



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

COMPARACIÓN MOLECULAR DE LA
EMBRIOGÉNESIS ENTRE UNA PLANTA
CON REPRODUCCIÓN SEXUAL *ZEA MAYS*
Y UN HÍBRIDO APOMÍCTICO MAÍZ-*TRIPSACUM*

T E S I S

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

P R E S E N T A

BIÓL. AIDÉ JIMÉNEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. OLIVIER LEBLANC

MÉXICO, 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.

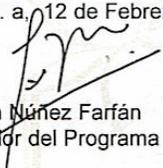
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de Noviembre de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **JIMÉNEZ MARTÍNEZ AIDÉ** con número de cuenta **92102718** con la tesis titulada "**Comparación molecular de la embriogénesis entre una planta con reproducción sexual *Zea mays* y un híbrido apomíctico maíz *Tripsacum***", realizada bajo la dirección del **DR. OLIVIER LEBLANC**.

Presidente: DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ
Vocal: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
Secretario: DR. OLIVIER LEBLANC
Suplente: DRA. GUILLERMINA MURGUÍA SÁNCHEZ
Suplente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 12 de Febrero de 2008.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

Agradezco

Al Posgrado en ciencias biológicas

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios con número de registro 182507.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por la asignación de la beca complementaria.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Olivier Leblac.

Dr. Víctor Manuel Chavés Ávila

Dr. Jean Philippe Vielle-Calzada

Mil gracias

A Dios por su inmenso amor, que me hace ser fuerte ante cualquier adversidad, por enseñarme el camino a seguir y por ayudarme a indagar algunos de sus secretos.

A mi madre por su ejemplo de fortaleza y lucha que siempre me ha demostrado, por su amistad y cariño.

Al Dr. Leblanc, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación, por sus enseñanzas y paciencia. Por todo el apoyo que siempre me brindó. Muchas gracias doc!

A Daniel Grimanelli, por su ayuda tanto en el CIMMYT como en Montpellier.

Al Dr. Víctor Chávez, por su interés en el desarrollo del presente trabajo y por su disposición que siempre muestra a los estudiantes.

Al Dr. Jean Philippe por permitirme estar en su laboratorio en el Cinvestav, Irapuato y ayudarme a forjarme de un carácter para defender mis ideas y decisiones.

A los chicos del CIMMYT, a Martha y Abraham por su apoyo en el lab. A Pedro Alva por enseñarme y ayudarme con las polinizaciones, a Silverio Muñoz por sembrar y hacerse cargo de las plantas que tenía que llevarme a Irapuato. A Stuart y Lucero por su amistad y apoyo al brindarme hospedaje cuando no alcanzaba el camión.

A los apomícticos del Cinvestav, especialmente al Dr. Wilson Huanca y al Dr. Gerardo Acosta quienes me ayudaron a obtener las sondas. Gracias Wilson por tu tolerancia! A la Dra. Marcelina García por su apoyo en las in situs, gracias Andrés, Mario, César, Nadia, Gina y Ana por hacer más agradable mi estancia y por todo lo que aprendí de cada uno. Gracias Regis, por estar ahí cuando más lo necesitaba.

A Leen Jansen y Fabianne Bourgis por brindarme su amistad y hacer grata mi estancia en un país muy ajeno a mi cultura.

Al CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo), Al Institut de recherche pour le développement (IRD) sede Montpellier, Francia por permitirme el acceso y uso de sus instalaciones.

Gracias a la UNAM, la máxima casa de estudios pues le debo toda mi formación académica, orgullosamente puma.

Finalmente, gracias Juan Manuel por el apoyo incondicional para llevar acabo la escritura de este trabajo.

INDICE GENERAL

PAG

ABREVIATURAS

RELACIÓN DE FIGURAS

RESUMEN

1	INTRODUCCION	1
2	REVISIÓN LITERARIA	
2.1.	Generalidades de la reproducción sexual en angiospermas	3
2.1.1	El óvulo, estructura donde se forma el saco embrionario	4
2.1.2	Megasporogénesis	5
2.1.3	Megagametogénesis	5
2.1.4	Anatomía del saco embrionario (<i>Tipo Polygonum</i>)	6
2.1.5	Doble fecundación	7
2.1.6	Embriogénesis	8
2.2	Apomixis	12
2.2.1	Apomixis esporofítica	14
2.2.2	Apomixis gametofítica	16
2.2.2.1	Aposporia	16
2.2.2.2	Diplosporia	17
2.3	Estudios de la expresión de genes en plantas sexuales	20
2.3.1	Genes marcadores del desarrollo de endospermo y embrión	21
2.3.2	Técnicas para el análisis de la expresión de genes	23
2.4	Plantas híbridas apomícticas maíz- <i>Tripsicum</i> como modelo para investigar procesos de la embriogénesis en plantas.	24
3	OBJETIVOS	27
4	MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1	Origen del material utilizado	28

4.2	Procedimiento para los análisis de RT-PCR	29
4.2.1	Extracción de RNA	29
4.2.2	Trascrición reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	30
4.3	Procedimiento para los estudios de whole-mount <i>in situ</i>	33
4.3.1	Obtención de sondas	34
4.3.1.1	Clonación de <i>KN1</i> y verificación de la orientación del inserto	34
4.3.1.2	Transcripción <i>in vitro</i>	37
4.3.1.3	Obtención de la sonda de <i>LTP2</i>	37
4.3.2	Fijación de muestras	39
4.3.3	Rehidratación y acidificación de muestras	39
4.3.4	Montaje de las muestras	39
4.3.5	Tratamiento con proteasa y refinación	40
4.3.6	Prehibridación de tejido	40
4.3.7	Preparación de sonda	41
4.3.8	Hibridación	41
4.3.9	Lavados	41
4.3.10	Detección de señal mediante antiDIG-AP	42
4.4	Inmunolocalización de AGL15	43

5. RESULTADOS

5.1	Análisis de expresión usando RT-PCR	45
5.1.1	Consideraciones generales	45
5.1.2	Genes del endospermo: los <i>ESRs</i>	45
5.1.3	Genes marcadores del desarrollo del embrión	46
5.2	Análisis de expresión mediante <i>Whole mount in situ</i>	48
5.2.1	Obtención de sondas para la Hibridación <i>in situ</i>	48
5.2.2	Expresión de <i>KN1 in situ</i> en embriones de 10ddp	50
5.2.3	Expresión de <i>LTP2</i> en proembriones	51
5.3	Localización de la proteína AGL15	52

6.	DISCUSIÓN	53
7.	CONCLUSIONES	61
8.	REFERENCIAS	62
	APÉNDICE I	71
	APÉNDICE II	72
	APÉNDICE III	73

ABREVIATURAS

cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementario
gDNA:	Ácido desoxirribonucleico genómico
CMM:	célula madre de la megaspóra
DAPI	4´6-diamidino-2-fenilindol
ddp:	días después de la polinización
DEPC:	Dietil pirocarbonato.
dNTPS:	desoxinucleótidos
FITC	Isotiocinato de Fluoresceína
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
MAT	Meristemo Apical del tallo
pb	pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR:	Transcripción Reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
WISH	Hibridación <i>in situ</i> tipo Whole mount

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1 Óvulo anátropo con saco embrionario tipo *Poligonum*.

Figura 2. Desarrollo embrionario de maíz.

Figura 3 Mecanismos de formación del saco embrionario sexual vs apomítico

Figura 4 Generación de sonda *KN1*.

Figura 5 Generación de sonda *LTP2* mediante PCR

Figura 6 Expresión de genes específicos de endospermo (*ESR*) y de embrión (*KN1*, *OCL5* y *HOX*), en diferentes estadios de desarrollo de endospermo y embrión en el híbrido 38C.

Figura 7 Obtención de sondas

Figura 8 Localización del mRNA de *KN1* en embriones de 10ddp de 38C

Figura 9 Localización del mRNA de *LTP2* en proembriones apomíticos

Figura 10 Localización de la proteína AGL15 en proembriones de 38C de 0 ddp.

Figura 11 Secuencia del cDNA del gen *KN1*.

Figura 12 Secuencia de *LTP2*

RESUMEN

El presente trabajo pretendió aportar a la caracterización de la embriogénesis de híbridos apomícticos maíz-*Tripsacum*, tomando en cuenta genes con patrón de expresión en el embrión y endospermo del maíz sexual, con la finalidad de observar las similitudes o diferencias entre ambos tipos de desarrollo embrionario. Los híbridos apomícticos denominados 38C desarrollan un proembrión sin fecundación de la célula huevo. Sin embargo presentan pseudogamia, es decir que el proembrión terminará su desarrollo sólo si hay presencia de endospermo, lo que implica la fertilización de la célula central. Genes específicos del endospermo como *ESR*, ó genes expresados en el embrión como *HOX*, *OCL5*, y *KN1* fueron estudiados por RT-PCR. Por otro lado, los genes *LTP2* y *KN1* fueron observados en proembriones y embriones en fase de transición respectivamente, mediante la técnica de Whole mount *in situ*. Finalmente la proteína AGL15 fue estudiada en proembriones mediante inmunolocalización.

Los resultados muestran algunas leves diferencias en el tiempo de expresión sólo en *ESR* y posiblemente en la proteína AGL15. Dichas diferencias pueden deberse a las diferencias implícitas del programa de desarrollo sexual y apomíctico *per se* pero también a efectos relacionados con el exceso de dosis genómica maternal.

SUMMARY

The aim of this work was to compare molecularly early embryogenesis in maize-*Tripsacum* apomictic hybrids and sexual maize. Embryo development in maize-*Tripsacum* apomicts initiate prior to fertilization and mature female gametophytes contain a quiescent proembryo. Seed development requires endosperm formation after fertilization of the central cell, an event that seems to be critical for the embryo to resume its development. In order to determine whether proembryo development in apomicts is similar to that of early zygotic embryos in sexual maize, genes with known expression pattern during early seed development in maize were characterized in apomictics. First, RT-PCR analyses were performed to assess expression of *ESRs* that are expressed specifically in the early endosperm, and of genes that mark embryo development in maize as *HOX*, *OCL5*, and *KN1*. In addition, cell biology approaches were used to determine expression patterns in apomict embryos of *KN1* and *LTP2* through whole mount *in situ* hybridization experiments, and of *AGL15* through immunolocalization. The results showed slight variation in expression for *ESR*'s genes and *AGL15* protein. These might results from differences in the sexual and apomictic developmental program. Alternatively they may reflect maternal genomic excess, a dosage effect consequence of apomictic reproduction.

INTRODUCCION

La apomixis es un modo de reproducción, que consiste en la formación de semillas sin la fecundación de la célula huevo, es decir los embriones que surgen son copias genéticamente exactas de la planta madre (Asker y Jerling, 1992). La reproducción apomíctica se ha observado en al menos 400 especies de plantas de 40 familias diferentes, entre las más comunes Poaceae, Asteraceae, Rosaceae y Rutaceae (Carman, 1997). Excepto en *Citrus* y algunos forrajes tropicales (p. ej. *Brachiaria*, *Paspalum*), la apomixis no es común en cultivos comercialmente importantes (arroz, maíz, trigo, etc.). Por ello el interés sobre los procesos relacionados con la apomixis, se basa principalmente en la potencial transferencia de la apomixis a cultivos de interés que se reproducen sexualmente, con la finalidad de fijar y mantener genotipos seleccionados que pueden perderse mediante la segregación de caracteres en la reproducción sexual (Vielle-Calzada *et al*; 1996). En el grupo de investigación donde se realizó este trabajo se produjeron híbridos apomícticos provenientes de cruzas entre maíz (*Zea mays*) y un pariente silvestre apomíctico (*Tripsacum dactyloides*). En plantas apomícticas de *Tripsacum* y en los híbridos mencionados, se ha observado la generación de un proembrión, por partenogénesis de la célula huevo y el paro de su desarrollo hasta que ocurra el proceso de fertilización de la célula central y comience la formación del endospermo (Grimanelli *et al*; 2003). La necesidad de la formación del endospermo para que continúe el desarrollo del proembrión apomíctico muestra que la interacción embrión-

endospermo es importante y sugiere la posibilidad de que existan señales responsables de la reiniciación del desarrollo del proembrión apomítico. Estas señales podrían ser las mismas que dirigen el programa de desarrollo de los embriones de origen sexual, y su activación permitiría sincronizar el desarrollo embrionario con el endospermo. Por lo anterior, la caracterización molecular de los híbridos apomíticos maíz-*Tripsacum* pueden ayudar para investigar y comprender varios aspectos de la embriogénesis de plantas, en las etapas iniciales y las relaciones entre los dos productos de la fecundación (embrión y endospermo).

El presente trabajo pretendió contribuir a la descripción molecular del desarrollo del embrión maternal de un híbrido maíz-*Tripsacum* para conocer si existen diferencias entre el programa genético que opera en el desarrollo del embrión con origen sexual y el de origen apomítico.

Revisión literaria

2.1 Generalidades de la reproducción sexual en angiospermas

En general, el ciclo biológico de las plantas es un ciclo diplo-haplofásico, es decir pasan por una fase esporofítica diploide ($2n$), la cual es predominante y una fase gametofítica haploide (n), muy reducida. La función de la fase esporofítica es la de producir esporas, mientras que la fase gametofítica, los gametos (Drews y Yadegari, 2002). Las angiospermas se caracterizan porque sus óvulos (y posteriormente sus semillas) se encuentran encerrados en una estructura especial, el ovario, dicha estructura se localiza en las flores (Cronquist, 1995).

Una flor es básicamente un tallo modificado y en las angiospermas consta de cuatro verticilos que constituyen tanto la parte fértil como infértil de la flor. Los sépalos y los pétalos forman la parte estéril, mientras que los órganos involucrados en el proceso de reproducción sexual son los estambres y los carpelos, que representan la parte masculina y femenina respectivamente. Los estambres tienen en su parte superior, anteras y en éstas se producen los granos de polen, los cuales son los gametofitos masculinos. Cada grano de polen posee 3 células, una célula vegetativa y dos células espermáticas. Por otra parte el gametofito femenino es el megagametofito o saco embrionario y cada saco embrionario se desarrolla dentro del óvulo. Como se mencionó anteriormente, los óvulos se encuentran dentro de los ovarios, y éstos se localizan en general en la parte basal de los carpelos. Los carpelos también

contienen estilos y estigmas. Los estigmas son la estructura receptora de los granos de polen y el estilo es el canal por donde se abre camino el tubo polínico hasta el óvulo. El proceso de fertilización es precedida por la transferencia del grano de polen desde las anteras hacia el estigma, una vez que el polen es reconocido, germina y se abre paso por el estilo hasta alcanzar la vecindad del saco embrionario. Uno de los núcleos de las células espermáticas del grano de polen, fertilizará a la célula huevo para producir el embrión, mientras que el otro núcleo se fusionará con los núcleos polares de la célula central para dar origen al endospermo. La doble fecundación marca el fin de la fase gametofítica y el inicio de la fase esporofítica (Raghavan, 1997).

A continuación se exponen los procesos más importantes en la formación del saco embrionario hasta la formación del embrión primordialmente del maíz con el objeto de dar marco de referencia para la comprensión del desarrollo embrionario en plantas sexuales para después analizar el proceso de desarrollo embrionario de plantas apomícticas las cuales son objeto del presente estudio.

2.1.1 El óvulo, estructura donde se forma el saco embrionario

La estructura fundamental donde se realizan procesos esenciales en el desarrollo embrionario de plantas es el óvulo, consiste de tres estructuras básicas: una nucela, uno o dos integumentos y un funículo. Es en el óvulo donde a partir de la diferenciación de una célula arqueosporial, se forma el saco embrionario. Para la formación del saco embrionario es necesario que ocurran dos procesos la megasporogénesis y la megagametogénesis (Figura 3A). El

saco embrionario contiene el gameto femenino y es el lugar donde se realiza la doble fecundación, además es donde ocurre la formación del embrión, es decir, la embriogénesis (Figura 1).

2.1.2 Megasporogénesis

La megasporogénesis es el proceso de formación del megasporocito o célula madre de la megaspora (CMM). Dicho proceso comienza con el alargamiento de una célula nucelar subdermal conocida como arquesporium, ésta célula puede funcionar directamente como megasporocito, o puede experimentar una división mitótica para producir el megasporocito y una célula somática (Reiser, y Fisher, 1993). Durante la megasporogénesis, la calosa se acumula en las paredes de la CMM y luego en la megasporas (Rodkiewicz, 1970). El megasporocito sufre una división meiótica y produce cuatro megasporas haploides, de las cuales 3 degeneran y solo permanece una megaspora funcional. Se ha observado que las células que degeneran están cubiertas por calosa, mientras que la megaspora funcional no, por ello se ha propuesto que la calosa tiene un papel importante en la determinación de la megaspora funcional (Grossniklaus, 2001). En el maíz la megaspora que sobrevive se encuentra hacia el lado chalazal (Kiesselbach, 1949).

2.1.3 Megagametogénesis

La megagametogénesis es el proceso de generación del saco embrionario, a partir de la megaspora funcional. El patrón de formación del saco embrionario

que se explica a continuación, es el más común denominado tipo *Polygonum*, que se encuentra en aproximadamente 70% de las especies estudiadas a la fecha, abarcando tanto monocotiledóneas (p.ej. *Zea mays*) como dicotiledóneas (p.ej. *Arabidopsis*). En este tipo la megaspora funcional experimenta tres divisiones mitóticas continuas que forman primero un sincicio y posteriormente al celularizarse se culmina con un saco embrionario compuesto de 7 células y ocho núcleos (Randolph, 1936)

2.1.4 Anatomía del saco embrionario (*Tipo Polygonum*)

Célula huevo: Se ubica en el extremo micropilar. La célula huevo se fusiona con núcleo espermático para producir un cigoto. La distribución del citoplasma en el huevo es polarizada, debido a la presencia de una gran vacuola que restringe el núcleo y la mayor parte del citoplasma hacia el lado chalazal (Reiser y Fisher, 1993).

Células sinérgidas Localizadas a ambos lados de la célula huevo, juegan un papel muy importante en la fertilización. El polen descarga su contenido en una de ellas antes de la incorporación del núcleo espermático en la célula huevo y la célula central (Russell, 2003, Reiser y Fisher, 1993).

Célula central. Se encuentra en el centro del saco embrionario. Esta célula contiene dos núcleos polares, una vacuola de gran tamaño y muchos organelos citoplásmicos. Estos dos núcleos pueden parcialmente fusionarse antes de que

ellos sean fertilizados por un núcleo espermático y formar un endospermo triploide.

Células antipodas: Estas células se localizan en el extremo chalazal. Aún es discutible su función. Una de las hipótesis es que son responsables de la transferencia de nutrientes al saco embrionario.

Se han observado numerosos ribosomas y mitocondrias en las células sinérgidas, células centrales y antipodales, lo que sugiere alta actividad metabólica, por el contraste la célula huevo tiene pocos ribosomas, plastidios, etc., (Reiser y Fisher, 1993).

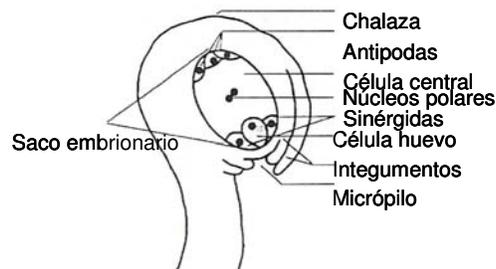


Figura 1 Óvulo anátropo con saco embrionario tipo *Polygonum*

2.1.5 Doble fecundación

El proceso de doble fecundación es la principal característica de las angiospermas y fue descrito por primera vez por Sergius Nawashin y Leon Guignard de forma independiente a finales del siglo XIX (Dumas y Mongensen, 1993). Sin embargo también se ha observado en plantas que no forman parte del grupo de las angiospermas como en *Ephedra* y *Gnetum* (Friedman, 1990)

La fertilización comienza cuando el tubo polínico entra al óvulo por medio del micrópilo y penetra en una de las dos sinérgidas, descargando sus núcleos espermáticos en su citoplasma. La sinérgida penetrada comienza un proceso de muerte celular, sin embargo en algunas especies el proceso de muerte celular de la sinérgida comienza antes de la llegada del tubo polínico (Drews y Yadegari, 2002). Posteriormente los núcleos espermáticos migran hacia sus blancos, uno hacia la célula central, y otro hacia la célula huevo (Russell, 2003). El resultado de esta doble fecundación es por un lado un cigoto diploide y por el otro un endospermo triploide. El embrión se alarga pero no se divide, mientras que el endospermo se divide por mitosis sin citocinesis formando un sincicio. En cereales donde el endospermo persiste, éste tejido se encarga no sólo de proveer al embrión de nutrimentos sino además le transfiere hormonas necesarias para el proceso de germinación, y debido a su alto potencial osmótico el endospermo brinda además soporte mecánico al embrión durante su desarrollo. En las especies en las que no persiste el endospermo, la función de proveer alimento al embrión es sustituido por los cotiledones (Chaudhury *et al*; 2000).

2.1.6 Embriogénesis

El desarrollo del embrión que se describirá a continuación es el que se realiza en el maíz siguiendo principalmente la clasificación de Abbe y Stein (1954) que se basa en el desarrollo del ápice del tallo, sin embargo se añade la fase de proembrión de acuerdo a la descripción de Randolph (1936), (Figura 2). El

intervalo de tiempo en el que se puede observar las distintas fases es el que Abbe y Stein reportan, pero estos pueden variar porque el desarrollo del embrión depende en gran medida del genotipo y de las condiciones ambientales.

Proembrión: La primera división del cigoto es asimétrica, de tal forma que siempre se forma una célula pequeña apical y una célula basal de mayor tamaño. Durante aproximadamente los 8 días siguientes a la polinización el crecimiento del proembrión se limita sólo a la región apical produciéndose divisiones de tal forma que el embrión es más ancho en la región apical con respecto a la región basal donde ocurren pocas divisiones (Randolph, 1936).

Fase de transición: Debido a un crecimiento más rápido en la parte apical que en la región basal, se diferencian claramente dos zonas, la que desarrollará en embrión y el suspensor. La fase de transición se distingue porque hay una transición de una simetría radial a una simetría bilateral debido a que comienza a notarse una prominencia lateral sobre la zona del embrión, esta prominencia esta destinada a desarrollarse como el ápice del tallo. Esta fase puede observarse de 10 a 12 ddp.

Fase Coleoptilar: En esta fase ya se puede reconocer el ápice del tallo el cual surge de la prominencia lateral del embrión antes mencionado. El ápice del tallo es una región donde se localiza células meristemáticas indiferenciadas que originan a su vez el primordio coleoptilar y el escutellum. En esta fase se observa el primordio coleoptilar “como un anillo” que rodea al ápice del tallo y el resto del embrión se ha vuelto dorsiventralmente plano formando el escutellum.

Estado 1: La región del embrión mide aproximadamente 1mm y aún persiste el suspensor. En esta fase el escutellum se ha alargado y tiene un surco desde el cual el futuro tallo emergerá. Se observa el primordio de la primera hoja, este primordio se inserta de manera opuesta a la inserción del escutellum. Puede observarse entre los 14-22 ddp.

Estado 2: En esta fase la región del embrión mide aproximadamente 2 mm y el suspensor va siendo cada vez menos visible. El escutellum se alarga aún más y su surco se vuelve más pronunciado. El coleóptilo se vuelve más largo y más ancho y aparece el poro coleoptilar. Dentro del coleóptilo el tallo se observa como un eje corto que contiene dos primordios de hojas pero que carecen de internodos. La aparición del segundo primordio de hoja es lo que da el nombre a este estado, el cual ocurre entre los 18-22 ddp.

Estado 3: Se observa entre los 22-28 días ddp. El embrión mide aproximadamente 3 mm. El escutellum toma una forma ovoide con el surco aún más pronunciado, aparece el nodo escutelar el cual se identifica porque aparecen dos constricciones. Se forma la coleorriza en la parte basal del nodo escutelar y dentro de ésta estructura se puede ver la raíz primaria. Dentro del coleóptilo la primera hoja ha aumentado su tamaño y aparece el tercer primordio de hoja.

Estado 4: El embrión puede medir entre 5-6 mm, el surco escutellar ha crecido de tal forma que envuelven casi completamente al nudo escutelar, el coleóptilo con su pequeño poro sobresale ligeramente del surco escutelar. El escutellum

se vuelve dorsiventralmente plano. Se observa el mesocotilo, el cual es la región que se encuentra entre el nodo escutelar y entre el nodo coleoptilar. En el coleóptilo se distingue el primordio de la cuarta hoja. Esta fase se puede observar entre 28-37ddp.

Estado 5: Aparece el quinto primordio de hoja, así como el primordio de la raíz seminal cerca de la base del mesocotilo. Esta fase se puede observar desde los 37-50ddp.

Estado 6: Esta fase es la etapa que marca la madurez del embrión, es decir que ya está completamente formado y aparece el primordio de la sexta hoja.

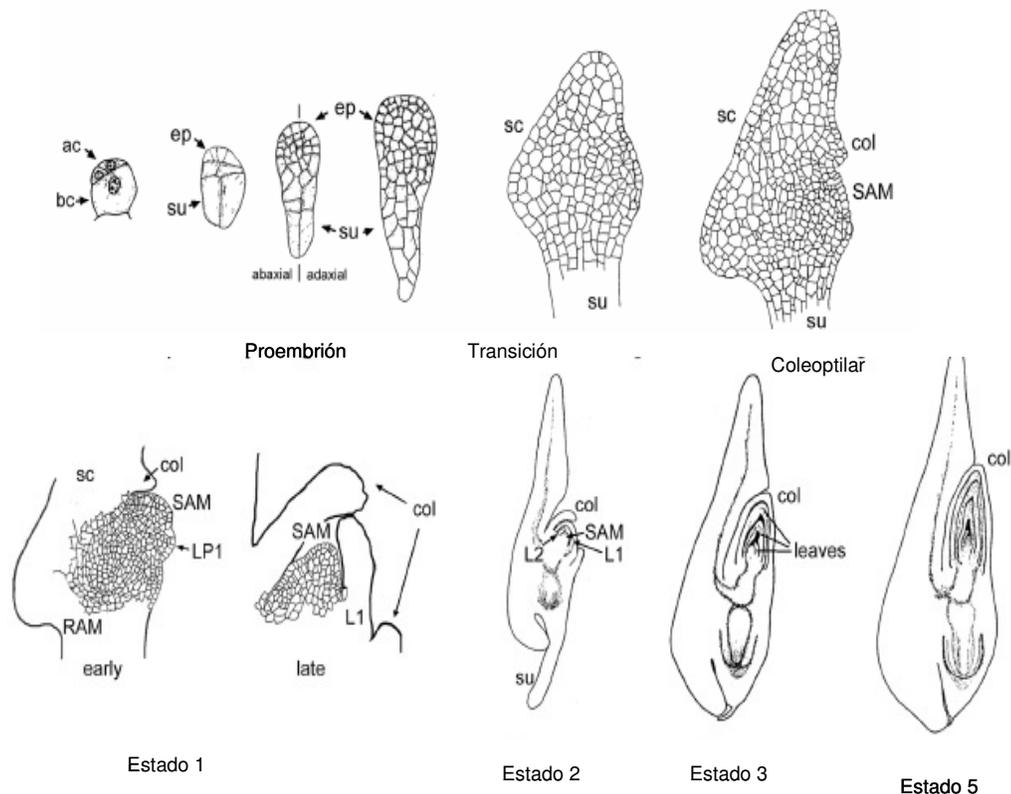


Figura 2. Desarrollo embrionario de maíz. Se muestran las diferentes fases del desarrollo del embrión de maíz. Tomado de Bommert y Werr (2001) con modificaciones para adaptarlo a lo descrito por Randolp (1936) y Abbe y Stein (1954). ac células apicales, bc células basales. ep región propia del embrión, su suspensor, sc scutellum, col coleóptilo. SAM,meristemo apical del tallo, RAM Meristemo apical de la raíz, L1. primera hoja foliar.

2.2 Apomixis

A pesar de que la mayoría de las plantas se reproducen sexualmente, realizando los eventos descritos, existen plantas en las que se observa un fenómeno denominado apomixis, las características y tipos de este tipo de reproducción, se detallan a continuación:

“Apomixis” es una palabra de origen griego (Apo=separación o falta de y mixis=mezclar), que fue usado por primera vez por Winkler en 1908 para definir aquél modo de reproducción que no incluía la fusión de gametos (Asker y Jerling 1992). Esta definición daba al término apomixis un sentido muy amplio que abarcaba varios tipos de reproducción asexual que ocurren en plantas (p ej. la fragmentación de gemas en briofitas, propagación por bulbos, estolones, rizomas etc.). Sin embargo, conforme el paso del tiempo éste concepto fue modificándose hasta que Nogler en 1984 define a la apomixis como agamosperma, es decir, la reproducción asexual por medio de las semillas por lo cual reduce el término apomixis al grupo de plantas superiores que pueden dar semillas como las gimnospermas y angiospermas.

El primer reporte del fenómeno de la apomixis en plantas superiores tuvo por título “Notice of a plant which produces seeds without any apparent action of pollen” en 1841 por J. Smith, quien describió la reproducción de *Alchornea ilicifolia* (Bicknell y Koltunow, 2004). Más tarde Gregorio Mendel fue uno de los pioneros en realizar trabajo experimental con diversas especies de *Hieracium*, estos trabajos lo llevaron a tener complicaciones sobre la validez de las leyes de

la herencia deducidas en *Pisum*, pues sin saberlo en aquella época, *Hieracium*, es un género predominantemente apomíctico y por lo tanto los resultados de sus cruza que realizaba con esta planta no correspondían a ninguna de sus famosas proporciones. En el inicio del siglo XIX varios trabajos que describían la embriogénesis de plantas apomícticas, se dieron a conocer, Juel (1898) demostró en *Antennaria alpina* que la CMM no entra a meiosis, sino que directamente por mitosis se da paso a la formación de un saco embrionario de tipo *Polygonum* no reducido, prosiguió después con la descripción de la embriología de *Taraxacum*, donde observó la falla en la profase de la primera división meiótica, que conlleva a la restauración del núcleo y que por mitosis forma el saco embrionario. Asimismo, Rosenberg (1907) demostró la aposporia en *Hieracium* (Asker y Jerling, 1992).

Conforme avanzó el estudio embriológico de diferentes especies de plantas se describieron varios tipos de sacos embrionarios, sacos que incluían el proceso de meiosis como el tipo clásico *Polygonum*, el más común en especies sexuales y sacos apomeioticos dentro de estos se encuentran, el tipo *Ayllus*, tipo *Taraxacum*, tipo *Iréis*, tipo *Antennaria*, tipo *Hieracium*, tipo *Eragrostis* y tipo *Panicum* (Carman, 1997). Sin embargo, una de las clasificaciones más prácticas para comprender el desarrollo de plantas apomícticas la cual expone a continuación es la de Asker y Jerling, realizada en 1992, en donde se retoma las clasificaciones clásicas de Gustafsson (1946) y Stebbins (1950) excepto que descarta la propagación vegetativa que tanto Gustafsson y Stebbins incluían dentro de la apomixis. Asker y Jerling (1992), reconocen 2 grupos principales de

apomixis: la apomixis esporofítica o embriogénesis adventicia y la apomixis gametofítica.

2.2.1 Apomixis esporofítica

La apomixis esporofítica consiste en la formación de embriones somáticos desde el tejido ovular (nucela o integumentos), lo que implica que los embriones surgen de tejido exclusivamente esporofítico (Asker y Jerling, 1992; Koltunow, 1993). Las células integumentarias y nucelares que dan origen al embrión son llamados embriocitos (Naumova, 1993). Los factores que inician las divisiones en el tejido ovular para formar un embriocito aún se desconocen pero son independientes a la fertilización. Los embriocitos permanecerán en fase de proembrión hasta que ocurra la fertilización y entonces el embriocito sufre una serie de mitosis que culminan en la formación de un embrión somático. Los factores que desencadenan la continuación del desarrollo del embriocito también se desconocen.

Como se explicó anteriormente el saco embrionario tiene una célula huevo que al ser fertilizada origina un embrión sexual y a su vez por fertilización de la célula central surge el endospermo, éste último no solo soporta el desarrollo del embrión sexual sino además el desarrollo de los embriones somáticos que da por resultado la competencia por los nutrimentos entre el embrión sexual y el embrión ó embriones somáticos, pues es muy frecuente la poliembriónía (Savidan, 2000).

La embriogénesis adventicia o apomixis esporofítica se ha observado en 52 familias de plantas (Carman, 1997) y fue Strasburger el pionero del estudio de la embriogénesis adventicia, término que él acuñó y caracterizó el fenómeno de la poliembriogénesis en distintas especies (*Citrus aurantium*, *Mangifera indica*, *Alchornea ilicifolia* entre otros). Los embriocitos pueden tener una morfología distinta a la del embrión sexual debido a que el espacio de la nucela es muy reducido en comparación con la del saco embrionario. En general los embriocitos muestran citoplasma denso y volumen mayor al que presentan otras células nucelares. Este citoplasma denso está constituido de abundantes ribosomas, mitocondrias y plastidios lo que sugiere una alta actividad fisiológica. Las paredes celulares de los embriocitos son gruesas y carecen de plasmodesmos y el desarrollo de cada uno de los embriocitos es asincrónico (Naumova, 2001). En embriocitos de *Citrus* se observa una síntesis de almidón y nula presencia o pocos cuerpos lípidicos, mientras que en otras células nucelares la síntesis de lípidos es predominante, por lo que se aprecia que los embriocitos difieren en sus procesos metabólicos (Naumova, 1993). Los procesos de diferenciación entre los embriocitos son muy similares a lo que ocurre en el embrión sexual pues también éstos últimos tienen una alta actividad metabólica y se aíslan de las demás células de su entorno. Sin embargo, el embrión que se desarrolla dentro del saco embrionario, desde sus primeras divisiones es una estructura polarizada, debido a que en su primer división del cigoto se originan dos células de tamaño diferente, en cambio los embriocitos no tienen un patrón que indique polarización de manera inmediata. En *Citrus* se ha

observado que los embriocitos que continúan su desarrollo una vez dada la fertilización son preferentemente los que se encuentran del lado micropilar cerca del el embrión sexual, mientras que los del lado chalazal, es decir, cerca del endospermo siguen parados en su desarrollo. Lo anterior ha hecho surgir la hipótesis que el endospermo puede por medio de alguna señal inhibir el desarrollo de los embriocitos que se encuentra cerca (Watana y Uemoto, 1988).

2.2.2 Apomixis gametofítica

En la apomixis gametofítica se producen sacos embrionarios a partir de células no reducidas, y la célula huevo desarrolla por partenogénesis dando por resultado el desarrollo de un embrión. Dentro de la apomixis gametofítica podemos encontrar dos subdivisiones: la aposporia y la diplosporia (Asker y Jerling, 1992). Se han reportado que existe aposporia y diplosporia en 21 familias de plantas (Carman, 1997).

2.2.2.1 Aposporia

La aposporia es la formación mitótica de un saco embrionario no reducido desde una célula que difiere de la posición ocupada por la CMM (Koltunow y Grossniklaus, 2003). Es característico que las células somáticas “apospóricas” que originan el saco se encuentren en el centro del tejido nucelar cerca de la CMM (Figura 3D). Las células nucleares apospóricas son grandes con un núcleo también prominente. Existen dos tipos de sacos apospóricos que se pueden formar: el tipo *Hieracium* bipolar, y *Panicum* monopolar. *Hieracium* forma un

saco embrionario después de tres mitosis de las células nucelares y origina un saco con un fenotipo similar al del tipo *Polygonum* es decir 7 células y ocho núcleos con la diferencia de que todas sus células son $2n$. En el caso de *Panicum* el saco embrionario resultante es tetranucleado, careciendo de las células antipodales, éste saco es originado a partir de sólo dos divisiones mitóticas. En la aposporia es frecuente encontrar formación de varios sacos embrionarios simultáneamente de los cuáles uno de ellos se origina por medio de un proceso meiótico y esto lleva a la formación de poliembrionía. Sin embargo, el saco embrionario de origen sexual es abortado y es reemplazado por la formación de sacos embrionarios apospóricos (Savidan, 2000).

2.2.2.2 Diplosporia

En la diplosporia se forma un saco embrionario no reducido a partir de la CMM, se conocen dos mecanismos principales uno de ellos consiste en que la CMM tiene una meiosis fallida y que es sustituida por una serie de mitosis que finalizan en la formación de un saco embrionario (diplosporia meiótica). Otra manera, consiste en que la CMM por medio de mitosis forma directamente un saco embrionario no reducido (diplosporia mitótica). A diferencia de lo que ocurre en la reproducción sexual donde la CMM se recubre de calosa, en la diplosporia no hay depositación de calosa en la CMM, ni en las 4 megasporas que se forman posteriormente (Leblanc, *et al*; 1995). Este hecho es interesante debido a que tampoco hay síntesis de calosa en la CMM en plantas de

Medicago sativa mutantes en el proceso de meiosis, que originan sacos embrionarios no reducidos (Barcaccia, *et al*;1996).

Uno de los casos de diposporia meiótica estudiados es el que se lleva a cabo en el género *Taraxacum*, donde la CMM comienza su meiosis pero no se realiza la recombinación genética, esta carencia de quiasmas resulta en cromosomas univalentes que se congregan y descondensan restituyendo el núcleo, posteriormente en la segunda división meiótica se producen dos células que no se redujeron, de las cuales sólo una de ellas sufre 3 divisiones mitóticas y produce un saco no reducido de ocho núcleos (Figura 3C). Existen otros géneros como en *Irèxis* que siguen el mismo patrón que el tipo *Taraxacum*, excepto que después de que se restituye el núcleo y continúa con la segunda división meiótica donde si bien se da la división de núcleos no se forma la pared celular, así que los núcleos no reducidos derivados contribuyen a la formación del saco embrionario. Uno de los casos de diplosporia raros es el de tipo *Allium*, en el cual la CMM sufre una endoduplicación antes de que empiece la meiosis, esto trae por consecuencia que en la meiosis I, en la etapa de entrecruzamiento se aparezcan cromosomas idénticos en vez de homólogos que originan 4 células con núcleos no reducidos y con la misma información genética que la planta madre, de las cuatro células solo una se divide tres veces mitóticamente y forma el saco (Crane, 2001).

En el género *Antennaria* se observa la diplosporia mitótica, en donde la CMM no entra en meiosis, si no que directamente por tres divisiones consecutivas forma

un saco embrionario octanucleado (Figura 3B). También, la mayoría de las especies de *Tripsacum*, forman su saco embrionario tipo *Polygonum* siguiendo el patrón de diplosporia mitótica. *Tripsacum*, es un pariente silvestre del maíz, y se extiende a lo largo de toda América, se han descrito 16 especies en este género y la mayoría de las especies se encuentran en México, el cual se considera ser su centro de diversidad genética (Berthaud y Savidan, 1989). Las especies de *Tripsacum* presentan diferentes niveles de ploidía, pero se ha determinado que las especies diploides se desarrollan sexualmente, mientras que las especies poliploides son apomícticas (Leblanc, *et al*; 1995). Asimismo en los *Tripsacum* poliploides se observa una baja proporción de plantas que se reproducen sexualmente. La poliploidía es generalmente relacionada con la apomixis, así como que ésta sea facultativa, es decir, que un pequeño porcentaje de plantas apomícticas pueden en un momento dado reproducirse sexualmente (Stebbins, 1950). *Tripsacum dactyloides* es la especie parental del híbrido de interés en el presente estudio, la otra especie parental es el maíz (*Zea mays*). Estudios previos demostraron que la hibridación entre los diferentes géneros *Zea vs Tripsacum* era posible (Mangelsdorf y Reeves, 1931) necesitándose de 5 a 6 *retrocruzas* para conseguir híbridos que recuperaran los 20 cromosomas del maíz (Harlan y Wet, 1977).

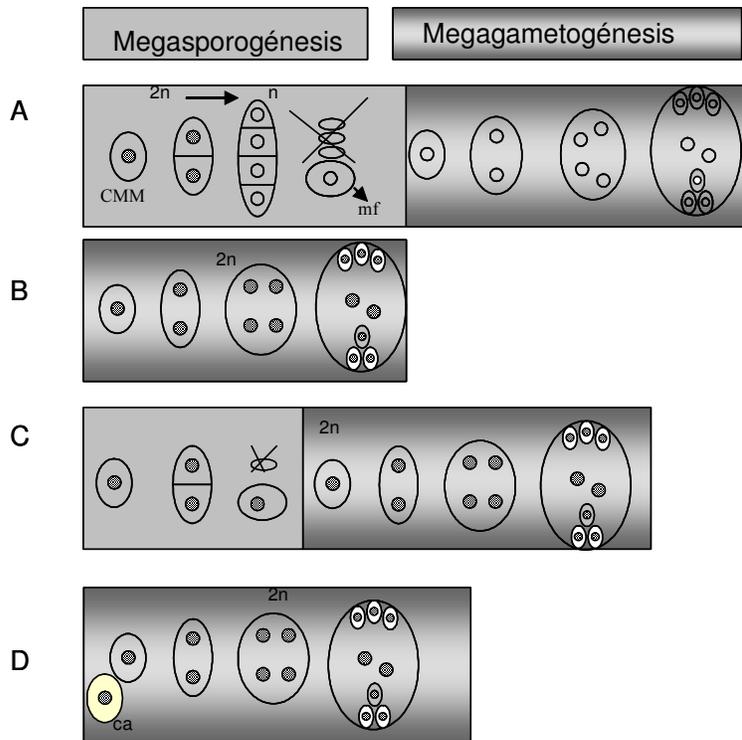


Figura 3 Mecanismos de formación del saco embrionario sexual vs apomítico: A) Desarrollo sexual donde a partir de una CMM por meiosis se forma una mf reducida y origina un saco embrionario con células reducidas B) Esquematiza el desarrollo tipo *Antennaria* en la cual a partir de una espora no reducida se forma directamente por mitosis un saco embrionario C) Desarrollo tipo *Taraxacum*, en la cual la meiosis es abortada para restituir el núcleo y producir un saco embrionario sólo por mitosis D) La aposporia forma un saco embrionario desde una "célula apospórica". El saco embrionario que se ejemplifica es de tipo *Polygonum*. Núcleos no reducidos se muestran rellenos, los núcleos reducidos se presentan huecos, ca= célula apospórica, CMM célula madre de la megaspora, mf=megaspora funcional.

2.3 Estudios de la expresión de genes en plantas sexuales

En el maíz han encontrado genes cuya localización de su RNAm o de su proteína es específica en alguna región del desarrollo del embrión y del endospermo, aunque en la mayoría no es clara su función, una revisión sobre algunos de estos genes, se presenta a continuación, con la finalidad de dar las bases por los que fueron elegidos para el presente estudio. Para la descripción se toma en cuenta principalmente la información sobre su expresión espacio-temporal en el embrión.

2.3.1 Genes marcadores del desarrollo de endospermo y embrión

El desarrollo del endospermo comienza una vez fecundada la célula central, con un proceso intenso de división de núcleos, los cuales migran a la periferia, posteriormente comienza su celularización, que se realiza desde la periferia hacia el centro hasta llenar completamente la cavidad del endospermo (Olsen, 2001). El proceso de celularización termina a los 4-5ddp y una vez concluido su desarrollo se pueden observar cuatro regiones: la aleurona, el endospermo amiláceo, el endospermo basal, y una región del endospermo que rodea al embrión. En la región del endospermo que rodea al embrión, se ha encontrado expresión de tres, los *ESR*. Estos genes son pequeños (500pb), sin intrones y por estudios de RT-PCR e hibridación *in situ* se reveló que su expresión comienza a los 5ddp y a los 7ddp alcanza su nivel máximo para después disminuir drásticamente, los tres genes presentan el mismo patrón de expresión por lo que se cree que son funcionalmente redundantes (Opsahl-Ferstad, *et al*; 1997; Bonello *et al*; 2000). Las proteínas ESR tienen un péptido señal y se ha demostrado que son secretadas. (Bonello *et al*; 2002).

En lo que respecta al desarrollo del embrión, tempranamente el RNAm del gen *LTP2* se puede observar de manera específica en el proembrión en la capa externa de la epidermis de lo que es propiamente el embrión, pues está ausente en el suspensor y por tanto marca la diferencia entre la parte apical y basal del proembrión (Sossountzov *et al*; 1991). Sin embargo, el RNAm de *LTP2* no cubre toda la epidermis, pues esta ausente también en las células protodermales

de la región donde surge el meristemo del tallo (Bommert y Werr, 2001). También una familia de cinco genes se expresan en las células de la epidermis, son los genes *ZMOCL1-5*, lo interesante de éstos es que el RNAm de cada uno, se distribuye de forma diferente, por ejemplo *ZMOCL4* se localiza en las células de la epidermis en la cara adaxial del protodermo, mientras *ZMOCL5* lo hace en el lado abaxial (Ingram et al; 2000). Otros genes, como los *ZmHox*, que poseen una secuencia de DNA homeótica la cual se encuentra en genes que controlan procesos de desarrollo en *Drosophila*, vertebrados y hasta levaduras presentan un patrón de su RNAm localizado en todas las células propias del proembrión, es decir, están ausentes en el suspensor (Klinge y Werr 1995). También *KN1* es otro gen con caja homeótica, cuyo RNAm se restringe a la zona del meristemo apical del tallo (MAT) es decir, en la fase de transición a los 9-10ddp (Smith, et al; 1995; Kerstetter, et al; 1997). Al parecer este gen está involucrado en mantener el estado indeterminado de los meristemas no sólo del MAT, sino de los meristemas florales (Smith, et al; 1992). AGL15 es una proteína perteneciente a una familia que posee un dominio muy conservado de 55-60 aminoácidos que interviene en el pegado específico de DNA. Sin embargo, AGL15 es la única proteína de la familia que se expresa de manera preferencial en el embrión, primero se observa en el citoplasma y después se mueve hacia los núcleos (Perry, et al; 1999).

2.3.2 Técnicas para el análisis de la expresión de genes

Existen varias técnicas para estudiar la expresión de genes, una de ellas es la técnica de RT-PCR, que consiste en utilizar a la enzima transcriptasa reversa. Ésta enzima permite transcribir a partir de RNA y de un cebador, una hebra de cDNA (Chelly y Kahn, 1994). Posteriormente mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se logra amplificar los segmentos de cDNA obtenidos, utilizando cebadores específicos al gen que se desea amplificar. La técnica de RT-PCR sólo permite conocer la presencia o ausencia de la expresión de un gen, mientras que existen otras técnicas que además nos indican su localización en el tejido, es decir *in situ*. La técnica de hibridación *in situ* (ISH), permite detectar los RNA mensajeros, para ello se utiliza una sonda específica que puede ser de RNA o DNA. La sonda hibrida con el RNAm expresado en el tejido a estudiar, las sondas de RNA son las más utilizadas porque reducen señales inespecíficas, debido a que un híbrido RNA:RNA es más estable, que un híbrido de DNA:RNA, además que con un posterior tratamiento de RNAsa, se elimina las señales no específicas, sin embargo, son más lábiles (Jackson, 1991). Las sondas de RNA se obtienen a través de la transcripción *in vitro* de un templado de DNA lineal por la RNA polimerasa. Una vez obtenida la ribosonda, ésta puede ser marcada radiactivamente o químicamente. Aunque las sondas radioactivas son mas sensibles (^{35}S , ^3H , ^{32}P), las sondas químicas son más seguras de usar (Jackson, 1991; Tijssen, 1993). Una variante de la ISH es la técnica de Whole mount *in situ* (WISH), éste tipo de hibridación *in situ*, presenta algunas ventajas con respecto a la ISH tradicional. En la ISH se requiere de

hacer una serie de pasos como embeber las muestras en parafina para hacer cortes, los cortes tienen que ser de buena calidad y lograrlo es una tarea ardua. Además en ocasiones es complicado hacer una reconstrucción a nivel tridimensional. La *Wish* permite ahorrar costos y tiempo, al realizar la hibridación directamente sobre tejidos tridimensionales (Almeida, *et al*; 1994). Para observar la localización de los productos de los genes, es decir las proteínas, se cuenta con la técnica de inmunolocalización. Esta técnica permite conocer el patrón de expresión de una proteína por medio de anticuerpos. La detección se realiza por medio de un anticuerpo primario que reconoce de manera específica la proteína de interés (antígeno). Posteriormente un segundo anticuerpo se une al complejo anticuerpo primario-antígeno; el segundo anticuerpo se encuentra acoplado a un fluoróforo, el cual al ser excitado por una cierta longitud de onda emite una luz y por ello se puede realizar la detección (Sauer *et al*; 2006).

2.4 Plantas híbridas apomícticas maíz-*Tripsacum* como modelo para investigar procesos de la embriogénesis en plantas

En el grupo de investigación en el cual se realizó el presente trabajo, se obtuvieron híbridos de maíz-*Tripsacum*, uno de los cuales es el híbrido nombrado como 38C, puesto que contiene 38 cromosomas en total y son diplospóricos (Leblanc *et al*; 1996). La megasporogénesis y megagametogénesis de los híbridos maíz-*Tripsacum* ha sido descrita apegándose a lo observado al tipo de diplosporia mitótica. Los híbridos forman un megagametofito tipo

Polygonum y producen un proembrión que se desarrolla por partenogénesis de la célula huevo, el proembrión se forma por continuas divisiones mitóticas hasta que alcanza una forma globular. El proembrión se integra de 32 células lo que implica 5 divisiones (Grimanelli *et al* 2003). No obstante, el proembrión necesita para continuar su desarrollo de la fertilización del endospermo, es decir, presenta pseudogamia. Sin embargo, sólo hasta que el endospermo termine el proceso de celularización el proembrión continuará diferenciándose de manera muy similar a la descrita en el maíz por Abbe y Ostein (1954). Lo anterior sugiere que las plantas apomícticas para la formación inicial del proembrión solo necesitan de la información materna, pero que posteriormente para que continúe su desarrollo es necesaria la presencia de factores aún desconocidos que actúan después de la celularización del endospermo, el cual sucede después de 5-7 días después de la fecundación de la célula central. Éstos factores, que pueden ser los responsables de la reiniciación del desarrollo de los proembriones apomícticos podrían ser los mismos que dirigen el programa de desarrollo de los embriones de origen sexual, y su activación sincronizar el desarrollo embrionario con el endospermo.

El estudio del desarrollo de embriones maternos en plantas apomícticas es un modelo interesante para investigar y comprender varios aspectos de la embriogénesis de plantas, en las etapas iniciales y las relaciones entre los dos productos (embrión y endospermo) de la fecundación.

El presente trabajo pretende contribuir a la descripción molecular del desarrollo del embrión maternal de un híbrido maíz-*Tripsacum* para conocer si existen diferencias entre el programa genético que opera en el desarrollo del embrión con origen sexual y el de origen apomictico. Para lograrlo se evaluó la expresión genética de genes marcadores del desarrollo embrionario y de endospermo de maíz, por medio de experimentos de RT-PCR, whole mount *in situ* e inmunolocalización.

3

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Caracterizar la embriogénesis en plantas apomícticas en base a la expresión de genes marcadores del desarrollo de embriones con origen sexual.

Objetivos particulares:

- Seleccionar aquéllos genes reportados que por su patrón de expresión en plantas sexuales, permitan realizar la caracterización molecular de la embriogénesis de plantas híbridas apomícticas.
- Estudiar la expresión de los genes seleccionados por medio de RT-PCR.
- Estandarizar la técnica de hibridación *in situ* e inmunolocalización para los híbridos apomícticos de maíz-*Tripsacum*.
- Analizar la expresión *in situ* de los genes marcadores los genes seleccionados como para determinar diferencias o semejanzas con el desarrollo de plantas sexuales *Zea mays*.

Materiales y Métodos

4.1 Origen del material utilizado

En el Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT), en el laboratorio de apomixis, se estableció una colección de varias generaciones de híbridos apomícticos provenientes de la cruce entre un maíz (M) ($2n=2x=20$) como planta receptora y su pariente apomíctico *Tripsacum dactyloides* (Tr) ($2n=4x=72$) como el donador de polen. La cruce mencionada dio por resultado varios híbridos F1s ($2n=46=10M+36Tr$). Toda la progenie resultó tener machos estériles, lo que hizo que posteriormente se hicieran retrocruzas utilizando el polen del maíz para polinizar a los híbridos F1s. Las retrocruzas hechas originaron híbridos apomícticos con $2n=38$ ($20M+18Tr$), los cuales son denominados como 38C (Leblanc, *et al*; 1996). Este último híbrido es interesante porque recupera los 20 cromosomas del maíz y tiene un menor número cromosómico de *Tripsacum* (18) y es el material de estudio del presente trabajo. Las características fenotípicas de las plantas híbridas con 38 cromosomas recuperan varias características del maíz, como un tallo sólido con uno o más vástagos, las hojas se alternan sobre cada lado del tallo y las espigas femeninas y masculinas se encuentran en diferentes inflorescencias. El híbrido 38C es macho estéril, así que para obtener granos, se cruza con un maíz diploide H3 ($H3=CML135XCML139$), debido a que presenta pseudogamia.

4.2 Procedimiento para los análisis de RT-PCR

Mazorcas de híbridos apomícticos 38C se polinizaron con polen de maíz H3, los jilotes fueron cosechados en diferentes días después de haberse polinizado. Los granos de los jilotes fueron separados con un bisturí. Granos de maíces, H3 fueron también disectados y utilizados como controles. Los granos fueron colocados en una caja Petri con H₂O estéril para evitar su deshidratación, la caja Petri con los ovarios fue colocada sobre hielo para evitar degradación del RNA, mientras éstos eran disectados. Con ayuda del microscopio estereoscópico óvulos fueron disectados de los ovarios, Los óvulos disectados fueron colocados en un tubo Eppendorf de 1.5 ml e inmediatamente después congelados en nitrógeno líquido y finalmente guardados a -70°C hasta la extracción de su RNA y posterior generación de cDNAs.

4.2.1 Extracción RNA

Los óvulos congelados a -70°C fueron molidos con un pistilo de plástico dentro de microtubos de 1.5ml con 800-1000µl del Trizol Reagent GibcoBRL. Se dejaron incubar las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente en el reactivo para la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadió 200µl de cloroformo y las muestras se agitaron con vortex vigorosamente durante 15 segundos, enseguida se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 8000rpm por 25 minutos a 4°C., terminado el proceso se observaron dos fases, la inferior de color rojo y la superior transparente, ésta última fase acuosa se tomó pues contenía el RNA y se

transfirió a un tubo Eppendorf nuevo. El RNA se precipitó agregando 500ul de isopropanol e incubándose en hielo por 15 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 8000rpm por 25 minutos a 4°C y se decantó cuidadosamente el isopropanol para no perder la pastilla de RNA que luce como una gota gelatinosa en el fondo del tubo. Finalmente la pastilla de RNA se lavó añadiendo 1 ml de etanol al 75% se agitó en vortex y centrifugó por 8000 rpm por 5 minutos y se repitió el proceso de lavado de la pastilla una vez más. La pastilla de RNA se resuspendió según su tamaño en H₂O libre de nucleasas tratada con DEPC. Finalmente el RNA se cuantificó en un espectrofotómetro y su integridad se evaluó a través geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio, utilizando buffer TBE 1%. A las muestras de RNA se les desnaturalizó incubándolas a 65°C durante 5 minutos y se le añadió buffer de carga, 2µg de RNA de cada muestra fueron cargados en el gel. Los RNAs se corrieron en cámaras de electroforesis horizontales a 70-80 Volts, una vez visualizado en el gel y comprobado que el RNA se encontraba íntegro, se continuó con la obtención de cDNA.

4.2.2 Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Para todos los ensayos se utilizó la enzima SuperScript II Rnasa H- (Invitrogen). Esta enzima es una transcriptasa reversa aislada de una cepa de *E.coli* recombinante. Para sintetizar el cDNA se realizó una primera mezcla por muestra que consistió en 2µg de RNA de la muestra, 1µl de oligo dT

(concentración 0.5ug/ul), 1µl de dNTP (10mM) y se añadió H₂O tratada con DEPC hasta tener un volumen final de 10µl. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de 0.2 ml, incubándose a 65°C durante 5 minutos y después en hielo 1 minuto. Enseguida, se preparó otra mezcla con los reactivos siguientes por cada muestra: 2µl de buffer 10X de RT (200mM Tris-HCl, pH 8.4, 500mM KCl y 20mM de Mg) 4µl de MgCl₂ (25mM), 2µl de DTT (0.1M), y 1µl de inhibidor de RNasa (RNase OUT™), ésta segunda mezcla se adicionó a la primera, se mezcló suavemente y se centrifugó en una picofuga, incubándose a 42°C por 2 minutos, terminado éste tiempo, se adicionó 1µl de la enzima SuperScript™ (50U) a cada tubo de reacción y se incubó a 42°C durante 50 minutos. Finalmente se terminó la reacción a 70°C por 15 minutos y se llevó a cabo la reacción de PCR.

Los cDNAs obtenidos por la reacción de reversa transcripción se usaron como plantillas para amplificar por PCR los genes que se indican en la tabla 1, así también se muestra la secuencia de los primers utilizados.

Las reacciones de PCR fueron realizadas con 6µl de REDTaq® ReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma), 2µl de primer en sentido, 2µl de primer en antisentido y 2µl de plantilla. Para la amplificación de todos los genes se realizaron ensayos previos que permitieran conocer la adecuada temperatura de amplificación.

Tabla 1. Secuencia de los primers o cebadores utilizados para amplificar genes marcadores del desarrollo embrionario por PCR.

Gen	Cebador 1	Tamaño de DNA amplificado (pares de bases)	Referencias
Actina 1	5'CCTGAAGATCACCTGTGCT3' 5'GCAGTCTCCAGCTCCTGTTC3'	500 cDNA y ~600 en gDNA	Secuencia NCBI (J01238) (Shah, <i>et al</i> ; 1983)
ESR	5'TGTTCTACACCACTACACCACACC3' 5'TAAGAGRAARTTATTGCTTCATGTTTACC3'	501 cDNA y gDNA	(Bonello, <i>et al</i> ; 2000) (Opsahl-Ferstad, <i>et al</i> ; 1997)
KN1	5'CTTCCATTTACACCCCACG3' 5'GCAGCAACCACCTAAAGCATAGTTC3'	206 cDNA y gDNA	Secuencia NCBI (X61308) (Vollbrecht, <i>et al</i> ; 1991)
HOX1b	5'GGGACGATGAAGTTTGTAG3' 5' GAATGAATAGCCCCACAG3'	239 CDNA ~900 gDNA	(Bellmann y Werr, 1992).
OCL5	5' TGGCAGGGAGCTACAATGGTGCATTACA3' 5' CCAAACGCGAGGCCTGAATTGACCAA3'	420 cDNA 520 gDNA	(Ingram, <i>et al</i> 2000)
T7-F-LTP R-LTP	5'GCG-AAA-TTA-ATA-CGA-CTC-ACT-ATA-GGG-GGT-ACC-TGG-CTC-GCA-CGC-AAT-CTG-CC3' 5'GCTACAGCAGGACGCGGAGG3	208pb	Technical bulletin #154 Ambion.
T3-R-LTP F-LTP	5'GCCAAAATTAACCCTCACTAAAGGGAGAGC TACAGCAGGACGCGGAGG3' 5'TGGCTCGCACGCAATCTGCC3'	203pb	Technical bulletin #154
F-LTP R-LTP	5'TGGCTCGCACGCAATCTGCC3' 5'GCTACAGCAGGACGCGGAGG3	175pb	Secuencia NCBI J04176

Para el gen de *Actina 1*, el cual es un gen que se utilizó como control positivo pues se expresa constitutivamente, se utilizó el siguiente programa de PCR: 94°C como primera desnaturalización por 1 minuto y sólo 1 ciclo, (94°C durante 30 segundos, 56°C como temperatura de alineamiento y 72°C por 2 minutos para la extensión, por 30 ciclos).

Para los genes *Hox*, *ZMOCL1*, *OCL5*, *OCL1* y *KN1* el programa de amplificación fue el siguiente: 94°C por 1 minuto, 1 ciclo, (94°C por 30 segundos, 60°C durante 30 segundos para el alineamiento, 72°C por 2 minutos para la extensión, todo por 30 ciclos) y finalmente un paso de extensión final de 72°C por 10 minutos sólo 1 ciclo. La amplificación de *ESR* fue realizado bajo los mismos parámetros excepto que la temperatura de alineamiento para *ESR* fue de 62°C. Finalmente, los fragmentos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa.

4.3 Procedimiento para los estudios de whole-mount *in situ*

Granos de 10 ddp de maíz fueron cortados en un vibratomo, en los apomícticos por la forma del grano fue complicado hacer los cortes directamente, así que se optó por disectar los ovarios, como éstos son muy pequeños, se embebieron en agarosa al 6%, cuidando de que antes de la solidificación de la agarosa los ovarios tuvieran la orientación correcta del embrión. Una vez solidificado, con una navaja se cortó cuadros de agarosa que contenían cada uno un ovario y se pegaron a la plataforma de corte del vibratomo para ser cortados. Las secciones cortadas fueron de 290µm, en nivel 10 de velocidad y 7 de vibración.

4.3.1 Obtención de sondas

En este estudio se usaron sondas marcadas químicamente con digoxigenina el cual es un esteroide aislado exclusivamente de *Digitalis*. La digoxigenina se une a los nucleótidos de uridina en el C5 o C3 del anillo de pirimidina (Chevalier, *et al*; 1997). El proceso de obtención de sondas fue realizado utilizando diferentes estrategias, la primera de ellas a partir de plásmidos que contenían fragmentos de cDNA entre 800-1000pb de los genes de interés, pero al realizar la transcripción *in vitro*, se obtenían ribosondas muy grandes no recomendadas en la literatura para los experimentos de hibridación *in situ* por lo que se realizó un proceso de hidrólisis alcalina de las ribosondas, sin embargo aparentemente la hidrólisis de las sondas era completa. Así que se cambió de estrategia comenzando con la clonación de un fragmento pequeño, de 206 pb del gen *KN1* en el vector TOPO, se analizaron las clonas positivas, y se verificó la orientación del fragmento en los plásmidos, para finalmente transcribir el fragmento y obtener la sonda de RNA. Los procedimientos mencionados anteriormente se describen a detalle a continuación:

4.3.1.1 Clonación de *KN1* y verificación de la orientación del inserto

Se diseñaron oligos específicos para el gen *KN1*, obteniendo un fragmento de 206 pb con los primers de la tabla 2, dicho fragmento fue clonado en el vector pCR II TOPO utilizando el kilt TOPO TA Cloning de invitrogen. Una vez seleccionado las clonas positivas y extraído el DNA plasmídico de éstas. Posteriormente se verificó el inserto en el plásmido por PCR utilizando los oligos

específicos para KN1 (ver tabla 1) y por restricción enzimática utilizando la enzima Eco R1, la cual libera el fragmento clonado (Figura 4C)

Debido a que el fragmento clonado puede insertarse en el vector en dos posibles orientaciones: en $5' \rightarrow 3'$ ó $3' \leftarrow 5'$, es necesario conocer la orientación del fragmento en el plásmido para posteriormente realizar la transcripción *in vitro* y producir las ribosondas. Al conocer en que orientación se insertó el fragmento y analizando el mapa de restricción del vector se puede saber con que enzimas se obtiene una sonda en antisentido o una sonda en sentido (Figura 4 A ,B y C). Para conocer la orientación del fragmento se utilizaron los primers M13 Forward y M13 Reverse que amplifican secuencias del vector y los primers específicos para *KN1* de la tabla 1.

Debido a que cada clona que contenga el plásmido puede tener en distinta orientación el fragmento se analizaron 3 plásmidos provenientes de distintas clonas, realizando el PCR de la siguiente forma: En un tubo de 0.2 se añadió 2ul de Buffer 10X, 2ul de DNTPS 2mM, 0.8 de Mg 50mM, 1ul de cada uno de los primers, 0.2 de TAQ polimerasa de 5U (reactivos Invitrogen) 12 μ l de agua y 0.25 μ l del plásmido.

Debido a que el análisis de la orientación del fragmento por PCR presentó algunos artefactos por la aparición de varias bandas productos de inespecificidades, se hizo uso además, de enzimas de restricción que por su patrón de corte dieran a conocer la orientación del fragmento clonado. Así pues se utilizó SCAI que corta sólo 1 vez en el fragmento clonado en la posición 60 y

una vez en el vector pCRII TOPO en la posición 2480. La reacción de digestión se llevó a cabo utilizando 8ul de DNA plasmídico, 1ul de Enzima SCAI, 2ul de su buffer (10X), y 9ul de H₂O, para un volumen final de 20ul. Una vez visualizado por gel la digestión realizada, se procedió a dializarla, sobre una caja petri se colocó 500ul de agua desionizada y sobre la gota formada un filtro milipore de 0.0.25µM y sobre el filtro la digestión realizada con SCAI, con la finalidad de limpiarla de sales que pudieran interferir en la siguiente reacción enzimática. Una vez dializada se procedió a cortar con APA I, esta enzima corta sólo una vez en el vector topo en la posición 399 y no corta el fragmento utilizando 10ul de DNA plasmídico (cortado previamente con SCAI), 1.5ul de Enzima APA1, 2ul de su buffer (10X), y 6.5ul de H₂O obteniendo un volumen final de 20ul. Con los cortes realizados se esperaba al final dos opciones una banda de 209pb o una banda de 123 pb según orientación del fragmento.

Una vez que se conoció la orientación del fragmento en el plásmido necesita ser linearizado para poder transcribir el fragmento clonado, por esta razón, una vez conocido la orientación del fragmento se procedió a linearizar el plásmido con la Enzima BAMH1 para obtener una sonda en sentido y con NOT1 para una sonda en antisentido (Ver Figuras 4 A, B, C). La enzima BamH y NOT1 no dejan 3' libres, lo cual se sugiere en los protocolos de transcripción *in vitro* debido a que se ha observado que los extremos con 3' pueden originar transcriptos extras.

4.3.1.2 Transcripción *in vitro*

Para realizar la transcripción *in vitro* se utilizó 500ng-600ng de DNA linearizado, 4.2 ul de H₂O DEPC, 1ul de inhibidor de RNAsa, 0.8 ul de UTP marcado con digoxigenina, 2ul DNTP 10X (sin UTP), 2ul de buffer de transcripción 10X (400mM Tris-Hcl pH 8.0, 60mM de MgCl₂, 100mM de Dithiotreitol, 20mM de spermidina), 2ul de RNA polimerasa de 20U/ul (SP6 en una reacción y T7 en otra reacción) y 4.2ul de H₂O con DEPC para un volumen final de 20ul, todos los reactivos utilizados fueron de la marca ROCHE. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas para que se realizara la reacción de transcripción. Terminada la incubación se añadió 2ul de DNasa I y se incubó 15 minutos a 37°C, parándose la reacción con 2ul de 0.2M de EDTA (pH8.0). Los transcritos obtenidos tanto en sentido como en antisentido fueron analizados en un gel de agarosa.

4.3.1.3 Obtención de la sonda de *LTP2*

La estrategia utilizada para la obtención de la sonda de *LTP2* se resume en la figura 5. A partir de gDNA en un sitio libre de intrones, se obtuvieron dos templados, el primero contenía una secuencia del promotor T7 aledaña a una secuencia específica de *LTP2* en sentido 5' → 3', el segundo contenía la secuencia del promotor T3 unida a una secuencia específica para *LTP2* pero en 3' ← 5'. Los oligos utilizados para la generación de los templados se describen en la tabla 1. Posteriormente de los templados obtenidos, se realizó la transcripción *in vitro* con el procedimiento descrito, utilizando la polimerasa T7 para obtener sondas en sentido y T3 para obtener sondas en antisentido a partir de 100-200ng de templado.

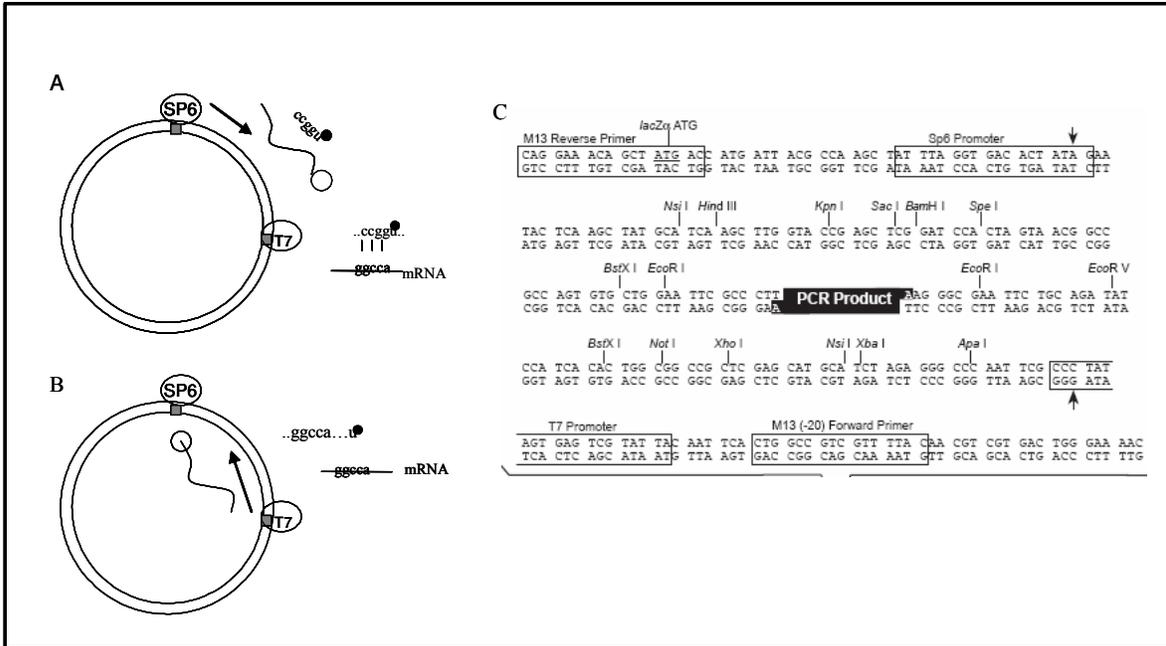


Figura 4 Generación de sonda *KN1*. A y B muestran la formación de una ribosonda desde un fragmento clonado en un vector. A) Muestra la formación de una sonda en antisentido que es complementaria al RNA del tejido a hibridar. B) Muestra la formación de una sonda en sentido que no complementa con RNA de tejido blanco y por tanto no hibrida. C) Mapa de restricción del vector pCR II TOPO de Invitrogen donde se clonó el fragmento *KN1*.

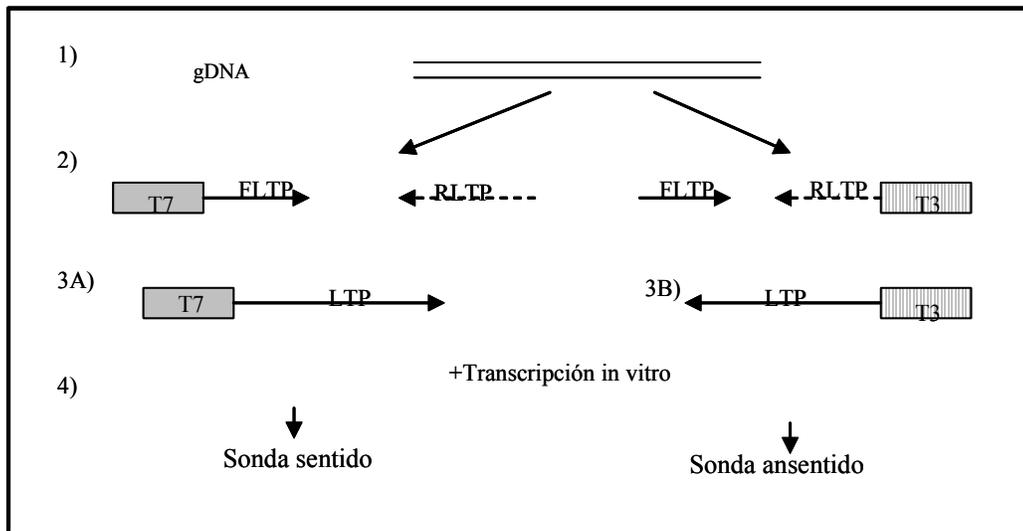


Figura 5 Generación de sonda LTP2 mediante PCR. 1) y 2) A partir de gDNA se amplificó un segmento específico con la ayuda de oligos diseñados con secuencia del promotor T7 unida a la secuencia en Forward de LTP (FLTP) ó de oligos con la secuencia del promotor T3 unida a la secuencia en reward de LTP (RLTP). 3A) Generación de templado con secuencia de LTP unido a T7 ó 3B) Templado de LTP+T3. 4) Por transcripción *in vitro* se crea una sonda en sentido y una en antisentido.

4.3.2 Fijación de muestras

Las muestras cortadas se colocaron en tubos de 1.5ml se fijaron con FAA+1%Tritón+1%DMSO y se quedaron fijando las muestras toda la noche a 4°C. Al día siguiente se eliminó el fijador y las muestras se lavaron con 50% de etanol durante 5 minutos, posteriormente, se eliminó el etanol al 50% y se continuó deshidratando con 60% y 70% de etanol, dejando mínimo 30 minutos en cada porcentaje de etanol. Algunas muestras se quedaron en 70% de ETOH en 4°C hasta por 8 días antes de la hibridación.

4.3.3 Rehidratación y acidificación de muestras

Las muestras fijadas y deshidratadas con etanol hasta 70% fueron rehidratadas gradualmente con etanol al 60%, 50%, 40%, 25% durante 20-30 min. en cada paso de rehidratación para finalizar con H₂O. Finalmente fueron lavadas dos veces más en H₂O para quitar residuos de etanol. Enseguida las muestras se acidificaron con 0.2 M HCl por 20 minutos.

4.3.4 Montaje de las muestras

Las muestras con los embriones de 10ddp tienen el pericarpio muy grueso por eso se eliminó la mayor parte con una navaja para poder colocarlas en un portaobjetos. Cuando estuvieron ordenadas, se añadió gel de acrilamida-bisacrilamida al 15% y rápidamente se colocó un cubre objeto, cuidadosamente para evitar la formación de burbujas. Una vez solidificado las muestras

quedaron embebidas totalmente en el gel y se retiró el cubre objeto con ayuda de unas pinzas.

4.3.5 Tratamiento con proteasa y refijación

Las muestras en el portaobjetos se colocaron en una caja Koplín con buffer de proteasa previamente calentado a 37°C y se adicionó 50 µl de proteasa k de un stock de 50 mg/ml, dejándose incubar 30 minutos a 37°C. Posteriormente se eliminó la solución con proteasa y se agregó 1X de PBS durante 2 min, para lavar los residuos de proteasa, enseguida se desechó el PBS 1X y se añadió glicina (2mg/ml) en PBS 1X por 2 minutos para detener la reacción de digestión de la proteasa. Finalmente se dio un lavado en PBS 1X para eliminar residuos de glicina. A continuación las muestras se volvieron a fijar con 4% de formaldehído en PBS por 20 minutos, terminado el proceso se desechó el fijador y se añadió PBS 1X para lavar el tejido durante 5 minutos, se eliminó el PBS 1X y se lavó el tejido con agua estéril durante 5 minutos.

4.3.6 Prehibridación de tejido

A cada portaobjetos se le añadió suficiente buffer de prehibridación, 150-200µl para cubrir las muestras, además sobre éstas se colocaron cubreobjetos. Posteriormente los portaobjetos se ponen en un recipiente con tapa el cual en el interior se cubrió con toallas húmedas. Las muestras en ésta cámara húmeda se dejaron incubar 90 minutos.

4.3.7 Preparación de sonda

La sonda se mantuvo a -80°C y durante su utilización en un cooler (-20°C). La elección de la concentración adecuada de la sonda se hizo mediante sugerencias de los integrantes del laboratorio, probando distintas concentraciones, siendo 400ng de sonda la concentración la cual dio mejores resultados. La sonda fue diluída en formamida al 50% a un volumen final de 50ul, se desnaturalizó a 75°C e inmediatamente se colocó en hielo, la sonda desnaturalizada se mezcló con 200ul de buffer de hibridación.

4.3.8 Hibridación

Se quitaron cuidadosamente los cubreobjetos de cada uno de los portaobjetos con las muestras y a cada uno se añadió 250ul de la sonda y se colocaron de nuevo cubre objetos sobre las muestras. Posteriormente los portaobjetos se volvieron a guardar en la cámara húmeda mencionada y se hibridó en un horno a 55°C toda la noche.

4.3.9 Lavados

Los portaobjetos, sin quitarles los cubreobjetos fueron colocados en una caja Koplín y se les añadió una solución de 0.2XSSC/0.1%SDS y se decantó inmediatamente, este proceso se repitió dos veces más. Se hicieron dos lavados más con 0.2XSSC/0.1%SDS pero se dejó entre cada lavado 10 minutos y se llevaron a cabo a 55°C . Después se realizó un lavado con 2XSSC durante 2 minutos a temperatura ambiente, eliminada ésta última solución, se añadió

10µg/ml de RNAsa en 2XSSC por 30 minutos incubándose a 37°C. Una vez terminado el tiempo de incubación con la RNAsa y eliminada ésta solución se lavó con 2X SSC por 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó dos veces con 0.2XSSC/0.1%SDS por 10 minutos cada uno a 55°C, desechada ésta última solución se hizo un lavado con 2X SSC por 2 minutos a temperatura ambiente.

4.3.10 Detección de señal, mediante el anticuerpo DIG-AP

Las muestras fueron lavadas con 1X TBS durante 2 minutos a temperatura ambiente, una vez decantada la solución anterior se agregó agente bloqueador Boeringer en TBS 1 X e incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de bloqueo se agregó 1X TBS durante 2 minutos a temperatura ambiente. A cada portaobjeto con muestra se le añadió anticuerpo diluído en 1X TBS y 0.5% de BSA en una dilución 1:500. Se colocaron cubreobjetos a cada una de las muestras y se incubó de 1 a 2 horas en una cámara húmeda. Una vez terminado el proceso de incubación con el anticuerpo se procedió a colocar los portaobjetos nuevamente en una caja Koplín y se añadió 1X TBS, 0.5% BSA 0.1% Tritón-X-100 y se decantó inmediatamente. Se realizaron 4 lavados más con 1X TBS, 0.5% BSA 0.1% Tritón-X-100 pero se dio un tiempo de 10 minutos en cada lavado.

A cada portaobjeto con las muestras se le añadió 150ul de buffer de detección con sustrato (NBT/BCIP) y se colocó un cubreobjetos. Las muestras fueron incubadas en una cámara húmeda en total oscuridad y se monitoreó la señal

siendo necesario esperar aproximadamente 10 horas para la visualización de la señal.

4.4 Inmunolocalización de AGL15

Para la detección de la proteína AGL15 se utilizaron anticuerpos policlonales producidos en conejo, el segundo anticuerpo (anticonejo) se encontraba acoplado al compuesto fluorescente FITC. La inmunolocalización se realizó de la forma que se describe a continuación.

Granos de maíz y ovarios de 38C fueron cortados de la forma explicada para la WISH y fueron colocados en un tubo de 1.5ml, y fijados toda la noche con 4% de paraformaldehído con glutaraldehído (ver anexo soluciones) y al siguiente día se lavó con buffer PHEMS durante 10 minutos dos veces, se enjuagó con PBS 1X, y posteriormente se lavó con PBS 1X con 0.1% de Tritón durante 1 hora. Enseguida se trató con 30 minutos de glucanasa para permeabilizar el tejido y se enjuagó con PBS 1X. Se incubó con el anticuerpo primario (dilución 1:500) durante toda la noche. Al día siguiente se dio un lavado con PBS 1X más 0.1% de Tritón, durante aproximadamente 6 horas y se añadió el anticuerpo secundario (dilución 1:200), incubándose durante toda una noche en oscuridad, para esto el tubo de 1.5ml se forró con aluminio, cubriendo el tejido. Al día siguiente las muestras se lavaron, PBS 1X con 0.1% de tritón durante 1 hora, se añadió DAPI durante 10-15 minutos y se enjuagó con PBS 1X. Finalmente se procedió a montar las muestras en portaobjetos.

Para montar las muestras se requirió de quitar todo el pericarpio para evitar su autofluorescencia, las muestras se colocaron sobre un portaobjeto y se añadió una gota de medio de montaje de fluorescencia (VectorShield) y se colocó encima un cubre objeto y se selló con barniz de uñas. Finalmente las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia.

RESULTADOS

5.1 Análisis de expresión usando RT-PCR

La expresión de genes específicos de endospermo (*ESR*) y de embrión *OCL5*, *HOX* y *KN1* fue analizada por RT-PCR utilizando los oligos de la Tabla 1 y las condiciones de PCR descritas en materiales y métodos.

5.1.1 Consideraciones generales

Debido a que *Zea mays* es un pariente cercano del género *Tripsacum* y de la sintenia que existe entre los genomas de las gramíneas, se asume que sus secuencias son muy parecidas (Benetzen y 1997). Por esta razón se amplificaron genes específicos de endospermo y embrión a partir de oligos diseñados del cDNA de maíz. Los resultados muestran que al amplificar DNA genómico del híbrido 38C, con éstos oligos siempre se obtuvo una sola banda y del tamaño esperado para cada gen lo que sugiere que se trata de la misma secuencia.

5.1.2 Genes del endospermo: los *ESRs*

La expresión de los genes *ESR*, la cual se limita a la zona del endospermo que rodea al embrión en el maíz, fue analizada en el híbrido 38C por RT-PCR, observándose expresión sólo en óvulos de 10 ddp y de 14 ddp, lo cual no coincide con lo reportado en maíz por Opsahl-Ferstad *et al*: 1997 que observa

una expresión desde los 5ddp y es máxima a los 7ddp, decreciendo considerablemente a los 9ddp, utilizando también RT-PCR. Por lo anterior, los resultados obtenidos mostraron una expresión más tardía de *ESR* en el híbrido apomíctico 38C de la que se ha observado en el maíz (Figura 6A). Asimismo no se observó expresión en óvulos sin polinizar tanto de maíz como de 38C, es decir, donde no hay ni embrión, ni endospermo, tampoco hubo expresión en hoja joven de 38C, en estos tejidos se ha reportado ausencia de la expresión de estos genes en el maíz. En maíz a los 20ddp se ha observado expresión *in situ*, aunque, los resultados aquí muestran ausencia de *ESR* en endospermos de 20ddp tanto de maíz como de 38C. La Figura 6B muestra la amplificación del gen de actina, el cual es un gen constitutivo y fue usado como control positivo de amplificación de los cDNAs utilizados, mientras que en 6C se muestra la integridad de los RNA's.

5.1.3 Genes marcadores del desarrollo de embrión

En lo que respecta al gen *OCL5* (Figura 6D), se observó su expresión en todos óvulos sin polinizar, y óvulos con diferentes días de polinización, en embriones aislados de 20ddp y en hojas. Como se esperaba una banda amplificó al utilizar DNA genómico usado como control positivo, mientras que ninguna amplificación se observó en H₂O. Se observó una débil amplificación en endospermo en maíz pero no en 38C.

La expresión del gen *Hox 1b* fue observada en todos los óvulos con diferentes estadios de desarrollo de embrión y de endospermo e incluso en óvulos sin

polinizar (Figura 6E). Sin embargo, ninguna banda se observó en tejido de hoja aunque ésta sí se ha reportado en el mismo tejido en maíz (Bellmann y Werr, 1992). Se observó amplificación del DNA genómico y ninguna banda usando H₂O.

En maíz por experimentos de hibridación *in situ*, se ha observado que *KN1* sólo se expresa en el MAT. En este estudio primero se observó la expresión de este gen por RT-PCR en el híbrido 38C en todos los estadios de los óvulos polinizados analizados es decir desde los 2ddp hasta los 14ddp. Tomando en cuenta que en un embrión el MAT se forma hasta los 9-10ddp, la expresión en óvulos con embriones en fase anterior e incluso sin polinizar será discutido más adelante (ver Figura 6F). También hubo expresión en embriones aislados del óvulo después de 20ddp, donde se tiene un meristemo del tallo más prominente. Se observó amplificación en DNA genómico de 38C el cual fue usado como control positivo, dicha banda es del mismo tamaño que la amplificación del cDNA porque en la región amplificada no se encuentra ningún intron. Ninguna banda de amplificación fue vista en tejido de endospermo aislado, ni hojas, lo cual coincide con lo que ocurre en el maíz. Tampoco hubo amplificación en H₂O usada como control negativo.

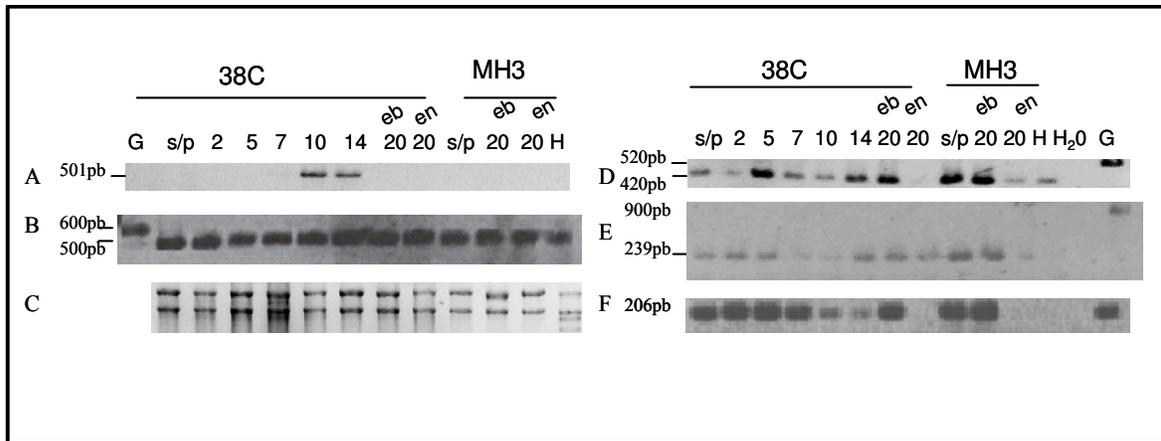


Figura 6 Expresión de genes específicos de endospermo (*ESR*) y de embrión (*KN1*, *OCL5* y *HOX*), en diferentes estadios de desarrollo de endospermo y embrión en el híbrido 38C. Las amplificaciones fueron realizadas con oligos específicos para cada gen, utilizando cDNA de óvulos sin polinizar (s/p), con 2,5,7,10 y 14 ddp, en embriones (eb) y endospermos (en) aislados de 20ddp en 38C. Asimismo tejidos de maíz como óvulos s/p, embriones y endospermos aislados de 20ddp, fueron también amplificados. DNA genómico de 38C fue utilizado como control positivo y H₂O como control negativo. Tejido de hoja joven de 38C (H) fue usada como control para algunos genes. A) Expresión de *ESR* en cDNAs sin diluir, B) Amplificación del gen de actina, gen constitutivo utilizado para verificar que los cDNAs eran amplificables C) Muestra la integridad de los RNAs extraídos. 2ug de cada uno fue usado para obtener los cDNAs. D) Amplificación del gen *OCL5* usando una dilución 1:1 de los cDNAs E) Expresión de gen *HOX* en cDNA diluidos 1:1. D) Amplificación del gen *KN1* utilizando una dilución 1:4 de los cDNAs

5.2 Análisis de expresión mediante Whole mount *in situ*

La técnica de Whole mount *in situ* fue utilizada para evaluar la expresión del gen *LTP2* en proembriones y *KN1* en embriones de 10ddp. Esta técnica fue elegida sobre la *ISH* debido a que se evita embeber el tejido en parafina y realizar cortes, permitiendo ahorrar tiempo.

5.2.1 Obtención de sondas para la Hibridación *in Situ*

En un principio, para realizar la WISH se intentó obtener sondas de *KN1* y *LTP2*, a partir de vectores con los que contaba el laboratorio. Sin embargo los vectores contenían fragmentos del gen de más de 1kb, por lo que como primera estrategia se optó por transcribir las sondas de estos plásmidos. Las sondas fueron hidrolizadas utilizando carbonatos de sodio, pero a pesar de varios

intentos la hidrólisis del RNA era casi completa (Figura 7A), no lográndose obtener una longitud adecuada. Ante estos problemas se decidió cambiar de estrategia iniciando la clonación de un fragmento pequeño, del gen *KN1*, posteriormente el plásmido se linearizó con la enzima BAM H1 para obtener la sonda en sentido y NOT1 para obtener la sonda en antisentido, éstos DNA linearizados fueron transcritos y así se obtuvieron ribosondas de 200 pb, (Figura 7B1 y B2). Sin embargo, otra estrategia fue utilizada para obtener la sonda de *LTP2*, ésta consistió en obtener por PCR un fragmento específico de *LTP2* con la secuencia unida a al promotor T7 ó T3, una vez realizada la reacción de PCR se corroboró la adición de los promotores al templado obtenido utilizando oligos que amplifican a los promotores T7 ó T3 y oligos específicos para *LTP2*, la Figura 7C1 muestra que hubo amplificación de fragmentos de aproximadamente 200 pb como se esperaba, en comparación de un fragmento de menor tamaño (175pb) cuando sólo se utilizan los oligos específicos para *LTP2*. Finalmente los templados por transcripción *in vitro* dieron un transcrito de 200pb. (Figura 7C2).

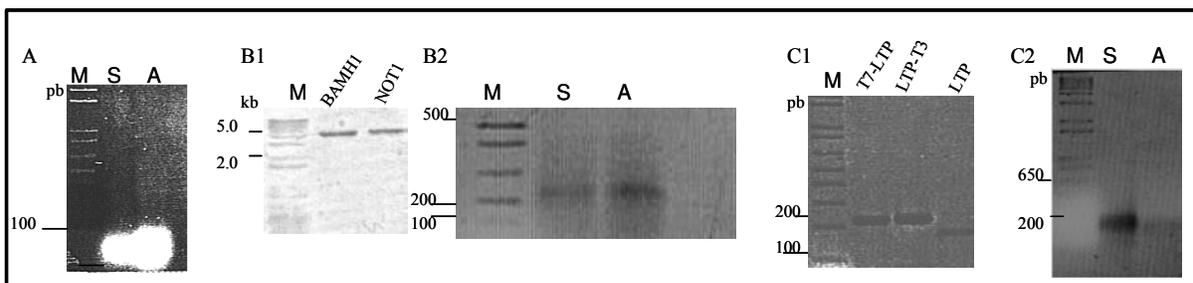


Figura 7 Obtención de sondas. A) Se muestra las ribosondas que fueron hidrolizadas, se observa que dicho proceso fue casi completo. B) Obtención de sondas mediante la directa transcripción de un fragmento clonado de *KN1* de 200 pb, B1 muestra la linearización del plásmido por las enzimas BAM H1 y NOT1, en B2 se visualizan las transcripciones a partir del DNA del plásmido linearizado. C) Muestra la obtención de la sonda de *LTP2* mediante la transcripción de un fragmento de *LTP* al que se le adicionó los promotores por PCR en C1 se visualiza la amplificación de un fragmento de *LTP* al que se le adicionó un promotor (T7-LTP ó LTP-T3) en comparación con la amplificación del fragmento sin promotores. Marcador de peso molecular, S=sonda en sentido A=Sonda en Antisentido.

5.2.2 Expresión de *KN1* *in situ* en embriones de 10ddp

La expresión del gen *KN1* fue analizada por WISH, como se observa en la Figura 8. Embriones de 10ddp tanto de maíz como del híbrido apomíctico, se apegan a la morfología esperada en la etapa de transición, en la cual se observa el comienzo de la diferenciación del meristemo del tallo. No obstante, en los híbridos 38 C se encontraron granos que a los 10ddp presentaban una morfología de una etapa de desarrollo anterior en la cual aún no se apreciaba el inicio de la protuberancia del meristemo del tallo (datos no mostrados). Los resultados de la Figura 8A muestran que el RNA mensajero de *KN1* se encuentra presente en la zona donde se diferencia el meristemo del tallo, esto coincide con lo que se ha reportado en maíz (Smith, 1995), y también observado en la Figura 8C, donde embriones de maíz fueron utilizados como controles positivos. La figura 8B muestra un embrión que fue hibridado con sonda en sentido, y se observa que no hay señal en el MAT del embrión, la señal que se observa en el escutellum debe ser producto de inespecificidades.

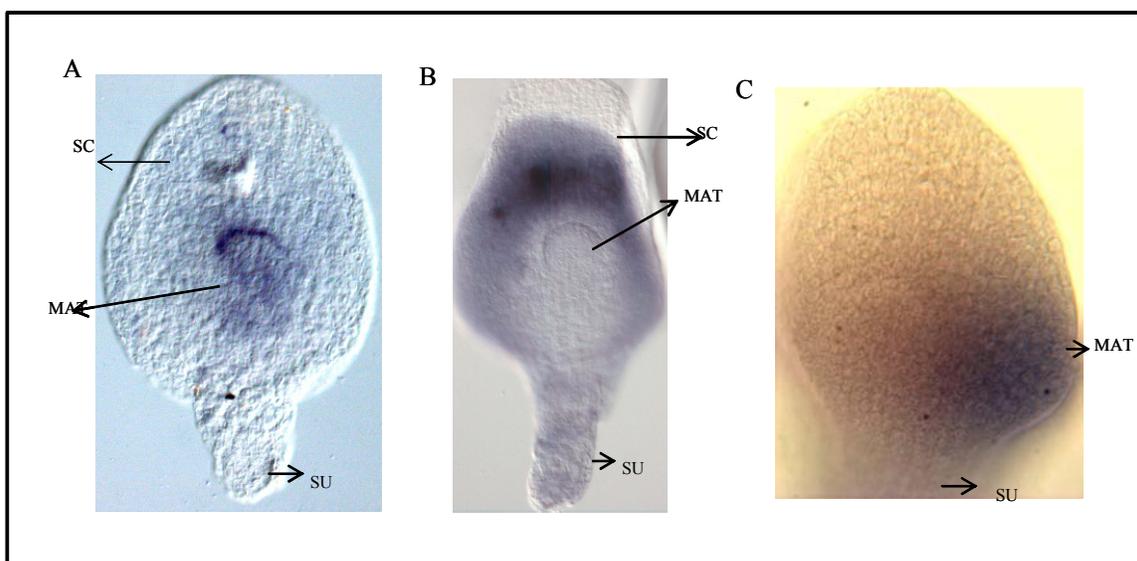


Figura 8. Localización del mRNA de *KN1* en embriones de 10ddp de 38C. A) Embrión de 38C hibridado con sonda antisentido de *KN1* B) Embrión de 38C hibridado con sonda en sentido de *kn1*, utilizado como control negativo. C) Hibridación con sonda en antisentido de *KN1* en maíz fue realizada como control positivo. MAT Meristemo del Tallo. SC escutellum. SU suspensor. 50

5.2.3 Expresión de *LTP2* en proembriones

Proembriones de plantas híbridas apomíticas fueron hibridadas con *LTP2*, como se observa en la Figura 9A, se detectan transcritos en algunas de las células periféricas del proembrión, en cambio en la región basal del proembrión ninguna señal se puede visualizar. Éstos resultados coinciden con lo que se ha observado en maíz, en donde no se detecta señal en la parte basal del embrión (Bommert y Werr, 2001). En la Figura 9B se observa el acercamiento de un proembrión el cual ha sido hibridado con una sonda en sense de *LTP2* utilizado como control negativo y en donde no se observa ninguna señal y en la Figura 9C se observa tejido de endospermo que fue tratado junto con las muestras de proembriones con la finalidad de que sirviera como control de calidad de tejido durante los procesos de hibridación, los endospermos se tiñeron con naranja de acridina el cual es un colorante que se pega indistintamente a los ácidos nucleicos. Sin embargo, con la ayuda de filtros se logra visualizar específicamente el RNA, así pues, se observa que el tejido de endospermo está íntegro y con presencia de tinción naranja en el citoplasma que indicaría presencia de RNA.

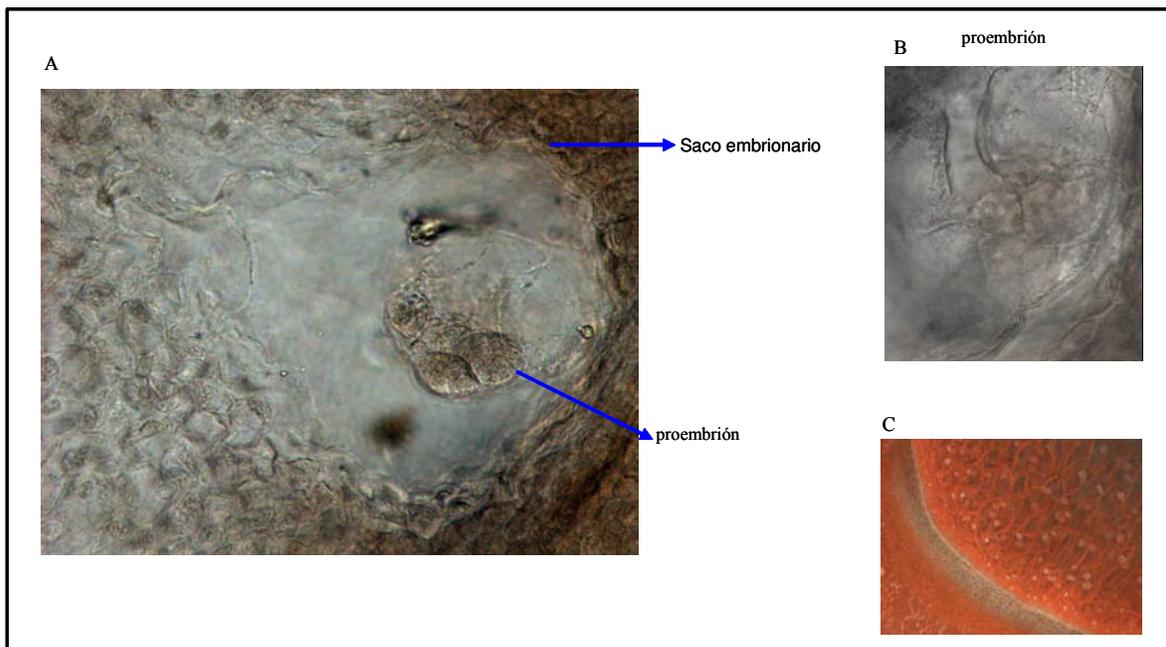


Figura 9 Localización del mRNA de *LTP2* en proembriones apomíticos. A) Saco embrionario con proembrión hibridado con sonda *LTP2* en antisentido, B) Proembrión hibridado con sonda *LTP2* en sentido C) Sección de Endospermo teñido con naranja de acridina

5.3 Localización de la proteína AGL15

La distribución de la proteína AGL15 fue analizada en proembriones de plantas apomícticas 38C utilizando anticuerpos específicos. Las Figuras 10A y 10 B muestran a un saco embrionario que contiene un proembrión, acercamiento Figura 10C y 10D. En los proembriones, la señal de AGL15 colocaliza con algunos núcleos teñidos con DAPI (Figura 10E), pero en general se observa difusa también en el citoplasma (Figura 10F). En embriones de maíz y dicotiledóneas como *Arabidopsis* y *Brasica napus* se ha observado que en los embriones en etapa globular AGL15 se encuentra sólo en los núcleos, pero no en el citoplasma (Perry, *et al* 1999).

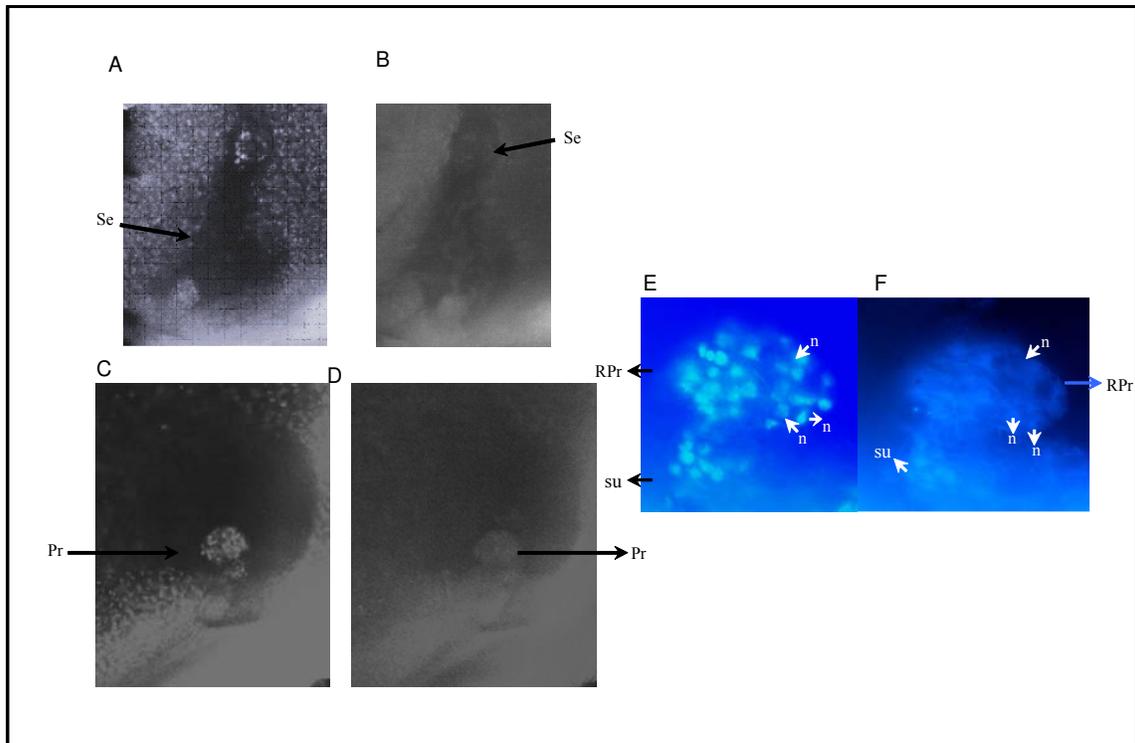


Figura 10. Localización de la proteína AGL15 en proembriones de 38C de 0 ddp. A) Saco embrionario de 38C con embrión teñido con DAPI. B) Saco embrionario de 38C con anti-AGL15. C) Embrión teñido con DAPI. D) Embrión tratado con anticuerpo específico para AGL15. E) Acercamiento de proembrión de C. F) Acercamiento de proembrión de D. Se=saco embrionario, Pr=Proembrión, su= suspensor n=núcleos

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluaron genes que por su patrón de expresión en el embrión de maíz o endospermo son excelentes marcadores moleculares que han proporcionado información sobre el programa de desarrollo embrionario en el maíz. Por esta razón, la expresión del genes como *ESR* característico del endospermo, o genes que se expresan en el embrión (*KN1*, *Hox*, *OCL5*), así como la proteína AGL15 fueron estudiados en el híbrido apomítico 38C.

La elección de analizar los genes *ESR* se debe a que éstos se expresan en el endospermo en una región muy próxima al embrión. Más aún, su estudio es interesante si se considera a que se ha demostrado que sus productos son secretados (Bonello, 2000), lo que sugiere que pueden actuar como moléculas señal de eventos importantes en el desarrollo del embrión. La expresión de los genes *ESR* se ha estudiado en maíz en experimentos de RT-PCR utilizando RNA de óvulos con diferentes ddp, observándose expresión desde los 5ddp y alcanzando su nivel máximo a los 7ddp, posteriormente la expresión disminuye, éstos mismos resultados se observan en experimentos de hibridación *in situ* (Opsahl-Ferstad, 1997). Sin embargo los experimentos de RT-PCR realizados en óvulos de híbridos apomíticos mostraron que la expresión de éstos genes se observa después de los 7ddp, es decir, la expresión de los *ESR* en las plantas apomíticas es más tardía. Esta diferencia en el tiempo de expresión pudiera explicarse a la diferente constitución genómica del endospermo en los apomíticos, ya que en la reproducción sexual del maíz se observa un radio de

2m: 1p, es decir (2 juegos de cromosomas maternos reducidos: 1 juego de cromosomas paternos reducidos), mientras que los híbridos apomícticos 38C tienen una desviación de este radio, pues en los cromosomas de *Tripsacum* se cuenta con 2m:0p (es decir dos juegos de cromosomas maternos no reducidos y ninguna aportación paterna), mientras que para los cromosomas de maíz se obtiene un radio de 4m:1p (es decir 4 juegos de cromosomas porque no hubo reducción y 1 juego reducido de cromosomas paternos). Esta desviación en los radios, que muestra la distinta contribución genómica entre la parte materna vs paterna no afecta la viabilidad de los híbridos apomícticos aquí estudiados (Grimanelli *et al*; 1997); como suele ser frecuente cuando se presentan desviaciones de este tipo en el maíz (Lin, 1984). Sin embargo, los híbridos apomícticos presentan un exceso de dosis genómica materna y quizás, aunque aún se desconocen a nivel molecular los efectos de éste fenómeno, este exceso de dosis genómica materna podría tener un efecto sobre la regulación de los genes *ESR*, interfiriendo con el desarrollo de la semilla.

En los RT-PCR realizados para *ESR* no se observa expresión en ovarios sin polinizar, ni embriones que coinciden con la expresión exclusiva de estos genes en el endospermo. Sin embargo, no se detectó expresión en embriones y endospermos de 20 días ddp tanto en el híbrido 38C como en el maíz, posiblemente a que han disminuido notablemente los niveles de RNAm. El uso de cDNA sin diluir en 40 ciclos de amplificación, para que fuera posible observar la expresión del gen *ESR*, indicaría que ésta es la menos abundante en comparación de los demás genes estudiados aquí.

Genes, cuyo RNA mensajero se localiza en diferentes tejidos durante el desarrollo del embrión, como *KN1*, *OCL5* y *HOX* fueron estudiados también por RT-PCR en el embrión de plantas apomícticas. En lo que respecta al gen *OCL5*, el cual se considera otro gen utilizado como marcador de la epidermis en maíz, pero que también se expresa en la epidermis de otros tejidos no embrionarios, se observó su RNAm en todos los estadios de óvulos polinizados de plantas apomícticas, desde etapas muy tempranas donde ya existe la presencia de un proembrión lo que sugeriría que la señal pudiera corresponder a las células que están formando la protodermis maíz. Por otro lado *OCL5* se visualizó en todos los demás estadios de óvulos con embriones más avanzados en su desarrollo. En primera instancia sugeriría que esta expresión es propia de la epidermis del embrión, aunque debido a que también hay expresión en óvulos sin polinizar en maíz, transcripción de este gen en tejidos maternos también pudiera ser considerada. La expresión de *OCL5* en el endospermo en los apomícticos concuerda con lo escasa o nula detección en el endospermo de maíz. Se visualizó expresión en hojas jóvenes de los híbridos apomícticos aunque esta es débil en comparación con la fuerte expresión que se ha reportado en hojas maduras de maíz (Ingram *et al*; 2000), las diferencias de transcrito pueden ser reflejo del diferente desarrollo de las hojas.

El gen *Hox* fue analizado y en primera instancia se observa que a pesar de ser un gen homeótico como *KN1*, su transcrito es menos abundante, pues siempre se visualizaron bandas de expresión muy débiles en comparación de las observadas de *KN1* en donde incluso se utilizó cDNA más diluidos. La expresión

el gen *HOX 1b* se ha reportado en todo el tejido propio del embrión pero también en otros tejidos en zonas meristemáticas (Klinge y Werr *et al*; 1995). Este gen fue observado en todos los estadios de óvulos de plantas apomícticas analizados, embriones de 20ddp, y en óvulos no polinizados, por lo que la presencia de RNAm de este gen en los apomícticos pudiera corresponder a expresión del embrión pero no se descarta que también estén sintetizándose transcritos en tejidos maternos.

Se decidió analizar la expresión del gen *KN1* porque en el embrión se observa sólo hasta la diferenciación del MAT, una etapa más avanzada del desarrollo embrionario. En las plantas apomícticas RNAm de *KN1* se observó en óvulos sin polinizar hasta 14ddp. Si un embrión desarrolla su MAT entre los 9-10ddp explicaría entonces la expresión observada en óvulos a los 10 y 14ddp así como en los embriones aislados de 20ddp, pero no en los demás estadios. No hay estudios donde se halla determinado la expresión del RNAm *KN1* en óvulos sin polinizar o polinizados, donde exista un embrión en etapas previas a la diferenciación del MAT del embrión. Sin embargo, se ha demostrado en experimentos de RT-PCR presencia de RNAm en primordios florales, *in situ* se ha observado que la proteína *KN1* también se encuentra los núcleos de todas las células del primordio floral pero que desaparece cuando comienza la diferenciación del óvulo (Smith *et al*; 1992). Así que la expresión observada en óvulos sin polinizar y en óvulos con etapas previas a la formación del MAT en el embrión, indicaría la persistencia al menos el mRNA en tejido materno en las

plantas apomíticas, pero también en maíz, por la amplificación de una banda en óvulos no polinizados.

En las hibridaciones *in situ* realizadas del gen *KN1* se observó que su RNAm está presente en los híbridos apomíticos sólo en la región del MAT, tal y como se observa en el maíz. Estos resultados indican que si existe RNAm del gen *KN1* en la misma región muy probablemente tenga una función similar de la que tiene en el maíz. Análisis de la expresión *in situ* con óvulos en más tempranos estadíos sería útil para constatar que el RNAm que se observa en las reacciones de RT en óvulos sin polinizar proviene de la nucela o *per se* de embriones en estadios iniciales.

Cabe aclarar que al realizar la disección de los granos para los experimentos de *in situ*, se encontró la existencia de variación en el desarrollo de los embriones de 38C, pues aunque la mayoría siguen el patrón descrito por Abbe y Stein (1954) pues varios de ellos a los 10ddp aún seguían con una simetría radial, es decir no era notorio el inicio de la diferenciación del meristemo del tallo. Estas variaciones no son raras y pueden ser explicadas a que en el desarrollo en general las plantas varía considerablemente en diferentes condiciones ambientales y dependiendo del genotipo (Kiesselbach, 1949).

La expresión de *LTP2* en proembriones apomíticos al parecer es muy similar a la que ocurre en maíz pues se encontró en células periféricas de la parte apical del proembrión que es la región del proembrión *per se* y es ausente en la parte basal que constituye el suspensor. Sin embargo, *LTP2* no se expresa en todas

las células periféricas del embrión, pero sí en la región apical y hacia uno de los extremos. De manera interesante, en maíz se ha observado que no hay expresión de *LTP2* en las células externas del embrión donde se diferenciará el MAT, por lo que quizá este mismo fenómeno este sucediendo en las plantas apomícticas, así las células periféricas donde no hay expresión sería la región donde se desarrollará el MAT. Esto significaría que mucho antes de que se diferencie el MAT y se exprese *KN1* ya existe la información necesaria que indica que genes deben actuar en el lugar y tiempo específicos tanto en plantas con desarrollo sexual como probablemente también en plantas apomícticas.

La localización de AGL15 fue difícil determinar debido a que no se pudo eliminar el ruido de la señal, no obstante, al parecer AGL15 en los proembriones de plantas apomícticas se encuentra tanto en el citoplasma como en los núcleos. La señal de AGL15 colocaliza con algunos núcleos teñidos con DAPI, pero también se observa señal en el citoplasma de todo el proembrión incluyendo al suspensor. Lo anterior difiere con lo que se presenta en embriones de maíz ya que si bien en células del aparato del huevo y primeras divisiones del embrión AGL15 se observa en citoplasma, posteriormente esta proteína se visualiza tanto en embriones globulares y durante todas las demás fases del desarrollo embrionario AGL15 es observado predominantemente en los núcleos (Perry *et al*; 1999), más aún este mismo patrón de expresión se ha observado en *Taraxacum officinale* otra planta diplospórica. Al parecer en los proembriones apomícticos estudiados aquí el proceso de translocación de AGL15 esta en proceso, por lo que sería conveniente analizar si en otros estadios más

avanzados del embrión apomítico, AGL15 se encuentra solamente en los núcleos. Debido a que en las plantas apomíticas pseudógamicas ya existe un proembrión que se mantiene en espera de la fertilización para continuar su desarrollo, implica que la fertilización *per se* involucra información para que se realice la continuación del desarrollo del proembrión. El proceso de fertilización por tanto podría activar/desactivar factores que orquesten el reinicio de la embriogénesis. Algunos de estos factores podrían ser genes como *ESR*, los cuales se observan alrededor del embrión y que necesariamente se expresan una vez que se terminó la celularización del endospermo, etapa que coincide con el reinicio del desarrollo del proembrión apomítico, más aún *ESR* son proteínas que se secretan lo que hace se perfilen como molécula señal. También es posible que AGL15 el cual es un factor de transcripción que se transloca de citoplasma a núcleo pueda necesitar del proceso de fertilización para activarse y a su vez activar otro(s) gene(s) en cascada. En la expresión de genes y o sus productos aquí estudiados no hubo notorias diferencias en la expresión, sólo AGL15 y *ESR* presentaron diferencias en el tiempo de expresión en comparación con lo ocurrido en el maíz. Lo que puede ser explicado por efecto de dosis génica maternal pero también por las diferencias entre ambos programas de desarrollo, ya que la reproducción sexual es un proceso continuo en cambio el desarrollo de plantas apomíticas implica una pausa en el desarrollo del proembrión hasta que ocurra la fertilización.

La técnica *Wish* implementada permitió visualizar la expresión de genes sin necesidad de cortes, aunque se sacrificó la resolución debido a que los tejidos

se observan tridimensionalmente. El método para obtener sondas por PCR donde un promotor se añade a un fragmento de DNA específico para un gen dado es rápido y eficiente debido a que se ahorran varios pasos que conlleva la clonación de genes. A pesar que en varios reportes la hidrólisis de sondas de gran tamaño es eficiente, ningún resultado se pudo obtener aplicando éste método y se deduce que probablemente la fragmentación del RNA casi era completa.

CONCLUSIONES

- En las plantas apomícticas se encontró expresión de los genes *HOX 1b*, *KN1*, *OCL5* y *LTP2* muy similar a la que se observa en el maíz lo que apoya la hipótesis que en el programa de desarrollo embrionario ya sea sexual ó apomíctico los genes participantes son los mismos y tienen un papel similar.
- Sin embargo, los genes *ESR* y la proteína AGL15, presentaron diferencias en el tiempo de expresión, esto podría ser causado por las diferencias íntricas entre el programa apomíctico y sexual, pero también a un efecto por exceso de dosis génomica maternal.
- La técnica de WISH es una metodología que nos permite un acercamiento rápido de la expresión de genes *in situ*, en comparación con lo que ocurre con la ISH tradicional, sin embargo, se pierde resolución, ya que se observa al tejido en forma tridimensional, por lo que sería recomendable implementar el uso de ISH para observar a detalle la expresión genética de algunos de los genes aquí analizados.
- La inmunolocalización presentó problemas de ruido de fondo por lo que modificaciones en protocolo sobre todo en puntos clave como una menor dilución de anticuerpo o lavados más estrictos deben ser considerados.

REFERENCIAS

Abbe.,E. C. y O.L. Stein 1954. The growth of the shoot apex in Maize embriogeny. American Journal of Botany. 41: 4 285-293.

Asker, S. y L. Jerling. 1992. Apomixis in plants. Boca Ratón, Florida. CRC Press

Barcaccia, G., A. Mazzucato, M. Falcinelli y F. Veronesi. 1996. Callose localization in cell walls during meiotic and apomeiotic megasporogenesis in diploid alfafa (*Medicago* sp). Caryologia 49:45-56.

Bellman, R y W. Werr. 1992. ZMHOX1a, the product of a novel maize homeobox gene, interacts with the Shunken 26pb feedback control element. The EMBO Journal 11:3367-3374.

Bennetzen, J., y M. Freeling. 1997. The Unified Grass Genome: Synergy in Synteny. Genome Research. 7: 4 301-306.

Berthaud, J e Y. Savidan. 1989. Genetic resources of *Tripsacum* and gene transfer to maize. En: Review of advances in plant biotechnology, 2d International Symposium of Genetic Manipulation in Crops. Mujeeb-Kazi y L.A. Sitch (eds). México, D.F., México and Manila, Phillippines: CIMMYT and IRRI. pp 1985-1987.

Bicknell, R.A. y A.M. Koltunow. 2004. Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. *The Plant Cell* 16: S228-S245.

Bommert, P., W, Werr. 2001. The expression pattern of Lipid Transfer Protein 2 (*LTP2*). Gene indicates regionalization in the proembryo and confines the coleoptile to be in lineage with the scutellum. *Maize NewsLetter.*, 75: 35-36

Bonello, J-F., H.G. Opsahl-Ferstad, P. Perez, C. Dumas, P.M. Rogowsky. 2000. *ESR* genes show different levels of expression in the same region of maize endosperm. *Gene* 246: 219-227.

Bonello, J-F., S. Sevilla-Lecoq, A. Berne, M-C. Risuello, C. Dumas y P.M. Rogowsky. 2002. *ESR* proteins are secreted by cells of the embryo surrounding region. *Journal of Experimental Botany* 53: 374 1559-1568.

Carman, J.G.1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean . Society* 61: 51-94

Chaudhury, A.M., A. Koltunow, T. Payne, M. Luo, M.R. Tucker, E.S. Dennis y W.J. Peacock. 2000. Control of early seed development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 677-699.

Chelly, J. y A. Kahn. 1994. RT-PCR and mRNA Quantitation. En *PCR The Polymerase Chain Reaction*. Mullis,K. B Ferré F., Gibbs, R.A(eds). Editorial Birkhauser. Boston pp 97-109.

Chevalier, J., Y. Ping, M. Odile y T. Xue-Ming. 1997. Biotin and Digoxigenin as Labels for Light and Electron Microscopy *in situ* Hybridization Probes: Where Do We Stand? *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 45:4 481-491

Crane, C.F. (2001). Classification of apomictic mechanisms. En *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*, Y. Savidan, J.G. Carman, and T. Dresselhaus, eds (Mexico, D.F.: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI), pp. 24–43.

Cronquist, A. 1995. *Botánica Básica*. 2da edición. Compañía Editorial Continental. p 340.

De Almeida Engler, J., M. Van Montagu y G. Engler. 1994. Hybridization *in situ* of whole mount messenger RNA in plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 321-331.

Drews, G. N. y R. Yadegari. 2002. Development and function of the angiosperm female gametophyte. *Annual Review of Genetics* 2002. 36: 99-124.

Dumas, C., y L. Mongensen. 1993. Gametes and fertilization Maize as a model System for experimental embryogenesis in flowering plants. *Plant Cell* 5: 1337-1348.

Friedman, W.E. 1990. Double Fertilization in *Ephedra*, Nonflowering Seed Plant: Its Bearing on the Origin of Angiosperms. *Science* 247: 4945 951-954.

Grimanelli, D., M. García, E. Kaszas, E. Perotti y O. Leblanc. 2003. Heterochronic Expresión of Sexual Reproductive Programs During Apomitic Development in *Tripsacum*. *Genetics* 165: 1521-1531.

Grimanelli, D., M. Hernández, E. Perotti e Y. Savidan. 1997. Dosage effects in the endosperm of diplosporous apomictic *Tripsacum* (Poaceae). *Sex Plant Reproduction* 10: 279-282.

Grossniklaus, U. 2001. From sexuality to apomixis: Molecular and Genetic Approaches *En: The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*, Savidan, Y., J.G Carman, and T Dresselhaus, (eds). México, D.F.:CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR). pp 168-174.

Harlan, J.R and J.M.J de Wet 1977 Patways of genetic transfer from *Tripsacum* to *Zea mays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74:3494-3497.

Ingram, G.C., Boissard-Lorig, C., Dumas, C., Rogowsky, P.M. 2000. Expression patterns of genes encoding HD-ZipIV homeo domain proteins define specific domains in maize embryos and meristems. *Plant Journal* 22: 401-414.

Jackson, D.P. 1991. *In situ* hybridization in plants. *En: Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*. Bowles, D.J., S.J Gurr, & McPherson (eds), Oxford University Press.

Kerstetter, R.A., D. Laudencia-Chingcuanco, L.G. Smith, S. Hake. 1997. Oos-of-function mutations in the maize homeobox gene, *Knotted1* are defective in shoot meristem maintenance. *Development* 124: 3045-3050.

Kiesselbach, T.A 1949. The structure and reproduction of corn. Univ. Nebraska Coll. Agricultural Experimental Station Research Bulletin. 161 p.

Klinge, B y Werr, W. 1995. Transcription of the *Zea mays* homeobox (ZMHOX) genes is activated rarely in embryogenesis and restricted to meristems of maize *Plant Development*.

Koltunow, A. M. 1993. Apomixis: Embryo Sacs and Embryos Formed Without Meiosis or Fertilization in ovules. *Plant Cell* 5: 1425-1437.

Koltunow, A. M. y U. Grossniklaus. 2003. Apomixis: A Developmental Perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54: 547-74.

Leblanc, O., D. Grimanelli, D. Islam-Faridi, J. Berthaud e Y. Savidan 1996. Reproductive Behavior in Maize-*Tripsacum* Polyhaploid Plants: Implication for the transfer of Apomixis in to maize. *Journal of Heredity* 87: 108-111.

Leblanc, O., M.D. Peel, J.G. Carman e Y. Savidan. 1995. Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). *American Journal of Botany* 82: 57-63.

Lin, B-Y.1982. Association of endosperm reduction with parental imprinting in maize. *Genetics* 100: 475-486.

Lin, B-Y. 1984. Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics*. 100: 475-486.

Mangelsdorf. P.C y R.G Reeves. 1931. Hybridization of maize, *Tripsacum* and *Euchlaena*. *Journal Heredity* 22: 339-343.

Naumova, T.N. 1993. *Apomixis in Angiosperms: Nucellar and Integumentary Embryony*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Naumova, T.N. y J-P. Vielle-Calzada. 2001. Screening Procedures to identify and Quantify apomixis. En: *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*, Savidan, Y., J.G Carman, and T Dresselhaus, (eds). México, D.F.:CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR). pp 44-62.

Nogler, G.A., 1984. Gametophytic apomixis. In B.M. Johri (ed.), *Embryology of Angiosperms*. New York: Springer-Verlag. Pp. 475-518.

Olsen. O-A. 2001. Endosperm Development: Cellularization and Cell Fate Specification. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 233-267.

Opsahl-Ferstad, H.G., E. Le Deunff, C. Dumas, P.M. Rogowsky. 1997. ZmESR a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. *The Plant Journal* 12: 235-246.

Perry, S. E, M.D. Lehti y D.E. Fernández. 1999. The MADS-Domain Protein AGAMOUS-Like 15 Accumulates in Embryonic Tissues with Diverse Origins. *Plant Physiology* 120: 121-129.

Raghavan, V. 1997. *Molecular Embryology of flowering plants*. E.U.A Cambridge University Press pp 1-4.

Randolph, L.F. 1936. Developmental morphology of caryosis of maize. *Journal of Agriculture Research* 53: 881-916.

Reiser, L y R.L. Fisher. 1993. The ovule and the embryo sac. *The Plant Cell*. 5: 1291-1301.

Rodkiewicz, B. 1970. Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. *Planta* 93: 1 39-47.

Russell, S.D.. 2003. Plant Sexuality, Cell Expression and Preferential Fertilization. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 38: 3-4: 349-356.

Sauer, M., T. Paciorek, E. Benková y J. Frim. 2006. Immunocytochemical techniques for whole-mount *in situ* protein localization in plants. *Nature protocols* 1: 98-103

Savidan, Y. 2000. Apomixis: Genetics and Breeding. *Plant Breeding Reviews* 18: 13-85.

Shah, D.M., R.C. Hightowe y R.B. Meagher. 1983. Genes encoding actin in higher plants: introns positions are highly conserved but the coding sequences are not. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 2: 1 111-126.

Smith, L.G. 1992. A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1*, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Development* 116: 21-30.

Smith, L.G., D. Jackson y S. Hake. 1995. Expression of knotted 1 marks shoot meristem formation during maize embryogenesis. *Developmental Genetics* 16: 344-348.

Sossountzov, L., L. Ruiz-Ávila, F. Vignols, A. Jolliot, V. Arondel, F. Tchang, M. Grosbois, F. Guerbette, E. Miginiac, M. Delseny, P. Puigdomenech, J.C. Kader. 1991. Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3: 923-933.

Stebbins, G. L. 1950. *Variation an Evolution in Plants*. Columbia University Press New York.

Technical Bulletin #154. A PCR Strategy for Rapid Generation of Template DNA for Synthesis of Labeled RNA probes. Ambion. http://www.ambion/techlib/tb/tb_154.html

Tijssen, P., Hybridization with Nucleic Acid Probes. 1993. En: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology series, 24, Editorial Elsevier, Amsterdam.

Vielle-Calzada J.P., C.F. Crane y D.M. Stelly. 1996. Apomixis: The asexual revolution. Science 274: 22 1322-1323.

Volbrecht, E., B. Veit, N. Sinha y S. Hake. 1991. The developmental gene *knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. Nature 350: 241-243.

Watana, A., y S. Uemoto. 1988. Adventive embryogenesis in *Citrus* (Rutaceae). Postfertilization development. American Journal of Botany 75: 1031-1047.

APENDICE I

Soluciones para la hibridación *in situ*

- ❖ Fijador FAA
 - 50% de etanol
 - 5% de ácido acético glacial
 - 3.7% de formaldehído
 - 41.3% de H₂O
- ❖ Buffer de prehibridación:

Para 2 ml (una vez preparado mantener a 56 °C porque precipita muy rápido)

- 600ul de 20X SSC
- 300ul de 20% SDS
- 1ml de formamida pura desionizada
- 20ul de un stock de 10mg/ml de tRNA de levadura
- 79ul de H₂O DEPC
- ❖ Fijador para inmunolocalización:
 - 500ul de Paraformaldehído al 8%
 - 500ul de buffer PHEMS
 - 40ul de glutaraldehído

El buffer PHEMS contiene 60mM Pipes, 25mM HEPES, 10mM de EGTA, 2mM de MgCl₂ y 0.32M de sorbitol.

APENDICE 2

Secuencia del cDNA de gen *Knotted 1*

```

1   ccgaggcatc cttctccttt ccctctcctt ccccaaacc ttttcctctt tccctcgccc
61  caagaacttc atctcatctc caggcgcccc ttttgcgctt ggcgaggagg agctcacggg
121 gacagtgggc ggagagctcg atcgctgcac cactacttca ctggagggtcc gccactccc
181 atggaggaga taccccaaca ctttggagtt ggcgcaagca gccacggcca tggccacggc
241 cagcaccacc atcatcacca ccaccaccac ccgtgggcat cctccctcag cgccgtcgta
301 ggcgctgctc cgccgcaacc gccaaagcga ggctgcccgc tgaccctgaa cacgggtggcg
361 gccactggga acagcggcgg tagcggcaac ccggtgctgc agcttgccaa cgggtggcggc
421 ctctcgacg catgctgcaa ggcgaaggag ccctcgctct cgtctcccta cgcaggcgac
481 gtcgaggcca tcaaggccaa gatcatctcg caccacact actactcgtc cctcactgcc
541 tacctcgagt gcaacaagg gggggcacca ccggagggtg cggcgagggt gacggagata
601 ggcgaggagg tggaggcgcg gcagcgcacg gcgctcggcg gcctggccgc tgcgacggag
661 ccggagctgg accagttcat ggaggcgtac cacgagatgc tggatgaagt cagggaggag
721 ctgacgagge cgtgacgga ggcgatggag ttcattgcaa ggggtggagt gcagctgaac
781 tcgctttcca tctccggaag gtcgctgctc aacatccttt catctggctc ttctgaggag
841 gatcaagaag gttagcggag agagaccgag ctccctgaag ttgatgcaca tgggtgtggac
901 caagagctga agcaccatct cctgaagaaa tacagtggct atctaagctc gctcaagcaa
961 gaactgtcaa agaagaagaa gaaagggagg ctccccagg aggctcgcca gcagctcctt
1021 agctgggtgg atcagacta caaatggcct taccctcag agactcagaa ggtggcactg
1081 gctgagtcta ccgggcttga cctgaagcag atcaacaact ggttcatcaa ccagcgggaag
1141 cggcactgga agccatccga ggagatgcac cacctgatga tggatgggta ccacaccacc
1201 aatgccttct acatggacgg ccacttcac aacgacggcg ggctgtaccg gctcggctag
1261 ccaccggtat ctgcttcca ttacacacc cacggcctag ctataaagac taatggttcc
1321 aggtgtctga agtactgaag acaggggggc tagctatcta atgtttgtgc cgcacgcatg
1381 agctgtaagg aggccatgct taattattct gttgcccgtt ctactctatc tatatgcgcc
1441 tatgcctccg tgcatagaact atgctttagg tggttgctgc tccacactgt ggtggtgtgc
1501 ttttgctttt gtgtggctgt attgtatgct taacctgaca gatggatccc tgattgctac
1561 atgtttgaat aatttgcatt atctagctag tttctgccta atctaattggt acggctcatg
1621 tcttctc
  
```

Región rica en histidinas 

Región Homeobox 

Primer KN1-Forward 

Primer KN1-Reward 

Figura 11. Secuencia del cDNA del gen *KN1*, se señala en rojo la caja homéotica conservada de la familia de genes *KNOX* y la región que amplifican los primers seleccionados para generar un fragmento específico del gen *KN1*.

APENDICE 3

Secuencia del cDNA de *LTP2*

```
1   ccactcccaa gccagtagcc acagtcctac gagcagtcgc acgcaagtgt caagagacga
61  aacggtcgac atggctcgca cgcaatctgc cgtagcggtc gccgtggtgg ccgcggtgct
121 gctgctggca gcggcggcga cgacctcgga ggccgccatc acctgcgggc aggtgagctc
181 cgccatcgcg ccctgcctct cctacgcccg cggcacgggg tccggcccct ccgcgctctg
241 ctgtagcggc gtcaggaacc tcaagagcgc cgccagcacc gccgcccaca ggcgcccgcg
301 ctgcaactgc ctcaagaacg ccgccagggg cgtcagcggc ctcaacgccg gcaacgccgc
361 cagcatcccc tccaagtgcg gcgtcagcat cccctacacc atcagcacct ccaccgactg
421 ctccagggtg aactaaaacc tagaccacgc gcgacgacgg ccgcctgacg gatcgaccaa
481 ccattccgcc gtcgcccgcg gccggatcat cgatcgtcgt catgatgata tctatcaatc
541 tacgcgatgac gatcgatggc tacttgccta ctgctatgta ctactaaata aaatctctcc
601 gtgtgtgcac gtacgcttgc atgtgcatgg tagcatgtat gtacgacgct gtccatgtat
661 gtgtgtgtga cgtgtgagac agagagagag agagagagag acaggatcga tcgagagacg
721 gtcatgtcct tttggctgtt tggtttattc atatcacaac ttttgagtgt
```

Primer F-LTP



Primer R-LTP



Figura 12. Secuencia de *LTP2*. Se señala la secuencia de los primers utilizados para obtener un fragmento específico para este gen.