> cinasa (10u/μl) 1μl.
- γ-dATP (6000ci/mmol) 2μl (1/2) 3μl (1/4).
- Incubar a 37°C por 60min y 65°C por 10min. Guardar a -20°C.

#### ***Amplificación por PCR***

- ddH<sub>2</sub>O 5μl.
- MgCl<sub>2</sub> 1.5μl.
- dNTPs (250μM) 2μl.
- Oligo dT<sub>11</sub>XN fosforilado 2μl.
- Oligo HAP 2μl.
- TAQ polimerasa 2μl.
- cDNA de RT 0.5μl.

#### ***Programa del termociclador***

- 94°C-30s.
- 40°C-2min. 40 ciclos
- 72°C-30s.
- 72°C-7min.
- 4°C-∞.

- Al terminar el PCR agregar 14µl de buffer de carga (4µl aprox. por cada 5µl de reacción de PCR).
- Guardar a -20°C.

#### ***Buffer TBE 10X 50ml***

- Tris-base 5.4g.
- Ácido bórico 2.75g.
- EDTA 0.5 pH 8.0 2ml.
- ddH<sub>2</sub>O aforar a 50ml.

#### ***Gel de poliacrilamida***

##### **PSA**

- Persulfato de Amonio 1g.
- ddH<sub>2</sub>O 10ml.

#### **Poliacrilamida 6% de urea 8M (1l)**

- Disolver 480.5g de urea en 350 ml de ddH<sub>2</sub>O.
- Filtrar en vacío con filtro de 1.2µm.
- Agregar 100ml de TBE 10X y 150ml de acrilamida al 40%.
- Aforar a 1l.
- Guardar en frasco ambar.

#### **Preparación del gel de poliacrilamida**

- Solución de acrilamida 6% de urea 8M 70ml.
- TEMED 41µl.
- Persulfato de amonio (PSA) 410µl.
- Agregar en ese orden a la botella dispensadora de acrilamida.
- Lavar los vidrios con dextrán y secar con etanol. Agregar antiadherente (2ml de diclorometilsilano) a uno de los vidrios y distribuir en toda la superficie.
- Colocar los separadores humedecidos en un vidrio y encima el vidrio que tiene el antiadherente.
- Probar el ajuste del peine para que no quede muy apretado.

- Sujetar con pinzas alrededor de los vidrios cuidando que no se separen para evitar derrames de acrilamida.
- Vaciar con la botella dispensadora la mezcla por una esquina de los vidrios, cuidar que el flujo sea continuo para que no se formen burbujas en el gel. Una vez que se ha llenado el espacio entre los vidrios, se coloca el peine y después de unos minutos se coloca una toalla humedecida (para evitar que el gel se reseque).
- Dejar polimerizar la acrilamida aproximadamente 1h.
- Quitar la toalla y con mucho cuidado el peine. Se quita también el separador inferior, rellenando ese espacio sin dejar burbujas.

### ***Precorrida de electroforesis***

- Preparar 1l de TBE 0.5X
- Vaciar 400ml en el depósito inferior de la cámara de electroforesis.
- Colocar los vidrios en la cámara y asegurar con los tornillos.
- Llenar el compartimiento superior con el resto del TBE 0.5X.
- Limpiar la urea depositada en los pozos inyectando buffer.
- Precorrer el gel a 2000V hasta que la resistencia baje a 30mA (la máxima velocidad a la cual debe correrse el gel). Poner el ventilador para que se no recaliente.

### ***Desnaturalizacion y carga de muestras***

- Colocar los productos de PCR con colorante que se han mantenido a -20°C, así como la escalera a 95°C por 5min inmediatamente antes de cargar.
- Limpiar los pozos del gel con buffer.
- Cargar 5µl de cada muestra en el gel y 2µl de marcador.

### ***Secado del gel***

- Retirar los vidrios que contienen el gel de la cámara y se remueve el vidrio que no tiene antiadherente.

- Colocar sobre el gel se una hoja de papel filtro, poner encima de ésta el vidrio que se removió y golpear con fuerza de manera uniforme toda la superficie del vidrio para que el gel se adhiera al papel.
- Desprender el papel junto con el gel del vidrio que tiene antiaherente y cubrir con plástico. Colocar en la cámara de secado y prender la bomba de vacío. El proceso dura 15min aproximadamente.

### ***Exposición y revelado de la placa radiográfica***

- Una vez que el gel se ha secado, colocar en un cartucho de plomo y sobre el gel poner una placa radiográfica, cerrar el cartucho y llevar a un cuarto frío (4°C) donde se deja exponer la placa. El tiempo de exposición depende de la actividad de la marca radioactiva.
- Una vez transcurrido el tiempo necesario llevar el cartucho a un cuarto con temperatura ambiente durante 1h.
- Revelar la placa en el cuarto oscuro.



## **APÉNDICE III**

### **Metodología para la genoteca**

#### ***Extracción de RNA de embriones somáticos.***

##### *Buffer de extracción (25ml)*

- 1% de TNS, 0.25gr.
- 6% de PAS, 1.5gr.
- 100 mM de Tris ph 7.6, 2.5ml.
- 50mM de EGTA, 2.5ml.
- 1% de SDS (filtrar), 2.5ml
- 50mM de  $\beta$ - mercaptoetanol, 87 $\mu$ l.

#### ***Purificación de RNA poli A (mRNA purification kit Amersham Biosciences)***

##### **Preparación de las columnas**

- Invertir las columnas varias veces para resuspender el Oligo (dT) celulosa.
- Remover la tapa superior después la inferior. Colocar la columna de manera vertical en un tubo de centrifuga de 15ml y permitir que el buffer de almacenamiento drene.
- Añadir 1ml de buffer alto en sales y permitir que drene por gravedad. Repetir una vez.
- Remover la columna del tubo y descartar el buffer, colocar la columna de nuevo en el tubo.

##### **Preparación de las muestras de RNA y cromatografía en columna**

- Disolver la muestra en 1ml de buffer de elusión (buffer TE).
- Calentar la muestra a 65°C por 5 minutos, si se parte de una muestra precipitada, asegurarse de que esté completamente disuelta.
- Colocar la muestra en hielo, añadir 0.2ml de buffer de muestra y mezclar suavemente.
- Colocar el buffer de elusión a calentar a 65°C.
- Colocar la muestra en la parte superior de la columna de celulosa y permitir que se seque bajo gravedad.
- Centrifugar a 350g por 2 min.

- Añadir 0.25ml de buffer alto en sales a la columna, centrifugar a 350g por 2 min. Repetir este paso 1 vez.
- Repetir tres veces la misma rutina de centrifugación utilizando 0.25ml buffer bajo en sales en cada vez.
- Descartar el buffer colectado en el tubo de 15 ml y colocar un tubo estéril de 1.5ml dentro del tubo de 15ml.
- Colocar la columna con su extremo inferior pegado al tubo de 1.5ml.
- Para lavar el RNA poli(A)<sup>+</sup>, lavar la columna 4 veces con alícuotas de 0.25ml de buffer de elusión precalentado a 65°C. Centrifugar a 350g por 2 min en cada lavado, colectando el líquido en el tubo de 1.5ml.
- Remover la columna y extraer el tubo de 1.5ml del tubo de 15ml. Colocar el tubo de 1.5ml en hielo.
- Guardar el RNA poli(A)<sup>+</sup> a -80°C.

#### **RT-PCR**

- 65°C x 5min.
- 37°C x 10min.
- 20°C x 5min (agregar RT).
- 37°C x 50min (incubar).
- 95°C x 5min.
- 4°C ∞.

#### **Preparación de células electro-competentes (Current Protocols in Molecular Biology, 2002)**

- Inocular una colonia de células de *E. coli* dentro 5ml de medio LB. Dejar crecer de 5hr a toda la noche. A 37°C en agitación moderada.
- Inocular 2.5ml del cultivo en 500ml de medio LB. Crecer a 37°C, agitando a 350rpm, hasta obtener una OD<sub>600</sub> de ≈ 0.5-0.7.
- Enfriar las células en un baño de agua con hielo por 10-15 min y transferir a una botella de centrífuga de 1l previamente enfriada. Las células se deben mantener a 2°C durante los siguientes pasos.
- Centrifugar las células a 4200rpm a 2°C.

- Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 5 ml de agua helada. Añadir 500ml de agua helada y centrifugar como en el paso anterior.
- Descartar el sobrenadante inmediatamente y resuspender la pastilla en el agua remanente.
- Añadir 500ml de agua helada y centrifugar como en el paso 4.
- Descartar el sobrenadante inmediatamente y resuspender la pastilla en el agua remanente.
- Si se van a utilizar células frescas para la electroporación, colocar la suspensión en un tubo de 500ml previamente enfriado y centrifugar a 4200rpm a 2°C por 10 min.
- Si se utilizaran células congeladas, añadir 40ml de glicerol 10% helado y mezclar bien con las células, centrifugar las células como en el paso anterior.

***Transformación de células electrocompetentes (Current Protocols in Molecular Biology, 2002)***

- Ajustar el electroporador a 2.5 kV, 25  $\mu$ F. Ajustar el controlador de pulso a 200 o 400 ohms.
- Añadir de 5pg a 0.5  $\mu$ g de DNA plasmídico en tubos conteniendo células frescas o descongeladas (en hielo). Mezclar golpeando ligeramente el tubo o aspirando las células con una pipeta.
- Transferir las células a una cubeta que ha sido enfriada previamente por 5 min, agitar ligeramente para permitir que las células se sedimenten. Secar la cubeta por fuera.
- Colocar la cubeta en la cámara de muestra.
- Aplicar el pulso.
- Remover la cubeta y añadir inmediatamente 1ml de medio SOC y transferir a un tubo estéril de 1.5ml utilizando una pipeta. Incubar agitando ligeramente durante 30-60 min a 37°C.
- Plaquear alícuotas del cultivo transformado en cajas de petri con medio LB con antibióticos.

***Selección de colonias transformadas con plásmido pGEM***

- Plaquear alícuotas del cultivo transformado en cajas de petri con medio LB con antibióticos, X-Gal e IPTG.
- Dejar crecer toda la noche a 37°C.
- Dentro de una campana de flujo laminar seleccionar las colonias blancas (transformadas) y plaquearlas en cajas de petri con medio LB con antibióticos.
- Dejar crecer toda la noche a 37°C.

## APÉNDICE IV

### Medio Litz

MACRONUTRIMENTOS MEDIO B5	mg/l
KNO <sub>3</sub>	2500
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	150

MICRONUTRIENTES MEDIO MS	mg/l
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.3
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8

COMPUESTO ORGÁNICOS	mg/l
Inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	0.1
Glicina	2.0
Glutamina	400
Hidrolizado de caseína	100
Arginina	100
Asparagina	100
Ácido ascórbico	100
Sacarosa	60g/l
Gel Rite	4g/l

- Ajustar pH a 5.7

**APÉNDICE V*****Oligonucleótidos***

- Z<sub>1</sub>: 5'-AAGCTTGATTGCC-3'
- Z<sub>2</sub>: 5'-AAGCTTCGACTGT-3'
- Z<sub>3</sub>: 5'-AAGCTTTGCTCAG-3'
- Z<sub>4</sub>: 5'-AAGCTTCTCAACG-3'
- dT: 5'-TTT TTT TTT TT A-3'

## BIBLIOGRAFIA

- Ackery, P., Nash, R., Bell, E. y Norstog, K. (1993) Sequestration of MAM-glycosides by insects. Pp. 3–7 in: *Proceedings of Cycad 90, the 2nd International Conference on Cycad Biology* (eds. D.W. Stevenson and K.J. Norstog). Palm and Cycad Societies of Australia, Milton, Queensland.
- Arnold, C.A. (1953) Origin and relationships of the cycads. *Phytomorphology* **3**:51-65.
- Aroca R., Irigoyen J.J. y Sánchez-Díaz M. (2001) Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative estrés during chilling and subsequent recovery in two maize varieties differing in chilling sensitivity. *Plant Sci.* **161**: 719–726
- Attree S.M. y Fowke L.C. (1993) Embryogeny of gymnosperms: Advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tissue Org Cult* **35**:1-35
- Attree S.M., Pomeroy M.K., Fowke L.C. (1994) Production of vigorous desiccation tolerant white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss.] synthetic seeds in a bioreactor. *Plant Cell Rep* **13**:601–606
- Bhat, S. R.; Chandel, K. P. S. (1991) A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Rep.* **10**:358–361
- Benson E.E. (2000). Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance?. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* **36**: 163–170
- Beruto M.; Curir P. y Debergh P. (1996). Callus growth and somatic embryogenesis in thalamus tissue in *Ranunculus asiaticus* L. cultivated in vitro: cytokinin effect and phenolic metabolism. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* **32**: 154-160.
- Bogler, D.J. y Francisco-Ortega, J. (2004) Molecular systematic studies studies in Cycads: evidence from *truL* intron and ITS2 rDNA sequences. *Memoirs of New York Botanical Garden*
- Bommineni V.R., Chibbar R.N., Datla R.S.S. y Tsang E.W.T. (1993) Transformation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos by microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep* **13**:17–23

- Brenner E.D., Martinez-Barboza N., Clark A.P., Liang Q.S., Stevenson D.W. y Coruzzi G.M. (2000) *Arabidopsis* mutants resistant to S(+)-beta-methyl-alpha, beta-diaminopropionic acid, a cycad-derived glutamate receptor agonist. *Plant Physiol*, **124**:1615-1624.
- Brenner E.D., Stevenson D.W., McCombie R.W., Katari M.S., Rudd S.A., Mayer K.F.X., Palenchar P.M., Runko S.J., Twigg R.W., Dai G., Martienssen R.A., Benfey P.N. y Coruzzi G.M. (2003) Expressed sequence tag analysis in *Cycas*, the most primitive living seed plant *Genome Biology*, Volume 4, Issue 12.
- Bryant, S. y Manning, D.L. (1995) Isolation of messenger RNA. pp. 61-64. En: R. Rapley y Manning D.L. (Eds.). RNA isolation and characterization protocols. *Methods in Molecular Biology* Vol. 86. Humana Press.
- Buchne P. y Jean-Pierre Boutin (1998). A MADS box transcription factor of the AP1/AGL9 subfamily is also expressed in the seed coat of pea (*Pisum sativum*) during development *Plant Molecular Biology* **38**: 1253–1255.
- Bugos R.C., Chiang V.L., Zhang X.H., Campbell E.R., Podila G.K. y Campbell W.H. (1995). RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. *Biotech* **19**: 734–737.
- Campbell M.M, Brunner M.M., Jones H.M. y Strauss S.H. (2003) Forestry's fertile crescent: the applications of biotechnology to trees. *Plant Biotechnol J* **1**:141–154
- Caputo, P.D. Stevenson, D.W. y Wurtzel, E.T. (1991) A phylogenetic analysis of American Zamiaceae (Cycadales) using chloroplast DNA restriction fragment length polymorphisms. *Brittonia* **43**:135-145.
- Cha Thye San and Farida Habib Shah (2005). Differential gene expression and characterization of tissue-specific cDNA clones in oil palm using mRNA despliegue diferencial. *Molecular Biology Reports* **32**: 227–235.
- Chamberlain, C.J. (1957). *Gymnosperms, structure and evolution*. University of Chicago, Chicago.



- Chan Jonah R., Rodriguez-Waitkus P. M., Benjamin K., Liang Peng, and Glaser Michael (2000). Progesterone Synthesized by Schwann Cells during Myelin Formation Regulates Neuronal Gene Expression. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 2283–2295.
- Chang S, Puryear J y Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Reprtr* **11**: 113–116.
- Chang-Sheng Wang y Lila O. Vodkin (1994) Extraction of RNA from tissues containing high levels of procyanidins that bind RNA *Plant Mol Biol Reprtr* **12**:132-145
- Charlton T.S., Marini A.M., Markey S.P., Norstog K y Duncan M.W. (1992) Quantification of the neurotoxin 2-amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in Cycadalea. *Phytochemistry*, **31**:3429-3432.
- Chase, M.W., Soltis, D.E., Olmstead, R.G., Morgan, D., Les, D.H., Mishler, B.D., Duvall, M.R., Price, R.A., Hills, H.G., Qiu, Y-L., Kron, K.A., Rettig, J.H., Conti, E., Palmer, J.D., Manhart, J.R., Sytsma, K.J., Michaels, H.J., Kress, W.J., Karol, K.G., Clark, W.D., Hedrén, M., Gaut, B.S., Jansen, R.K., Kim, K-L., Wimpee, C.F., Smith, J.F., Furnier, G.R., Strauss, S.H., Xiang, Q-Y., Plunkett, G.M., Soltis, P.S., Swensen, S.M. Williams, S.E., Gadek, P.A., Quinn, C.J., Eguiarte, L.E., Golenberg, E., Learn, G.H., Graham, S.W., Barrett, S.C.H., Dayanandan, S. and Albert, V.A. (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **80**: 528–580.
- Chavez, V.M., (1993) Embriogénesis somática a partir de foliólos de plantas maduras de *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Zamiaceae), especies en peligro de extinción. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias UNAM.
- Chavez, V. M.; R. E. Litz, M. Monroy, P. A. Moon y A. P. Vovides. (1998) Regeneration of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryonic leaf cultures derived from mature-phase trees. *Plant Cell Reports* **17**: 612-616.

- Chavez, V. M.; R. E. Litz y K. Norstog. (1992a) Somatic embryogenesis and organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuraceae* and *Z. pumila*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **30**: 99-105.
- Chavez, V. M.; R. E. Litz, P. A. Moon y K. Norstog. (1992b) Somatic embryogenesis from leaf callus of the gymnosperm *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Cycadales). *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28**: 59-63.
- Chavez, V. M., R. E. Litz, P. A. Moon y K. Norstog (1992c) Somatic embryogenesis from leaf and callus of a mature gymnosperm *Ceratozamia Mexicana* var. *Robusta* (Miq) Dyer (Cycadales). *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28**:59-63.
- Chavez, V. M. y R. E. Litz (1999) Organogenesis from megagametophyte and zygotic embryo explants of the gymnosperm *Dioon edule* Lindley (Zamiaceae, Cycadales). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **58**:219-222
- Chen Huei-Mei, Schmeichel K. L., Mian I. S., Lelievre S., Petersen O. W., and Bissell M. J. (2000). AZU-1: A Candidate Breast Tumor Suppressor and Biomarker for Tumor Progression. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 1357–1367.
- Cheng, S-H and J.R. Seemann (1998) Extraction and purification of RNA from plant tissue enriched in polysaccharides. In: *Methods in Molecular Biology, Vol. 86: RNA Isolation and Characterization Protocols*. R Rapley and DL Manning (eds). Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp 27-32.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, Macdonald RJ y Ratter WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294–5299.
- Chiu J.C., Brenner E.D., DeSalle R., Nitabach M.N., Holmes T.C. y Coruzz G.M. (2002) Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 1066–1082
- Chung-Shien Wu, Ya-Nan Wang, Shu-Mei Liu, y Shu-Miaw Chaw. Chloroplast Genome (cpDNA) of *Cycas taitungensis* and 56 cp Protein-

- Coding Genes of *Gnetum parvifolium*: Insights into cpDNA Evolution and Phylogeny of Extant Seed Plants. *Mol. Biol. Evol.* **24**(6):1366–1379. 2007
- CITES (2003) Examen del comercio significativo de la CITES: Cicadas.
  - Claros Manuel G. y Cánovas Francisco M. (1998). Rapid High Quality RNA Preparation from Pine Seedlings. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**: 9–18.
  - Cloud, M. 1983. The biosphere. *Scientific American* **249**: 132-144.
  - Copani A., Canonico P.L. y Nicoletti F. (1990) Beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a potent agonist of 'metabotropic' glutamate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **181**, 327–328
  - Current Protocols in Molecular Biology (2002) by John Wiley and Sons, Inc.
  - Das DK, Prakash NS y Bhalla-Sarin N (1999) Multiple shoot induction and plant regeneration in litchi (*Litchi chinensis* Sonn). *Plant Cell Rep* **18**:691–695
  - Dehgan, B. 1983. Propagation and growth of cycads a conservation strategy. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, **96**, 137–139.
  - Dehgan, B. 1996a. Permian Permanence, the Cycads. Part II. Pollination, Propagation, and Cultural requirements. *American Nurseryman*, **183** (1), 66–81.
  - Dehgan, B. 1996b. Cycad Excitement. *Interior Landscape*, **13**:24–27.
  - Dehgan, B. & F. Almira. (1993) Horticultural practices and conservation of cycads. Pp. 322-328 in: *Proceedings of Cycad 90, the 2<sup>nd</sup> International Conference on Cycad Biology*. Stevenson, D. W. & K. J. Norstog (Eds.). Palm & Cycad Societies of Australia, Milton.
  - De la Cruz M, Ramírez F. y Hernández H (1997) DNA isolation and amplification from cacti. *Plant Mol Biol Rep* **15**: 319-325.
  - De Luca, P., Moreti, A., Siniscaico-Gigliano, G., Capuo, P., Cozzolino, S. Gaudio, L., Stevenson, D.W., Wurtzel, E.T., y Osborne R.T. (1995) Molecular systematics of cycads. Pp131-137 in *Proceedings of the Third International Conference on Cycad Biology*. P. Vorster (Ed.). Pretoria: Cycad Society of South Africa, Stellenbosch.

- Detrez C., Ndiaye S. y Dreyfus B. (1994) In vitro regeneration of the tropical multipurpose leguminous tree *Sesbania grandiflora* from cotyledon explants. *Plant Cell Rep* **14**:87–93
- Donaldson, J.S. (1991) “Adaptation to the host-plant and the evolution of host specialization in cycad weevils (Coleoptera: Curculionoidea)”. PhD thesis, University of Cape Town.
- Donaldson, J.S. (1997) Is there a floral parasite mutualism in cycad pollination: the pollination biology of *Encephalartos villosus* (Zamiaceae). *American Journal of Botany*, **84**, 1398–1406.
- Donaldson, J.S. (2003) (Ed), *Cycads: Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN/ SSC Cycad Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Donaldson, J.S., Nänni, I. and Bösenberg, J.D. (1995) The role of insects in the pollination of *Encephalartos cycadifolius*. In: *Proceedings of the 3rd International Conference on Cycad Biology* (ed. P. Vorster). Cycad Society of South Africa, Stellenbosch.
- Dong JZ y Dunstan DI (1996a) Characterization of three heat-shock-protein genes and their developmental regulation during embryogenesis in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss]. *Planta* **200**: 85–91
- Dong JZ y Dunstan DI (1996b) Expression of abundant mRNAs during somatic embryogenesis of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss]. *Planta* **200**: 459–466
- Dong JZ y Dunstan DI (2000) Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. In: Jain SM & Minocha SC (eds) *Molecular Biology of Woody Plants* Vol. 1 (pp. 51–87). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Ehrlich, P.R. y Wilson, E.O. (1991) Biodiversity studies: *Science and Policy*. *Science* **253**:758-752.
- Fay, M.F. (1994) In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biod. Cons.* **3**:176-183
- Fenning T.M. y Gershenzon J (2002) Where will the wood come from? Plantation forests and role of biotechnology. *Trends Biotechnol* **20**:291–296

- Franche C., Diaye A.N., Gobe C., Alloneau C., Bogusz D. y Duhoux E. (1999) Genetic transformation of *Allocastrum verticillata* In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. In: Bajaj YPS (ed) Transgenic trees, vol 44. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1–14
- Giddy, C. (1993) Cycad conservation legislation – does it work in South Africa? In: *Proceedings of Cycad 90, the 2nd International Conference on Cycad Biology* (eds.) D.W. Stevenson and K.J. Norstog) Palm and Cycad Societies of Australia, Milton, Queensland.
- Giri C. C., Shyamkumar B. y Anjaneyulu C. (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees* **18**:115–135.
- Gómez-Pompa, A., A.P. Vovides, N. Ogata, J. González-García, R. Castro-Cortés y A. Corona-López (2000) *Cycads: The endangered living fossils*. CD-ROM interactivo. Q, Taxa, Dept. Botany & Plant Sciences, Univ. de California, Riverside.
- González-Astorga J, Vovides AP, Ferrer MM, Iglesias C (2003) Population genetics of *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycales): biogeographical and evolutionary implications. *Biological Journal of the Linnean Society*, **80**, 457–467
- González-Astorga J., Vovides A.P., Octavio-Aguilar P., Aguirre-Fey D., Nicolalde-Morejón F. y Iglesias C. (2006) Genetic diversity and structure of the Cycad *Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae): implications for evolution and conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society* **152**:533-544.
- Gupta PK, Pullman G, Timmis R, Kreitinger M, Carlson W, Grob J, Welty E (1993) Forestry in the 21st century: the biotechnology of somatic embryogenesis. *Biotechnology* **11**:454–459
- Halffter G. (1987) Biogeography of the montane entomofauna of Mexico and Central America. *Ann Rev Entomol* **32**:95–114
- Hatanaka T, Choi YE, Kusano T, Sano H (1999) Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation. *Plant Cell Rep* **19**:106–110

- Herschbach C, Kopriva S (2002) Transgenic tree as tools in tree and plant physiology. *Trees* **16**:250–261
- Hughes DW y Galau GA (1988). Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. *Plant Mol Biol Rep* **6**: 253–275.
- Inze´ D & Van Montagu M (1995). Oxidative estrés in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 153–158
- Jun-Jun Liu, Chong-Jin Goh, Chiang-Shiong Loh, Pei Liuand y Eng-Chong Pua (1998). A Method for Isolation of Total RNA from Fruit Tissues of Banana. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**: 1–6.
- Khabazian I, Bains JS, Williams DE, Cheung J, Wilson JM, Pasqualotto BA, Pelech SL, Andersen RJ, Wang YT, Liu L, Nagai A, Kim SU, Craig UK, Shaw CA (2002) Isolation of various forms of sterol beta-D-glucoside from the seed of *Cycas circinalis*: neurotoxicity and implications for ALS-parkinsonism dementia complex. *J. Neurochem.* **82**, 516–528
- Kumar PP, Joy IVRW & Thorpe TA (1989) Ethylene and carbon dioxide accumulation and growth of cell suspension cultures of loblolly pine somatic embryo quality. *Picea glauca* (white spruce). *J. Plant Physiol.* **135**: 592–596
- Lacombe B., Becker D., Hedrich R., DeSalle R. Hollman M., Kwak J.M., Schroeder J.I., Le Novère N., Hong Gil Nam, Spalding E.P., Tester M., Turano F.J., Chiu J. y Coruzzi G. (2001) The identity of plant glutamate receptors. *Science* **292**, 1486–1487
- Lam H.M., Chiu J., Hsieh Ming-Hsiun, Meisel L., Oliveira I.C., Shin M. y Coruzzi G. (1998) Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* **396**, 125–126
- LaRue, C.D. (1949) Regeneration in the megagametophyte of *Zamia floridiana*. *Bull. Torr. Bot. Club.* **75**:597-603.
- LaRue, C.D. (1954) Studies on growth and regeneration in gametophytes and sporophytes of gymnosperms. *Brookhaven Symp. Biol.* **6**:187-208.
- Ledger SE y Gardner RC (1994) Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). *Plant Mol Biol* **25**: 877-886.

- Levee V, Lelu MA, Jouanin L, Cornu D y Pilate G (1997) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of hybrid larch (*Larix Kaempferi* - *L. decidua*) and transgenic plant regeneration. *Plant Cell Tissue Org Cult* **48**:680–685
- Li-Chun Huang; Ya-Lin Lee; Bau-Lian Huang; Ching-I Kuo; Jei-Fu Shaw (2002). High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bambo. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*; Jul/Aug; **38**, 4; pg. 358.
- Ling Lin, Xiping Wang y Yuejin Wang (2006). cDNA Clone, fusion expression and purification of the novel gene related to ascorbate peroxidase from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* in *E. col*. *Molecular Biology Reports* **33**:197–206.
- Loconte H y Stevenson DW (1990) Cladistics of the Spermatophyta. *Brittonia*, **42**:197-211
- Lodhi MA, Ye G-N, Weeden, NF, y Reisch BI (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol Biol Rep* **12**: 6-13.
- Logerman J, Scheel J, y Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**: 16-20.
- Loomis WD (1974). Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Meth Enzymol* **31**: 528-544.
- López-Gómez R y Gómez-Lim MA (1992) A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience* **27**: 440-442.
- Lucchesini M, Mensauali-Sodi A, Vitagliano C (1993) Micropropagation of *Tamarix gallica* from nodal explants of mature trees. *Plant Cell Tissue Org Cult* **35**:195–197
- Lulsdorf MM, Tautorus TE, Kikcio SI, Bethune TD, Dunstan DI (1993) Germination of encapsulated embryos of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). *Plant Cell Rep* **12**:385–389

- Mamay, S.H. (1976) Paleozoic origin of the cycads. *Professional Paper* 934, U.S. Geological Survey, Washington, D.C.
- Manning K (1991). Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Anal Biochem* **195**: 45-50.
- Manzoni, O.J. et al. (1991) Beta-N-methylamino-L-alanine is a lowaffinity agonist of metabotropic glutamate receptors. *Neuroreport* **2**, 609–611
- Mas J.F., Velázquez A., Palacio-Prieto J.L., Bocco G., Peralta A., Prado J. (2002) Assessing forest resources in Mexico: wall-to-wall land use/cover mapping. *Photogramm Eng Remote Sens* **68**:966–968
- Masera O.R., Ordoñez M.J. y Dirzo R. (1997) Carbon emissions from Mexican forests: current situation and long-term scenarios. *Climatic Change* **35**: 265–295
- Meerow Alan W. y Nakamura Kyoko. (2007) Ten microsatellite loci from *Zamia integrifolia* (Zamiaceae) *Molecular Ecology Notes* **7**, 824–826
- Mittermeier R. A. y Mittermier C. (1992) La importancia de la diversidad biológica de México. En: Sarukhán J. y Dirzo R. (eds) Mexico frente a los retos de la biodiversidad, pp 63–73. CONABIO, Mexico City
- Moretti A., Caputo P., Cozzolino S., De Luca P., Gaudio L., Gigliano S. G., D. y Stevenson W. (1993) A phylogenetic analysis of *Dioon* (Zamiaceae). *American Journal of Botany*, **80**, 204–214.
- Mound, L.A. y Terry, I. (2001) Thrips pollination of the central Australian cycad *Macrozamia mcdonnellii* (Cycadales). *International Journal of Plant Science*, **162**:147–154.
- Moynihan Jeremy, Meerow Alan W. y Francisco-Ortega Javier (2007) Isolation, characterization and cross-species amplification of microsatellite loci in the cycad genus *Dioon* (Zamiaceae). Potential utilization in population genetics studies of *Dioon edule*. *Molecular Ecology Notes* **7**:72–74
- Mullins KV, Llewellyn DJ, Hartney VJ, Strauss S, Dennis ES (1997) Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Rep* **16**:787–791
- Murray B (1998) Nuclear DNA amounts in gymnosperms. *Ann Bot, Suppl* A:3-15.



- National Center of Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Newbury HJ y Possingham JV (1977). Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing interfering phenolic compounds. *Plant Physiol* **60**: 543-547.
- Noonberg SB, Scott GK, y Benz CC (1995) Effect of pH on RNA degradation during guanidinium extraction. *BioTechniques* 19: 731-733.
- Norstog, K. (1982) Experimental embryology of gymnosperms. 25-51. En: B.M. Johri (Ed.). 1982. *Experimental Embriology of Vascular Plants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Norstog, K y Rhamstine, E. (1962) Isolation and culture of haploid and diploid cycad tissue. *Phytomorpholgy* **17**:374-381.
- Norstog, K.J. y Nicholls T.J. (1997) *The biology of the cycads*. Cornell University Press, Ithaca.
- Norstog, K., Stevenson, D.W. y Niklas, K. (1986) The role of weevils in the pollination of *Zamia furfuracea* L.f. (Zamiaceae). *Biotropica*, **18**:300–306.
- Norstog, K.J. y Fawcett P.K.S. (1989) Insectcycad symbiosis and its relation to the pollination of *Zamia furfuraceae* (Zamiaceae) by *Rhopalotria mollis* (Curculionidae). *American Journal of Botany* **76**:1380-1394.
- Oberprieler, R.G. (1995a) The weevils (Coleoptera: Curculionoidea) associated with cycads. 1. Classification, relationships, and biology. *In: Proceedings of the 3rd International Conference on Cycad Biology* (ed. P. Vorster). Cycad Society of South Africa, Stellenbosch.
- Oberprieler, R.G. (1995b) The weevils (Coleoptera: Curculionoidea) associated with cycads. 2. Host specificity and implications for cycad taxonomy. *In: Proceedings of the 3rd International Conference on Cycad Biology* (ed. P. Vorster). Cycad Society of South Africa, Stellenbosch.
- Ohri D and Khoshoo (1986) T: Genome size in gymnosperms. *Plant Syst Evol*, **153**:119-132
- Osborne, R. (1990) A conservation strategy for the South African Cycads. *S. Afr. J. Bot.* **86**: 220-223.

- Osborne R. 1986. Sex Life of Cycads. *Encephalartos* **8**:27-31.
- Osborne, R. (1990) A conservation strategy for the South African cycads. *South African Journal of Science*, **86**:220–223.
- Osborne, R. (1995) The 1991–1992 world cycad census and a proposed revision of the threatened species status for cycads. *In: Proceedings of the 3<sup>d</sup> International Conference on Cycad Biology* (ed. P. Vorster). Cycad Society of South Africa, Matieland, South Africa.
- Osborne, R. y van Staden, J. (1987) *In vitro* regeneration of *Stangeria eriopus*. *HorrtScience* **22**:1326.
- Pandey, R. N., Adams R. P. y I. E. Flournoy. (1996) Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Mol Biol Report.* **14**:17-22.
- Pena L, Seguin A (2001) Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends Biotechnol* **19**:500–506
- Pérez-Farrera, M. A. (1994) Germinacion de *Dioon merolae*. Tesis de Lic. Escuela de Biología, UNICACH, Tuxtla Gtz.
- Pérez-Farrera, M. A. (1999) Dinámica de población de *Ceratozamia matudai* Lund. (Zamiaceae) en la Reserva de la Biósfera El Triunfo, Chiapas, México. Tesis de Maestría, ECOSUR. San Cristobal, México.
- Prakash Surya y Van Staden Johannes (2006) Sex identification in *Encephalartos natalensis* (Dyer and Verdoorn) using RAPD markers. *Euphytica* **152**:197–200
- Ramamoorthy T, Bye R, Lot A y Fa J (eds) (1993) Biological Diversity of Mexico. Oxford University Press, Oxford
- Reddy PC, Patil V, Prasad TG, Padma K, Udayakumar M (1995) *In vitro* axillary bud break and multiple shoot production in *Acacia auriculiformis* by tissue culture technique. *Curr Sci* **69**:495–496
- Richards E, Reichardt M, y Rogers S (1994). Preparation of genomic DNA from plant tissue. *In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD Seidman JG, Smith JA, and Struhl K (eds). Current protocols in Molecular Biology*, pp 2.3.1-2.3.7, J. Wiley and Sons, New York.
- Rinaldi, L.M.R. y Leva, A.R. (1995) *In vitro* organogenesis from diploid tissues of *Cycas revolute* Thunb. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **43**:37-41.

- Rochester, D.E., Winer, J.A. y Shah, D.M. (1986). The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. *EMBO J.* **5**:451-458.
- Rothschild, M., Nash, R. y Bell, E. (1986) Cycasin in an endangered butterfly *Eumaeus atala florida*. *Phytochemistry*, **25**:1853–1854.
- Rzedoswki, J. (1978). Vegetación de México. Limusa, México.
- Rzedowski J. (1991). Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Bot Mex* **14**:3–21
- Rzedowski J. (1993) Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. In: Ramamoorthy T.P., Bye R., Lot A., Fa J. (eds) Biological diversity of Mexico: origins and distributions. Oxford University Press, New York, USA, pp 129–144
- Salin ML y Bridges SM (1981) Chemiluminescence in wounded root tissue. *Plant Physiol.* **67**: 43–46
- Salvi N.D., Singh H., Tivarekar S., Eapen S. (2001) Plant regeneration from different explants of neem. *Plant Cell Tissue Org Cult* **65**:159-162
- Sankhla D., Davis T.D., Sankhla N. (1996) In vitro regeneration of silk tree (*Albizia julibrissin*) from excised roots. *Plant Cell Tissue Org Cult* **44**:83–86
- Seawright AA, Ng JC, Oelrichs PB, Sani Y, Nolan CC, Lister AT, Holton J, Ray DE y Osborne R (1999) Recent toxicity studies in animals using chemicals derived from cycads. In *Biology and Conservation of Cycads - Proceedings of the Fourth International Conference on Cycad Biology* Beijing: International Academic Publishers;.
- Spencer P.S., Hunn P.B., Nugon J., Ludolph A.C., Ross S.M., Roy D.H. y Robertson R.C. (1987) Guam amyotrophic lateral sclerosis-Parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science*, **237**:517-522.
- Soberón, M.J. y Llorente, J. 1993. La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México (CONABIO). *Rev. Soc. Hist. Nat.* **44**:3-17. Pandey, RN, Adams RP and Flournoy LE (1996). Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Mol Biol Rep* **14**: 17–22.

- Su X. y Gibor A. (1988). A method for RNA isolation from marine macroalgae. *Anal Biochem* **174**: 650-657.
- Stasolla C, van Zyl L, Egertsdotter U, Craig D, LiuW y Sederoff R (2003) The effects of polyethylene glycol (PEG) on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiol*
- Stefanovic Sas̃a , Jager Muriel, Deutsch Jean, Broutin Jean, y Masselot Monique. (1998) Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28s rRNA gene sequences. *American Journal of Botany* **85(5)**: 688–697.
- Stevenson, D.W. (1990) Morphology and systematics of the Cycadales. *Memoirs of the New York Botanic Garden*, **57**:8–55.
- Stevenson, D.W. (1992) A formal classification of the extant cycads. *Brittonia*, **44**:220-223.
- Stevenson, D.W., Norstog, K. y Fawcett, P. (1999) Pollination biology of cycads. Pp. 277–294 in: *Reproductive Biology in Systematics, Conservation, and Economic Botany* (eds. S. Owens and P. Rudall). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Stevenson, D.W, Vovides A., Chemnick and J. (2003) Regional Overview: New World in: Donaldson, J.S. (2003) (Ed), *Cycads: Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN/ SSC Cycad Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Stokes S.B., Rugh C.L., y Kamalay J.C. (1990). RNA and DNA isolation from recalcitrant plant tissues. *Biotechniques* 9: 268-272. Taji A & Williams R (1996). *Tissue Culture of Australian Plants*. University of New England, Armidale NSW, Australia
- Taji A y Williams R (1996) *Tissue Culture of Australian Plants*. University of New England, Armidale NSW, Australia
- The Arabidopsis Genome Initiative: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000, 408:796-815.
- Thomas P y Ravindra MB (1997). Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. *J. Hort. Sci.* **72**: 713–722

- Thompson JE, Legge RL y Barber RF (1987). The role of freeradicals in senescence and wounding. *New Phytol.* **105**: 317–344
- Tian LN, Charest PJ, Seguin A, Rutledge RG (2000) Hygromycin resistance is an effective selectable marker for biolistic transformation of black spruce (*Picea mariana*). *Plant Cell Rep* **19**:358–362
- Valderrama-Cháirez M. L., Cruz-Hernández A. y Paredes-López O. (2002). Isolation of Functional RNA From Cactus Fruit. *Plant Molecular Biology Reporter* **20**: 279–286.
- Van Raemdonck D, Jaziri M, Boerjan W, Baucher M (2001) Advances in the improvement of forest trees through biotechnology. *Belg J Bot* **134**:64–78
- van Zyl L, von Arnold S, Bozhkov P, Chen Y, Egertsdotter U, MacKay J, Sederoff R, Weir B, Shen J, Whetten R, Zelena L y Clapham D (2002) Heterologous array analysis in Pinaceae: hybridization of high density arrays of *Pinus taeda* cDNA with cDNA from needles and embryogenic cultures of *P. taeda*, *P. sylvestris* and *Picea abies*. *Comp. Funct. Genom.*
- Vázquez-Torres, M. (1989a) Aspectos etnobotánicos de las cicadaceas de México. *La Ciencia y El Hombre* (Universidad Veracruzana, México), No. 3.
- Vázquez-Torres, M. (1989b) Importancia biológica de las Cycadophyta (Cycadales: Zamiaceae) y su situación en México. *La Ciencia y El Hombre* (Universidad Veracruzana, México), **3**: 79-92.
- Vázquez-Torres, A.M. (1990) Algunos datos etnobotánicos de las cícdas en México. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **57**:144-147
- Vega A and Bell EA: Alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry* 1967, **6**:759-762.
- Villarreal ML, Rojas G (1996) In vitro propagation of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret, a Mexican medicinal tree. *Plant Cell Rep* **16**:80–82
- Vovides, A.P. (1989) Problems of endangered species conservation in México: Cycads an example. *Encephalartos* **20**:29-35.
- Vovides, A.P. (2000) México: Segundo lugar mundial en diversidad de cícdas. *Biodiversitas* Año 6 **31**:6-10.

- Vovides, A.P, C. Iglesias, M.A. Pérez-Farrera, M. Vázquez Torres & U. Schippmann 1999 Peasant nurseries: a concept for an integrated conservation strategy for cycads in Mexico. Darwin Technical Manual for Botanic Gardens. BGCI, London
- Vovides, A.P. y Peters C.M. (1987) *Dioon edule*: la planta más antigua de México. *Ciencia y Desarrollo* **7** 3:19-24.
- Vovides, A., Ogato, N. y Sosa, V. (1997) Pollination of endangered Cuban cycad *Microcycas calocoma* (Miq.) A.D.C. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **125**:201–210.
- Wang CS y Vodkin LO (1994) Extraction of RNA from tissues containing high levels of procyanidins that bind RNA. *Plant Mol Biol Rep* **12**: 132-145.
- Webb, D.T., Nevarez. M. y DeJesus, S. (1983) Callus initiation and organized development from *Zamia pumila* explants. *Ann. Bot.* **51**:711-717.
- Whitmore T.C. (1990) An Introduction to Tropical Rain Forests. Clarendon Press, Oxford.
- Whiting M.G. (1963) Toxicity of cycads. *Econ Bot*, **17**:271-302.
- World Bank (1995) Mexico: Resource Conservation and Forest Sector Review. World Bank, Washington, DC
- Xu, N., Johns, B., Pullman, G. y Cairney, J. (1997) Rapid and reliable despliegue diferencial from minute amounts of tissue: mass cloning and characterization of diefferentially expressed genes from loblolly pine embryos. *Plant Mol. Biol. Report.* **15**:377-391.
- Zhifeng, G. y Thomas B.A. (1989) A review of fossil cycad megasporophylls, with new evidence of *Crossozamia* Pomel and its associated leaves from the lower Permian of Taiyuan, China. *Review of Palaeobotany and Palynology* **60**: 205-223.