



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“Origen de los brotes múltiples en la población de maíz  
UAAAN-IMM-BAP”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

PATRICIA PÉREZ BELMONT



DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN

México D. F. 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**Esta tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, dentro del taller titulado “Biología del Desarrollo y Función de Estructuras Reproductoras en Cactáceas”. Se trabajó en colaboración con el Dr. José Espinoza Velázquez de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro de Saltillo Coahuila, México.**

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Pérez  
Belmont  
Patricia  
044 55 13 54 94 91  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
301697165

### 2. Datos del tutor

Dra  
Guadalupe Judith  
Márquez  
Guzmán

### 3. Datos del sinodal 1

Dr  
José  
Espinoza  
Velázquez

### 4. Datos del sinodal 2

Dr  
Felipe  
Cruz  
García

### 5. Datos del sinodal 3

Dra  
Sonia  
Vázquez  
Santana

### 6. Datos del sinodal 4

M en C  
Margarita Rosenda  
Ponce  
Salazar

### 7. Datos del trabajo escrito

Origen de los brotes múltiples en la población de maíz UAAAN-IMM-BAP  
76 p  
2009

## Agradecimientos

- Dr. José Espinoza Velázquez de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, encargado de las investigaciones agronómicas y de mejora genética en la población de maíz UAAAN – IMM – BAP<sup>®</sup>, entre otras.
- M. en C. Alejandro Martínez Mena, Biol. Anabel Bieler y Biol. Alfredo Gamboa del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por la toma de fotomicrografías en microscopía de luz.
- Dra. Silvia Espinoza del Laboratorio de Microscopia de Barrido de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por el procesamiento de muestras para MEB y toma de fotomicrografías.
- Dr. Felipe Cruz García, Dra. Sonia Vázquez Santana y M. en C. Margarita Rosenda Ponce Salazar, revisores de tesis.
- M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong y M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco por el apoyo técnico en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la UNAM.
- Juan Manuel Sánchez Ramírez por el apoyo en la colecta del material.
- Leobardo Cárdenas, encargado del campo experimental “Dr. Mario E., Castro Gil” en Tepalcingo, Morelos.

***A mi mamá...***

## **Dedicatoria personal.**

Dedico principalmente esta tesis a mi familia. A mi madre por quien realicé esta carrera, para ella y en su honor. A mi padre que me ha apoyado en todos sentidos y a quien quiero inmensamente. A mi hermano Alfonso que a pesar de todo lo quiero y siempre querré y a mi hermana Cristina que me ha dado el valor para seguir adelante y una amistad inigualable.

A todos mis amigos, grandes personas y personajes que han estado conmigo en todo momento dándome su amistad incondicional. Ingrid Arvizu, Rosario Dorantes, Mariana Hope, Quiahuatl Gómez, Alejandra Medina, Luz, Aurelia Gómez, Dení Cervantes, Pablo Álvarez, Sara Márquez, Erika Guerra, Kathia Lueneberg, Karla Cid, Gabriela Platas, Tania Villareal, Ania Vargas, Paulina López, Maribel Morales, Jorge Labrac. A Diego García, de quien recibí el mejor apoyo y amor que alguien pueda tener y quien me enseñó muchas cosas que no se aprenden estudiando.

A mi tutora en el amplio sentido de la palabra, Judith Márquez, le agradezco infinitamente su apoyo en esta tesis, en mi formación académica y en mi vida personal. Gracias por las pláticas y por tu visión de la vida y de la biología, gracias por creer en mí como lo haces.

A mis abuelos, tíos, primos y sobrinos que representan una parte importante en mi vida, quienes me han apoyado en las buenas y en las malas.

A todo el laboratorio de desarrollo en plantas, alumnos y maestros con quienes compartí conocimientos y un ambiente de trabajo perfecto para la realización de esta tesis.

Y a todas aquellas personas que no menciono porque la lista sería como una tesis más, pero que han intervenido en mi vida agregando un granito que ha contribuido a mi formación hasta ahora.

## Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Antecedentes.....	6
3.1. Descripción de la especie.....	6
3.1.1. Desarrollo de la inflorescencia masculina.....	7
3.1.2. Desarrollo de la inflorescencia femenina.....	7
3.1.3. Desarrollo después de la fecundación.....	9
3.1.4. Determinación sexual del maíz.....	13
3.1.5. Clasificación.....	16
3.2. Apomixis.....	17
3.2.1. Tipos de Apomixis.....	17
3.2.2. Apomixis en maíz.....	22
3.3. Poliembrionía.....	27
4. Justificación.....	30
5. Objetivo general.....	30
6. Objetivos particulares.....	30
7. Material y Método.....	31
7.1. Material vegetal.....	31
7.2. Polinización.....	32
7.3. Colecta.....	33
7.4. Procesamiento de las muestras.....	34
8. Resultados.....	38
8.1. Germinación.....	38
8.2. Flores femeninas desde la etapa 0 a la 9.....	38
8.3. Semillas maduras.....	41
9. Discusión.....	52
10. Conclusiones.....	63
Anexo 1.....	64
-Tabla 1.....	64
Bibliografía.....	67



**Índice de figuras**

Figura 1. Esquema general de la planta de maíz y de las inflorescencias femenina y masculina.....	8
Figura 2. Esquemas e imágenes del desarrollo de la inflorescencia femenina.....	10
Figura 3. Esquema e imágenes del desarrollo embrionario de maíz.....	14
Figura 4. Microfotografía en MEB de maíz en etapas tempranas en su etapa bisexual.....	15
Figura 5. Diagrama de la clasificación de la poliembrionía.....	29
Figura 6. Fotografías de la polinización en campo.....	36
Figura 7. Fotografías de la disección de semillas maduras.....	37
Figura 8. Fotografías de semillas germinadas en laboratorio.....	42
Figura 9. Microfotografías de cortes al micrótopo de flor femenina en etapa 0 y 1....	43
Figura 10. Microfotografías de cortes al micrótopo de saco embrionario en etapas 1 y 2, y de embrión en etapa 4.....	44
Figura 11. Microfotografías de frutos con embriones en etapas 4 y 6. Cortes en micrótopo y MEB.....	45
Figura 12. Microfotografías de frutos con embriones en etapas 6 y 7. Cortes en micrótopo y MEB.....	46
Figura 13. Microfotografías en MEB de embriones en etapa 7.....	47
Figura 14. Microfotografías de cortes en micrótopo y ultramicrótopo y observaciones en MEB de embriones en etapas 7 y 8.....	48
Figura 15. Microfotografías de frutos y embriones en etapas 8 y 9. Cortes en micrótopo y MEB.....	49

Figura 16. Microfotografías de embrión en etapa 9 y de embriones de semillas maduras, cortes en micrótopo.....50

Figura 17. Microfotografías de embriones de semillas maduras, cortes en micrótopo.....51

Figura 18. Esquema de la embriogénesis en maíz.....55

Figura 19. Embriones mutantes de maíz mto38. Embrionía adventicia en *Citrus*, y embriones con poliembrionía suspensorial y cleavage.....58

Anexo

Figura 1. Desarrollo del maíz.....66

## **1. Resumen**

El desarrollo embrionario se ha estudiado ampliamente en el maíz (*Zea mays*). La población de maíz UAAAN-IMM-BAP<sup>®</sup> (BAP<sup>®</sup>) posee la capacidad en sus semillas de producir múltiples tallos, comparados con las semillas silvestres de *Z. mays* que normalmente producen un solo tallo a partir de un solo embrión por cariósida (fruto o grano). La presente investigación se realizó en poblaciones de maíz enano ubicadas en los campos experimentales “Dr. Mario E., Castro Gil” en Tepalcingo, Morelos y “Buenavista” en Saltillo, Coahuila, ambos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) con sede en Saltillo Coahuila. Se realizaron estudios anatómicos de las flores femeninas y de las semillas producidas por los individuos de esta población (BAP<sup>®</sup>), con el fin de encontrar el origen de los tallos múltiples. Inicialmente se propuso que este fenómeno se debía a la presencia de más de un embrión por fruto, puesto que el nombre del cultivar así lo indica, incluso este cultivar se ha ligado a procesos como la apomixis; sin embargo, los resultados indicaron que la presencia de múltiples plúmulas están asociadas generalmente a una sola raíz, es decir, un solo embrión. La presencia de múltiples tallos y raíces en una sola semilla puede ser explicada por un fenómeno de poliembrionía o por el efecto de niveles anormales de auxinas causadas por mutaciones. Esta desviación en el desarrollo del embrión podría tener su origen en la zona meristemática apical en donde se observa el crecimiento de más de una plúmula, o en la zona meristemática radicular donde se observan una o más raíces, tratándose posiblemente de sistemas genéticos independientes. Las plantas, producto de la germinación de estas semillas se observan en el campo como plantas con múltiples brotes.

## **2. Introducción**

Desde hace aproximadamente 30 años un grupo de ingenieros agrónomos interesados en el mejoramiento del maíz, reunió en México todas las variedades de maíz enano existentes tanto de México como en otros países de América Latina e incluso de Estados Unidos. Estas variedades se cruzaron entre si con la finalidad de obtener una población híbrida de maíz que fuera producto de la cruce de todas las variedades utilizadas. A esta población base, consolidada entre 1969 y 1970 se le llamó “Selección Súper Enana”, cuyas características de enanismo y una competencia por recursos baja entre los individuos, entre otras, propició una mayor producción de maíz por hectárea. Una vez logrado el alto rendimiento, los diferentes grupos de investigación relacionados con esta población se dedicaron a la mejora en la calidad del grano<sup>1</sup> de maíz y se observó de manera casual y espontánea el surgimiento de una a tres plantas por semilla (Castro-Gil, 1979). Desde entonces los estudios realizados con esta variedad han sido únicamente agronómicos y de fitomejoramiento, y se cree que el fenómeno observado se debe a un proceso de poliembriónía, de ahí que la población sea denominada Braquítica de Alta Poliembriónía (BAP<sup>®</sup>). El fenómeno poliembriónico en maíz fue reportado por Morgan y Rappleye (1951), quienes irradiaron con rayos X el polen de maíz y realizaron cruces en plantas que no tuvieran ningún tipo de mutación, logrando como resultado semillas poliembriónicas (con dos y tres embriones) a causa de las mutaciones generadas por la radiación.

Inicialmente a los individuos de la población BAP<sup>®</sup> se les denominó “gemelos” (nombre acuñado por el Dr. Mario Castro Gil de la UAAAN) y cuya frecuencia en la

---

<sup>1</sup> Grano: Término agronómico para designar una cariósida, fruto característico de la Familia Poaceae.

población era de sólo el 1.5%. Esto se publicó en el año de 1973 y a partir de esa fecha se aislaron a los individuos poliembriónicos para cruzarlos entre ellos e incrementar la frecuencia de poliembriónía por un método de selección recurrente (Castro-Gil, 1979; Espinoza *et al.*, 1998). Así, se incrementó la frecuencia a 48% en el sexto ciclo (Gómez-González, 1983). Igualmente se cruzaron con individuos de talla más alta introduciendo una nueva variedad con la característica poliembriónica llamada NAP<sup>®</sup> (Normal de Alta Poliembriónía<sup>®</sup>).

Posteriormente en el año de 1995 el Dr. José Espinoza Velázquez se hace cargo de estas poblaciones que presentan una frecuencia de poliembriónía del 44%, denominando a las poblaciones UAAAN-IMM-BAP<sup>®</sup> y UAAAN-IMM-NAP<sup>®</sup> (Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Instituto Mexicano de Maíz – Braquítica de Alta Poliembriónía<sup>®</sup> (BAP<sup>®</sup>) y Normal de Alta Poliembriónía<sup>®</sup> (NAP<sup>®</sup>) respectivamente). BAP<sup>®</sup> se refiere a una población de plantas braquíticas o enanas que presentan frecuencias altas de poliembriónía, mientras que NAP<sup>®</sup> se refiere a plantas de tamaño relativamente normal también con frecuencias altas de poliembriónía, ambas poblaciones poseen altos porcentajes de lisinas y ácidos grasos superiores a los del maíz común (Ramírez *et al.* 2008). La razón de tener ambas poblaciones es poder cruzarlas y así obtener en una sola población las características de interés, aunque el objetivo inicial es lograr incrementar la frecuencia de poliembriónía hasta que las poblaciones se estabilicen. A la fecha la frecuencia de poliembriónía se ha incrementado a un 55% ó 60%, mientras que el 40% ó 45% de la población restante no es poliembriónica (Espinoza y De León, 2005; Espinoza Velázquez, comunicación personal). Se calcula que la poliembriónía incrementa por efecto de la selección anualmente en un 6% en la población braquítica y en un 8% en la población de porte normal (Espinoza *et al.*, 1998).

Al inicio del manejo de estas poblaciones de maíz se adicionaron fuentes externas de germoplasma, cruzando a las poblaciones poliembriónicas con variedades de diferentes regiones de México (del Bajío, trópico seco, trópico húmedo y Mesa central) para incorporar variabilidad genética a los nuevos embriones generados (Gómez-González, 1980).

A la par de estas poblaciones se tienen otras que representan el control, denominadas BBP<sup>®</sup> y NBP<sup>®</sup> (Braquíticas y Normales de Baja Poliembriónía, respectivamente), que se han obtenido a partir de cruza mesofraternales, en estas cruza intervienen tres individuos como mínimo, uno como donador de polen y dos como receptores (Márquez, 2007). Para este fin se utilizan individuos no poliembriónicos de las poblaciones BAP<sup>®</sup> y NAP<sup>®</sup>. Los resultados fueron poblaciones de individuos tanto poliembriónicos como no poliembriónicos, con una frecuencia de poliembriónía de 48%, lo cual indica que este fenómeno en particular tiene implicaciones genéticas y no ambientales. A partir de esto se continuaron cruzando los individuos resultantes no poliembriónicos con la finalidad de disminuir la frecuencia de poliembriónía, la cual es actualmente de 2%, observándose que con esta disminución se tienen plantas con un ciclo más rápido, una mejor germinación y un buen rendimiento, lo que indica las limitantes de este fenómeno.

La información que se tiene acerca de estas poblaciones se ha generado por medio de la observación, y el presente estudio implica el primer acercamiento a la ontogenia de estos individuos. Las hipótesis sobre el origen de dos o más brotes por semilla pueden ser muchas y éstas han incluido a los procesos de apomixis y poliembriónía como supuestos responsables de la presencia de más de un individuo por semilla. También se ha sugerido que hay mutaciones que implican modificaciones

morfológicas que pueden estar actuando sobre la población provocando un fenómeno como este.

### **3. Antecedentes**

#### **3.1. Descripción de la especie**

El maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia Poaceae (Gramineae) la cual contiene de 5 000 a 9 000 especies (Spichiger *et al.*, 1995). Se trata de una especie monoica, la inflorescencia estaminada o masculina se encuentra en la parte apical de la planta, mientras que la inflorescencia pistilada o femenina se halla de manera lateral en los nudos del tallo de la planta (Dellaporta y Calderon-Urrea, 1994) (Figura 1. A).

En la madurez, la planta de maíz está constituida por un tallo que se divide en nudos y entrenudos que varían en tamaño, hojas de follaje que surgen una en cada nudo de manera alternada, raíces adventicias, y racimos de inflorescencias masculinas y femeninas denominadas espigas (Figura 1. B). Estas últimas poseen flores que se hallan pareadas con una rama condensada que consiste en un tallo corto (raquilla) en el cual se encuentran estructuras similares a hojas, las glumas estériles. Las glumas rodean por completo a las flores masculinas y parcialmente a las femeninas. También existen otros tipos de hojas hacia el interior de la flor que se denominan lemma y palea, la lemma se ubica adyacente a las glumas y las paleas en el lado opuesto, adyacentes una de la otra dejando una separación entre el par de flores. El orden de la parte externa a la interna de la flor es: bráctea (que protege a la flor del lado externo), gluma I, lemma I, palea I, palea II, seguido de los carpelos o gineceo y en la parte interna de la flor la lemma II y finalmente la gluma II (Cutler y Cutler, 1948). Las ramas axilares laterales son las inflorescencias femeninas, las cuales tienen pequeños entrenudos con hojas modificadas denominadas “envolturas”



cuyo arreglo es el mismo que en el tallo principal. De cada par de flores femeninas, únicamente una es funcional, al contrario de las masculinas ya que ambas flores producen estambres funcionales (Bonnett, 1954).

### ***3.1.1. Desarrollo de la inflorescencia masculina***

El desarrollo de la inflorescencia masculina empieza dos semanas después de la emergencia si las condiciones son favorables; al inicio se da el alargamiento del ápice del tallo y el surgimiento de los primordios de las ramificaciones de la espiga (Figura 1. B). Los primordios se vuelven bilobulados y cada lóbulo da origen a una inflorescencia con dos flores (inferior y superior) rodeadas por glumas y posteriormente por la lemma y palea. Surgen tres estambres, dos lodículos y un pistilo rudimentario (Figura 1. D). La antera es tetrasporangiada y biteca, está conformada de fuera hacia dentro por epidermis, dos capas medias, tapete y tejido esporógeno que dará lugar a microsporas y posteriormente a los granos de polen (Kiesselbach, 1980).

### ***3.1.2. Desarrollo de la inflorescencia femenina***

El desarrollo de la inflorescencia femenina inicia con un brote axilar en alguno de los nudos, éste se encuentra envuelto en una estructura tipo hoja llamada prophyllum, la cual posee dos venas medias y carece de lígula, ésta persiste como una de las envolturas de la mazorca y llega a medir 21.6 cm de largo y 4.8 cm de ancho (Figura 1. C). Al inicio la mazorca es suave y las protuberancias basales son las primeras en desarrollarse, cada una de estas es bilobulada y cada uno de los

lóbulo genera una inflorescencia con dos flores de las cuales una es pedicelada (que eventualmente degenera) y la otra sésil (Figura 2. A) (Kiesselbach, 1980).

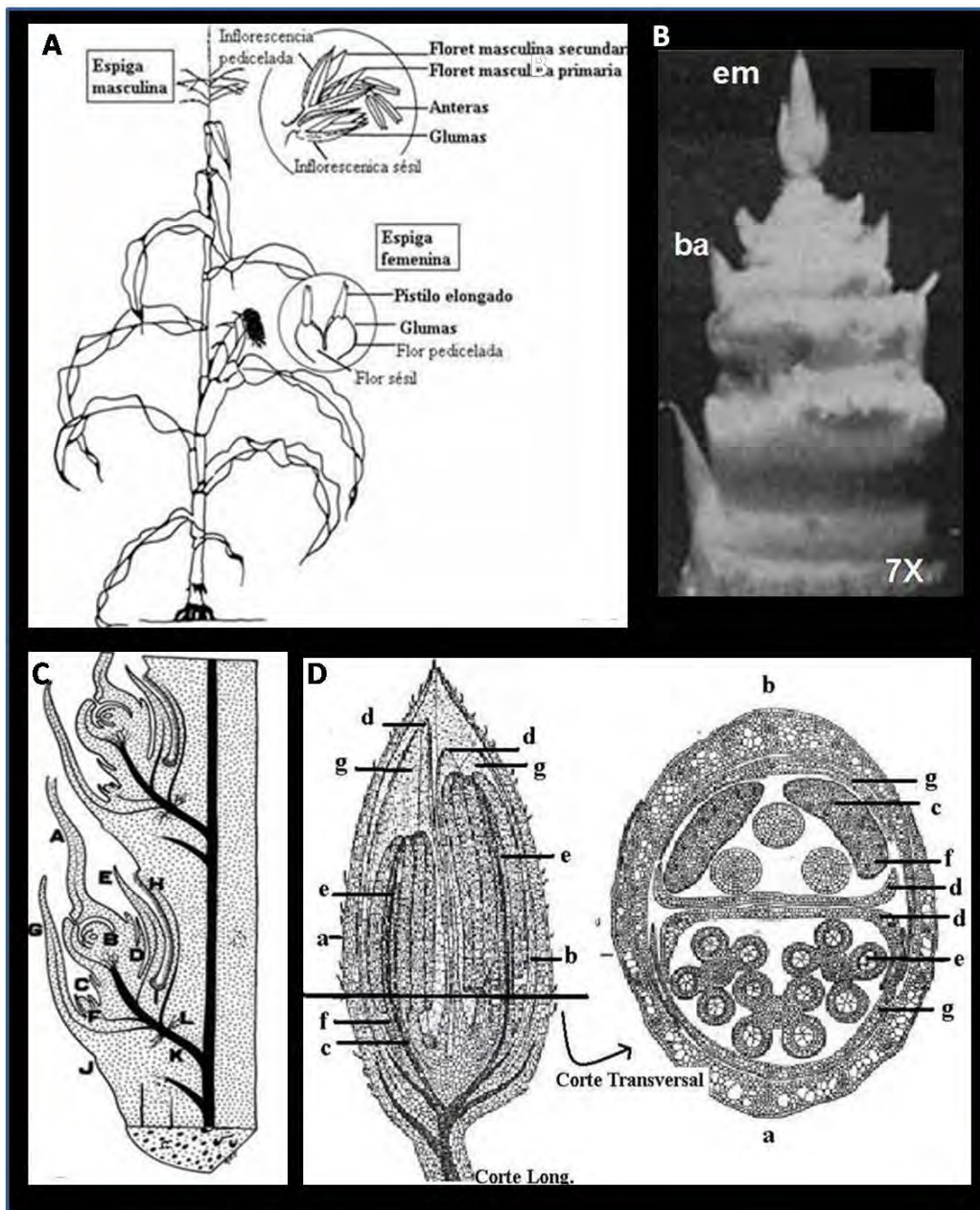


Figura 1. **A.** Esquema general de la planta de maíz, con detalle en las inflorescencias femenina y masculina. **B.** Tallo con hojas removidas mostrando la espiga masculina (em) y los brotes axilares (ba) o espiga femenina, 7X. **C.** Esquema de la inflorescencia femenina en un corte longitudinal; estilo de la flor fértil (a), flor fértil incluyendo el estambre abortivo a la derecha (b), palea de la flor fértil (c), lemma de la flor fértil (d), gluma superior (e), flor estéril o abortiva (f), mostrando rudimentos de la lemma, el pistilo, el estambre y la palea, gluma inferior (g), cúpula que forma el prophyll adnado (h), bráctea (j), haz vascular principal (k), complejo nodal (l). **D.** Inflorescencia masculina mostrando sus partes, corte longitudinal (izquierdo) y transversal (derecho); gluma inferior (a), gluma superior (b), lodículos (c), palea (d), antera (e), filamento del estambre (f) y lemma (g). Figura A tomada de Dellaporta y Calderon-Urrea (1994), figura B tomada de Bonnet (1954), figura C tomada de Nickerson (1954) y figura D tomada de Kiesselbach (1980).

El óvulo que se forma es sésil, aproximadamente campilótopo y con dos tegumentos, el interno que se extiende hasta la zona micropilar y el externo que únicamente crece desde el funículo hasta la zona del canal estilar (Kiesselbach, 1980).

El estilo es de origen tricarpelar (Philipson, 1985) pero en este caso únicamente participa en su formación el carpelo anterior y rara vez el posterior. De acuerdo a Kiesselbach (1980) la superficie del estilo se llena de células estigmáticas provenientes de la epidermis formando una especie de cabellos constituidos por cuatro células (Figura 2. B). Durante la megasporogénesis la célula arquesporrial da lugar a la célula madre de la megaspora, las células de la nucela llevan a cabo divisiones periclinales dando lugar a aproximadamente seis capas celulares generando una nucela tenuinucelada; en la megagametogénesis durante la primera división celular se forma una vacuola central, posteriormente se forman las células que conforman a un saco embrionario de tipo Polygonum, el cual una vez formado se alarga, las células antípodas pasan por varias divisiones hasta llegar a ser 30 ó 40 células (característica de los pastos) como se observa en la Figura 2. C (Kiesselbach, 1980).

### ***3.1.3. Desarrollo después de la fecundación***

El desarrollo del endospermo comienza dos o tres horas después de la fecundación y es de tipo nuclear, formándose de 128 a 256 núcleos durante las primeras 40 horas para posteriormente formar las paredes celulares. Las células de la periferia se convierten en un tejido nutricional, parte de estas células son células antípodas que persisten en etapas tardías y llegan a confundirse con el endospermo.

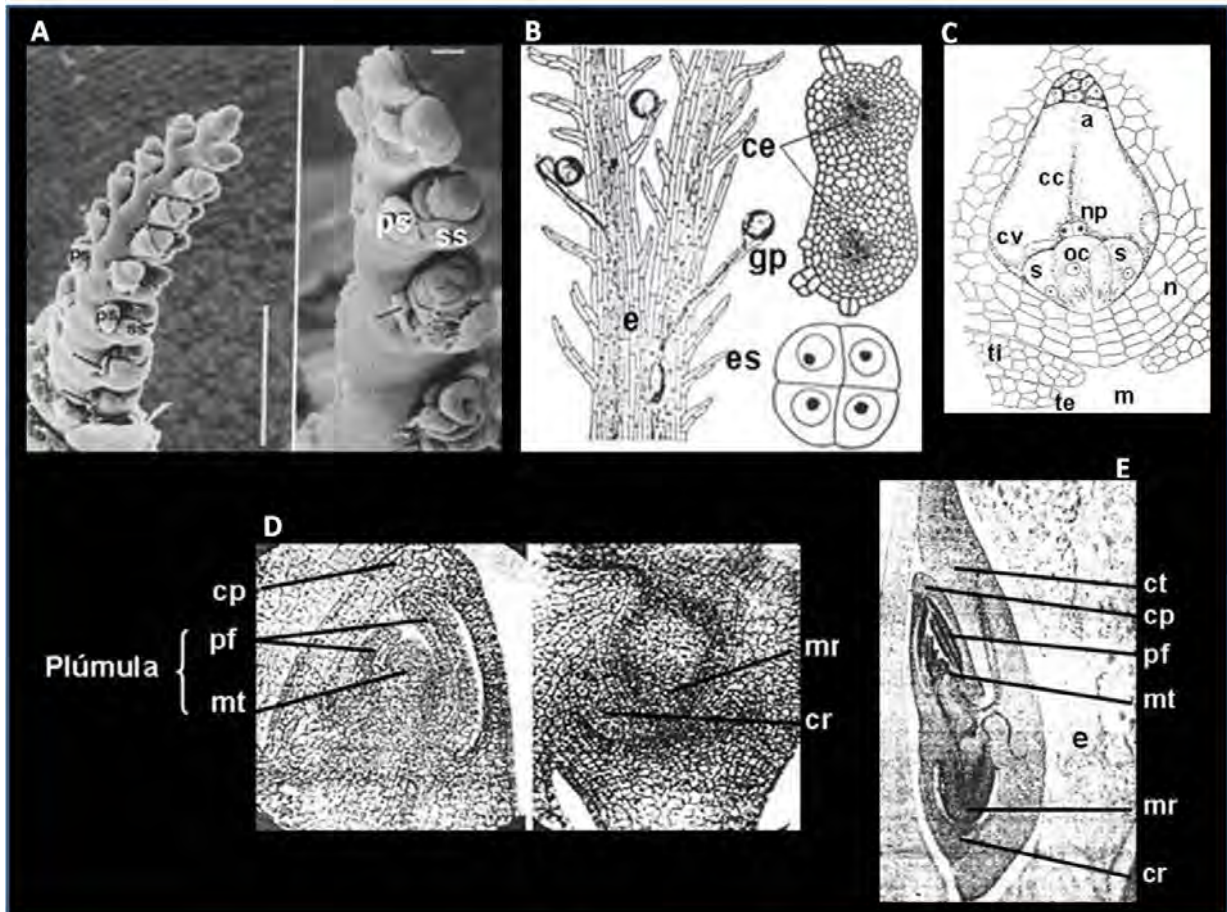


Figura 2. **A.** Espiga femenina mostrando los pares de flores pedicelada (ps) y sésil (ss), nótese como la flor pedicelada degenera. **B.** A la izquierda corte longitudinal de un estilo (e), estigma (es) y granos de polen germinando (gp); a la derecha arriba corte transversal del estilo mostrando el tejido de transmisión que se bifurca (ce) y abajo corte transversal de un pelo del estigma mostrando el arreglo de 4 células que lo forman. **C.** Esquema de un saco embrionario maduro, por debajo del aparato del huevo formado lateralmente por las sinérgidas (s) y al centro por la ovocélula (oc), los núcleos polares (np) en la célula central (cc) y en contacto con la ovocélula el citoplasma vacuolado (cv), en la parte superior las células antípodas (a) que se han dividido continuamente mostrando algunas binucleadas, también se observan los tegumentos interno (ti) y externo (te), la nucela (n) y la zona del micrópilo (m). **D.** A la izquierda corte longitudinal de embrión mostrando la plúmula formada por dos primordios foliares (pf) y el meristemo apical del tallo (mt) rodeadas por el coleoptilo (cp) y a la derecha el meristemo de la raíz primaria (mr) rodeada por la coleoriza (cr) (140 X). **E.** Corte longitudinal de un embrión maduro mostrando el escutelo o cotiledón (ct), coleoptilo (cp), Meristemo apical del tallo (mt), primordios foliares (pf), meristemo apical de la raíz (mr) y coleoriza (cr). Figura A. Tomada de: Sundberg y Orr 1990; Figuras B – E Tomadas de: Kiesselbach, 1980.

La primera división del ahora cigoto es transversal y da origen a una célula apical y una basal vacuolada que es más grande en tamaño, las siguientes divisiones del embrión son asimétricas, y la formación de las paredes celulares son oblicuas (en diagonal) lo que le da una posición interna dorsoventral al embrión (Batygina, 2006). Mientras que el endospermo tiene ya 250 células aproximadamente, el embrión posee 12, con un suspensor muy alargado que posteriormente degenera. En esta

etapa las divisiones del endospermo son más lentas que las del embrión y poco a poco van formándose algunas estructuras de la nueva planta (Figura 3. A).

A los cinco días después de la fecundación el embrión forma una protuberancia en la punta y por debajo el suspensor (Figura 3. B). Al décimo día comienza el crecimiento del escutelo opuesto al epicótilo (o plúmula), que en este momento se encuentra como una protuberancia rodeada por un tejido circular, el coleoptilo. Posteriormente el coleoptilo se desarrolla alargándose, crecen los primordios foliares y el crecimiento de la plúmula se orienta lateralmente, mientras que el escutelo se alarga rodeando el eje del embrión (Figura 3. C y D). Debajo del nudo escutelar (que se define gracias a la continuación del procambium) se organiza la radícula (raíz primaria) y la coleorriza o cofia, la radícula se encuentra unida a la coleorriza, de la cual se separará en la madurez. Por encima del nudo escutelar crecen las raíces seminales adventicias (posterior a la germinación surgen más raíces adventicias de los nudos de las raíces laterales y principal o de los nudos del tallo) (Esau, 1977).

De acuerdo a Esau (1977) el embrión maduro (Figuras 2. E y 3. E) finalmente queda apreso al endospermo por el escutelo, de acuerdo a Guingnard y Meshe (1970), el escutelo es una gran hoja cotiledonaria transformada durante la evolución, especializada en la absorción del endospermo transformando la glucosa en sacarosa. El eje embrionario se encuentra lateralmente, en su parte baja, en la región que correspondería al hipocótilo (en *Zea mays* no existe a menos que el término sea referido al nudo escutelar), se encuentra la radícula rodeada por la coleorriza (Figura 2. D), la radícula al inicio continúa debajo con el suspensor que degenera en la madurez (Esau, 1985). Por encima de la radícula está el nudo escutelar, le sigue el epicótilo o plúmula con los primordios foliares en la parte superior del eje (Figura 2.

D), de los cuales el primero y más externo es el coleoptilo (el cual posee una abertura o poro en el ápice para permitir la salida del tallo y gracias a su geotropismo positivo, guía y protege a éste durante la germinación, posee también estomas en ambas caras), aunque algunos anatomistas consideren al coleoptilo como una continuación del escutelo y no un producto foliar del meristemo apical; la unidad que forman el escutelo y el coleoptilo es el entrenudo que hay entre ellos que corresponde al mesocótilo (Esau, 1985).

Existen diferentes posturas en cuanto a las estructuras de los embriones de maíz y en general de los pastos. Brown (1960 y 1965) postula que el coleoptilo y el mesocótilo son innovaciones sin contrapartes, pero que han evolucionado como estructuras peculiares y útiles para el embrión y que también el escutelo y el coleoptilo son parte del mismo cotiledón con diferentes funciones ya que se derivan del proembrión, es decir, que el coleoptilo al no formarse a partir del meristemo apical no puede ser considerado homólogo a una estructura foliar (Brown, 1959).

Igualmente en las raíces se tienen posturas diferentes en relación a la morfología, en ocasiones la coleorriza se considera como parte del suspensor o como la raíz primaria suprimida y la radícula como raíz adventicia (Johri, 1984).

El fruto que se forma es una cariósida, fruto seco indehiscente con una semilla, formada en un 85% por el endospermo, 10% del embrión y 5% del pericarpio. El embrión se posiciona en la base adyacente a la pared del fruto y en el lado ventral; su unión con el endospermo se da por medio del escutelo. La cariósida se compone en su madurez, de acuerdo a Batygina (2006), de fuera hacia dentro por (Figura 3. F):

- Pericarpio: pared del fruto. Formada por el exocarpo, mesocarpo y endocarpo, capas celulares que se distinguen por la forma de las células que las componen, el grosor de las paredes celulares y sus propiedades mecánicas. Estas capas celulares mueren y colapsan, dejando los remanentes de las paredes celulares engrosadas y lignificadas.
- Cubierta seminal: el tegumento externo debido a su lento crecimiento no cubre en su totalidad a la nucela y durante el desarrollo del fruto degenera, el tegumento interno se altera y comprime. Este último posee cutículas y contiene pigmentos por lo que da reacciones positivas para materiales grasos, sin embargo la cutícula y los restos de paredes desaparecen a los 8 días después de la fecundación.
- Membrana nucelar: pared externa o epidermis de la nucela que se engrosa y suberiza formando una capa semipermeable entre la aleurona y el pericarpio, la cual da nutrientes y protege al endospermo al inicio de su desarrollo.
- Endospermo: el desarrollo inicial de éste es de tipo nuclear (primero se generan muchos núcleos y posteriormente se forman las paredes celulares), posee en la parte más externa dos capas celulares diferenciadas llamadas *aleurona* y *subaleurona*, que contienen lípidos y proteínas de reserva y producen enzimas para la germinación. Al interior de la semilla está el endospermo propiamente.

#### **3.1.4. Determinación sexual del maíz**

El origen del maíz es un tema que ha sido polémico y debatido desde hace ya mucho tiempo, estudios moleculares apoyan la idea de que el ancestro del maíz actual es la especie *Z. mays* subespecie *parviglumis* (Orr y Sundberg, 1994); sin



embargo, poco se ha averiguado acerca del monoicismo del maíz. En un inicio se creyó que el ancestro ya poseía esta característica, pero ahora se ha planteado la posibilidad de una feminización de la espiga masculina.

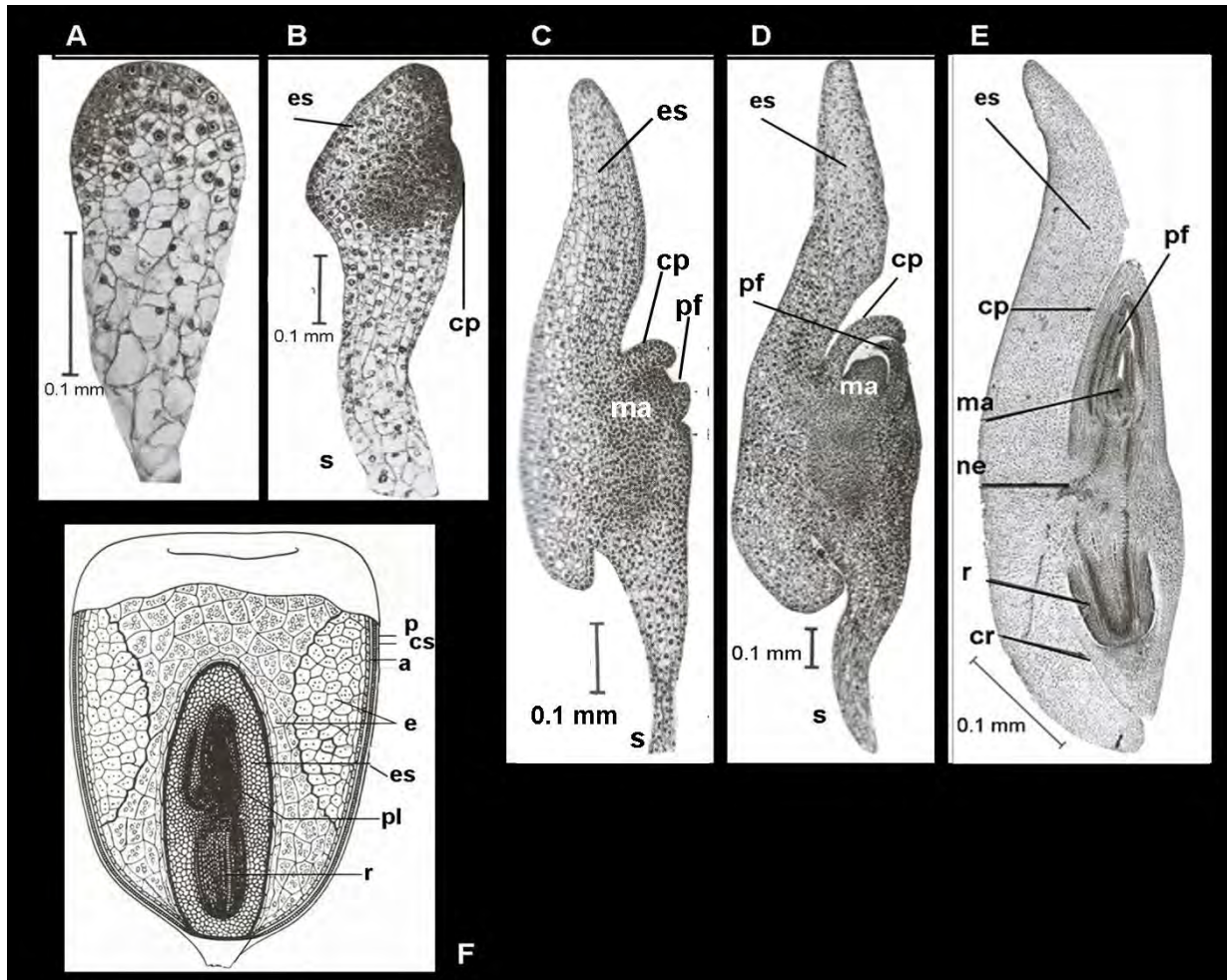


Figura 3. **A.** Embrión a los pocos días después de la fecundación. **B.** Embrión a los 5 días de la fecundación, se observan las protuberancias que serán el escutelo y el coleoptilo. **C y D.** El escutelo toma forma y comienza a desarrollarse el primer primordio foliar, el suspensor degenera. **E.** Embrión maduro con todos sus órganos bien formados. **F.** Fruto maduro en un corte longitudinal mostrando todas las partes que lo conforman. es: escutelo, cp: coleoptilo, s: suspensor, pf: primordio foliar, ma: meristemo apical del tallo, ne: nodo escutelar, r: radícula, cr: coleorriza, p: pericarpio, cs: cubierta seminal, a: aleurona, e: endospermo, pl: plúmula Figuras A – E Tomadas de: Esau, 1977, Figura F Tomada de: Johri, 1984.

La determinación sexual del maíz es un proceso complejo, en este caso las flores inicialmente bisexuales en ambas inflorescencias llegan a ser unisexuales por medio del arresto del desarrollo de los órganos sexuales, los estambres para el caso de las flores pistiladas y el pistilo en el caso las flores estaminadas. Este arresto



puede darse durante diferentes etapas de la maduración, al inicio del desarrollo se tiene un meristemo floral con las características bisexuales, es decir, con primordios de los dos verticilos reproductores, en estas primeras etapas ambos primordios son visibles tanto en las inflorescencias femeninas como en las masculinas (Figura 4). La transición a la unisexualidad genera cambios morfológicos que dan como resultado flores femeninas por un lado y masculinas por otro. En la inflorescencia masculina las células del gineceo comienzan a ser altamente vacuoladas y eventualmente degeneran y continúa la maduración de los estambres, igualmente ocurre en la flor sésil femenina, mientras que en la pedicelada ambas partes degeneran (Dellaporta y Calderon-Urrea, 1994).

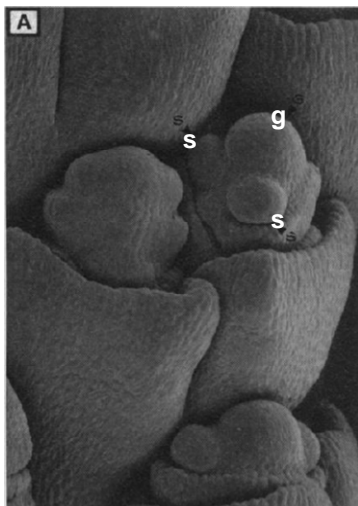


Figura 4. Par de espigas en la etapa bisexual mostrando los primordios de estambres (S) y del gineceo en el centro (G), MEB. Tomada de Dellaporta y Calderon-Urrea, 1994.

Este aborto de órganos florales está dado por mutaciones. Para la inhibición del gineceo se requieren genes *masculinizantes* y para la del androceo se requieren de genes *feminizantes*, Se tienen algunos reportes acerca de los genes involucrados, uno de ellos implica a los genes *tassel/seed2* y *gynomonoecious sex form1* que participan en la atrofia del pistilo en ambas inflorescencias, masculina y femenina respectivamente (Dadong *et al.*, 1997). Otros, como el gen *dwarf* está implicado en el aborto de los estambres, bloqueando pasos importantes en la biosíntesis de las giberelinas, hormonas vegetales similares a los esteroides que tienen un rol en el aborto de estambres y la feminización de tejidos (Dellaporta y Calderon-Urrea, 1994).

### 3.1.5. Clasificación

Las especies de maíz se han agrupado por lo general en razas (entendiendo raza como un grupo de individuos con las características suficientes en común para permitir su organización como grupo), teniendo muchas dificultades por la gran variabilidad que existe entre especies naturales y las especies cultivadas, por lo cual se encuentran infinidad de clasificaciones (Anderson y Cutler, 1942).

Una de las clasificaciones, de acuerdo a Doebley e Iltis (1980) divide al género *Zea* en seis taxa distintos clasificados en cuatro especies: 1) *Z. mays* L. *sensu lato* que incluye *Z. mays* ssp. *mays*, *Z. mays* ssp. *mexicana* y *Z. mays* ssp. *parviglumis*, (presentes en México y el oeste central de Guatemala); 2) *Z. luxurians* (presente en el sur de Guatemala y Honduras); 3) *Z. perennis* (teocinte tetraploide y perenne del sur del estado de Jalisco) y 4) *Z. diploperenis* (teocinte perenne y diploide ubicada en el sur del estado de Jalisco en México). Estos mismos autores proponen una subdivisión en las secciones *Zea* y *Luxuriantes* a partir de los cuales han observado una gran relación entre las especies del género *Zea* y parientes, especies del género *Tripsacum*.

El género *Tripsacum* pertenece, al igual que *Zea mays*, a la familia Poaceae, contiene 16 especies y ha sido objeto de estudio en numerosas investigaciones gracias a su complejo agámico (sus especies varían desde diploides hasta hexaploides). La mayoría de las especies de este género se encuentran en México, y se consideran un acervo secundario de genes para el maíz por estar estrechamente relacionados, por lo que las especies de este género representan una fuente importante de genes que le den al maíz ciertas características (Leblanc *et al.*, 1995).

La apomixis es la característica principal de las especies del género *Tripsacum*, de lo cual se tienen reportes desde hace 40 años aproximadamente.

### **3.2. Apomixis**

La apomixis es un proceso que se presenta de manera natural en algunas especies de plantas, de las cuales las familias más comunes son Poaceae, Rosaceae y Asteraceae (Spielman *et al.*, 2003). También se le conoce por el término agamosperma (Richards, 1997) y es un tipo de reproducción asexual. Anteriormente este término incluía a cualquier tipo de reproducción asexual, incluyendo a la propagación vegetativa; sin embargo, hoy el término es más estricto y se refiere a la reproducción asexual que asemeja eventos de la reproducción sexual, que se da en el óvulo y que genera semillas fértiles sin la necesidad de una fecundación o incluso de una meiosis. Las características de un embrión apomíctico son que se deriva de células de tejidos del óvulo materno y por lo tanto tiene los mismos genes que la madre de la que proviene y es capaz de generar progenie que serán clones de la planta madre (Koltunow, 1993). Éste fenómeno se ha estudiado en más de 400 taxa de plantas, incluyendo más de 40 familias representativas entre las que se encuentra la familia Poaceae (Bicknell y Koltunow, 2004).

#### **3.2.1. Tipos de apomixis**

De acuerdo con Asker y Jerling (1992), la apomixis se divide en diferentes procesos básicos que son tres, la diplosporia, la aposporia y la embrionía adventicia. Los dos primeros mecanismos se clasifican como apomixis gametofítica ya que se presentan dentro de un saco embrionario no reducido e involucran la apomeiosis

(Spielman *et al.*, 2003), es decir que evitan la meiosis o no la completan. La embrionía adventicia en cambio se clasifica como apomixis esporofítica, ya que el embrión surge a partir de una célula externa al saco embrionario, es decir, una célula somática del óvulo del esporofito o planta madre (Bicknell y Koltunow, 2004).

*Diplosporia.* La diplosporia se da en etapas tempranas, cuando la megaspora ya está diferenciada, forma un gametofito (saco embrionario) sin reducción del material genético. Puede ser de tipo meiótica (la célula madre de la megaspora comienza la meiosis pero ésta se detiene para seguir con la mitosis para la formación del saco embrionario) o mitótica (no hay ningún evento de meiosis y directamente se pasa a la mitosis para formar el saco embrionario); una vez formado el saco embrionario las células que lo conforman actúan de manera equivalente a las de un saco embrionario reducido o "sexual". En la diplosporia se puede presentar una formación de endospermo de manera autónoma por parte de los núcleos polares, o puede haber fecundación únicamente de los núcleos polares para la formación de endospermo pero sin fecundar a la ovocélula por medio de una fusión selectiva, a lo que se llama pseudogamia (Koltunow, 1993).

*Aposporia.* Este fenómeno se da también en etapas tempranas del desarrollo, antes de la formación de la megaspora funcional. También forma un gametofito sin reducción meiótica el cuál proviene de células de la nucela, llamadas *iniciales apospóricas*, una vez formado el saco, una de las células en su interior comienza el desarrollo del embrión apospórico. Puede haber formación de endospermo, pero es un fenómeno raro. A diferencia de la diplosporia, pueden coexistir embriones provenientes de una fecundación y apospóricos a la vez y en diferentes sacos embrionarios, pero si la aposporia comienza antes de que haya una fecundación es

probable que el embrión cigótico degenera como se da en la mayoría de los casos (Koltunow, 1993).

*Embrionía adventicia.* En este caso, el embrión se forma a partir de tejidos somáticos como la nucela (más común) o del tegumento interno. Comienza en etapas tardías del desarrollo y los embriones no poseen un saco embrionario individual, los embriones nucelares surgen de células de la nucela cercanas al saco embrionario, al crecer lo hacen dentro del saco embrionario perteneciente al embrión cigótico y el producto final es una semilla poliembriónica (Koltunow, 1993). De los géneros más estudiados con embrionía adventicia es el género *Citrus* (Koltunow, 1993).

La apomixis puede darse de manera obligada cuando se evita la reducción del material genético por meiosis y la fusión sexual, o facultativa cuando coexisten los procesos sexuales y apomícticos y se obtiene una progenie variable genéticamente (Koltunow, 1993). Cuando hay una apomixis facultativa se tienen cuatro clases de progenie diferentes, sobre todo en plantas apomícticas que requieren de una fecundación para iniciar el desarrollo del endospermo o pseudogamia (Koltunow, 1993), aunque también en plantas que forman el endospermo de manera autónoma. Dos de estas clases de progenie son genéticamente iguales a la planta madre y vienen de una reproducción apomíctica o de una semilla híbrida proveniente de una reproducción sexual. Las otras dos clases que son menos frecuentes provienen de una convergencia entre la vía sexual y la apomíctica coexistiendo en el mismo óvulo. En el tercer caso se tienen embriones con altas ploidías ya que provienen de una fecundación de un saco embrionario no reducido, en el cuarto caso se tienen embriones poli-haploides (ploidía reducida), ya que se derivan de un desarrollo autónomo de una ovocélula reducida, ambos casos pueden estar dados por genes

que pueden o no tener que ver con la apomixis y por señales maternas que activen el desarrollo embrionario en células reducidas o no reducidas, fecundadas o no fecundadas (Koltunow y Grossniklaus, 2003).

La presencia de la apomeiosis y la formación de embriones por partenogénesis en la apomixis implican cambios en los patrones de reproducción sexual y por lo tanto los cambios se generan por modificaciones genéticas (Spielman *et al.*, 2003).

Una teoría sobre el control genético de la apomixis propone que es regulada por un balance delicado de genes dominantes o codominantes que son modificados dependiendo de las cruzas que permiten la formación de embriones en la ausencia de meiosis y fecundación. Es probable que una vez que han actuado los genes apomícticos, los genes que controlan la formación y patrones de desarrollo del embrión sean los mismos que los que se requieren en la reproducción de tipo sexual y que las proteínas producto de los genes apomícticos sean similares a las de la reproducción sexual, pero alteran su actividad espacial o temporalmente. Por lo tanto algunos autores aseguran que los patrones de desarrollo entre un evento u otro son muy similares (Albertini *et al.*, 2005). Algunos estudios en *Arabidopsis thaliana* han resultado en la identificación de genes importantes para el entendimiento de ambas vías, algunos ejemplos son el *SPL* y *NZZ* involucrados en la megasporogénesis, el *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase) para la adquisición de la competencia embriogénica en células somáticas y los genes que inducen la producción de embriones espontáneamente cuando se sobre expresan (*LEC1*, *LEC2*) o se reprimen (*PKL*) (Albertini *et al.*, 2005). En relación al endospermo también se han identificado tres genes (*FIS1* o *MEA*, *FIS2* y *FIS3* o *FIE*) cuyas proteínas reprimen su desarrollo en plantas con reproducción sexual en la ausencia de la

fecundación, por lo que las mutaciones que se pueden dar en ellos pueden originar el desarrollo de endospermo en ausencia de la fecundación. Lo anterior supone que las vías sexual y apomíctica difieren principalmente en la habilidad de regular elementos en común (Albertini *et al.*, 2005).

Matzk *et al.* (2005) identificó cinco genes asociados a la formación de semillas de manera asexual en *Poa pratensis*, estos genes son: el gen iniciador de la aposporia (*Ait*), el gen que previene la aposporia (*Apv*), el gen del desarrollo de la megaspora (*Mdv*), el gen iniciador de la partenogénesis (*Pit*) y el gen que previene la partenogénesis (*Ppv*). Esto implica una complejidad muy grande de genes que no tienen que ver solamente con la apomixis, sino también con fenómenos como la partenogénesis. Por otro lado Albertini *et al.* (2005) también han aislado otro tipo de genes en la misma especie, estos genes son *SERK* y *APOSTART*, cuya expresión difiere entre eventos sexuales o apomícticos específicamente en células de la nucela, afectando cascadas de señalización para los eventos de esporogénesis, gametogénesis y embriogénesis.

Se ha puesto especial atención a la introducción de la apomixis en plantas de cultivo con reproducción sexual, lo cual es considerado como reto en la agricultura biotecnológica; esto se debe a que la apomixis permitiría la fijación inmediata de cualquier genotipo favorable para la producción y una producción de híbridos que se auto-perpetúen durante las generaciones sucesivas, con beneficios sociales y económicos que pudieran igualar a los de la Revolución Verde (APO2001, 2001). Los pasos a seguir para lograr introducir la apomixis a especies de interés tendrían que ser la hibridación de la especie sexual con la apomíctica, la mutación seguida de la selección de semillas con formación autónoma de embriones en la especie sexual, la

identificación de los alelos que confieren la apomixis en la naturaleza y la construcción de estos genes para la transformación de una planta con reproducción sexual a apomíctica (Spielman *et al.*, 2003). Algunos de los avances agronómicos de la apomixis son la rápida regeneración y multiplicación de formas superiores a través de semillas nuevas, la reducción en costo y tiempo de reproducción, la evasión de complicaciones asociadas a la reproducción sexual como polinizadores y compatibilidad y la evasión de transferencias de virus en plantas que generalmente se reproducen de manera vegetativa (Bicknell y Koltunow, 2004). Sin embargo la apomixis no está bien representada dentro de las especies de plantas cultivadas.

### **3.2.2. Apomixis en maíz**

El maíz se considera una planta de importancia sobretodo comercial y cultural, ya que desde los inicios de la agricultura en Mesoamérica ha sido utilizada en el cultivo, se ha ido modificando hasta llegar a tener una gran variedad y representa uno de los pilares alimenticios más importantes para la población, especialmente en México y en países del tercer mundo, en donde el maíz hoy en día es una fuente alimenticia principal de quienes carecen de recursos económicos. Muchas investigaciones se han dedicado al mejoramiento del maíz y a incrementar los niveles de producción teniendo como objetivo mejorar el estado económico de países en desarrollo. Al ser una especie de reproducción sexual, considerada diploide con 20 cromosomas, completamente domesticada, es uno de los cultivos candidato a ser “apomixado” (Espinoza y De León, 2005). La intención de introducir una característica apomíctica al maíz es para que de manera natural el maíz pueda preservar características favorables a lo largo de muchas generaciones sin dañar por supuesto la diversidad de maíces que existen.



Desde los años 70 se tienen reportes de la presencia natural de híbridos entre el maíz y algunas de las especies de *Tripsacum*. En estos estudios se mencionan aspectos sobre la morfología (De Wet *et al.*, 1978a), citología (Stalker *et al.*, 1977) y el origen del maíz llamado en esos tiempos “tripsacoide” (De Wet *et al.*, 1978b). Se sabe también cómo se dan los procesos de apomixis en especies de *Tripsacum*. Un ejemplo de esto reportan Grimanelli *et al.* (2003), sugieren que las plantas de *Tripsacum* y los híbridos producto de cruzas entre *Tripsacum* y *Zea mays* se caracterizan por una alteración en el tiempo del desarrollo de la esporogénesis y el desarrollo temprano del embrión, no en la gametogénesis, lo cual demuestra que la iniciación precoz del desarrollo del embrión puede ocurrir de manera independiente a la reducción meiótica y por lo tanto no es una consecuencia de la ausencia de la meiosis. Otro estudio es el de Farquharson (1955) en el que menciona la presencia de la apomixis facultativa de *Tripsacum dactyloides* en un 50% de 43 colecciones, en los cuales los embriones extras se forman a partir de una sinérgida dentro del mismo saco embrionario donde coexiste el cigoto y de la ovocélula o sinérgida de un segundo saco embrionario proveniente de una segunda célula madre de la megaspora.

Algunos programas de inducción de apomixis que no han sido exitosos se han realizado en pastos de forraje como *Brachiaria* y *Panicum* debido a la complejidad de estrategias de cruzas y la inaccesibilidad del gameto femenino para generar progenie híbrida, por lo que se cree que la mejor solución sería la introducción de la apomixis en un formato inducible permitiendo su uso durante el incremento de las semillas y silenciándolo durante la hibridación, para lo cual se requiere de un conocimiento acerca de las bases genéticas de este mecanismo (Bicknell y Koltunow, 2004).

Los géneros de monocotiledóneas más estudiados en relación a la apomixis son *Panicum* en el que se han enfocado trabajos en aposporia y pseudogamia (Savidan, 1980; Chen *et al.*, 1999), así como también trabajos de Brown y Emery (1958) que estudiaron la apomixis en toda la subfamilia Panicoideae, otros géneros como *Pennisetum* y *Cenchrus* (Roche *et al.*, 1999), *Brachiaria* (Pessino *et al.*, 1997, Schranz *et al.*, 2005), *Paspalum* (Martínez *et al.*, 2001), *Potentilla nivea* (Rosaceae) (Eriksen y Fredrikson, 2000) y *Poa* (Naumova *et al.*, 1999; Albertini *et al.*, 2001 y 2005; Kellogg, 1987). En cuanto a la diplosporia uno de los géneros estudiados es *Tripsacum* (Grimanelli *et al.*, 1998; Sokolov *et al.*, 1998). En las dicotiledóneas *Arabidopsis* también ha recibido atención como planta potencial para explotar las fuentes moleculares y genéticas, esperando que todos estos esfuerzos se conviertan en avances para que la apomixis sea un mecanismo aplicable en las especies sexuales.

Uno de los proyectos actuales que tienen que ver con estudios de apomixis en el maíz, pertenece al Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT). El CIMMYT se originó como programa piloto en 1943 en México, actualmente trabaja en 100 países, formando una red de organizaciones gubernamentales, no gubernamentales, sociedades civiles e instituciones privadas. Su compromiso es mejorar el sustento en pueblos y ciudades en desarrollo. Ha surgido como respuesta al hambre y la pobreza de países en desarrollo y ya que estos problemas recaen en la agricultura y el sustento, los estudios que se han realizado en el CIMMYT se enfocan en productos cultivados como son el maíz y el trigo.

El proyecto *Apomixis* del CIMMYT intentará transferir al maíz las características apomícticas de uno de sus parientes silvestres *Tripsacum dactyloides*, gramínea silvestre, poliploide ( $2n=4x= 72$  cromosomas) que posee esta característica de forma natural y facultativa (lo cual no afectará a la diversidad de maíces silvestres y cultivados) (Espinoza y De León, 2004). La apomixis permitirá darle al maíz la capacidad de reproducirse asexualmente manteniendo el mismo genotipo que la planta madre a través de muchas generaciones. Esto se realiza por medio de retrocruzas entre híbridos provenientes de cruza entre maíz y *T. dactyloides* para lograr generar un maíz auténticamente apomíctico. Se recurre a la retrocruza como un método para el mejoramiento de caracteres cualitativos, en este caso se trata de un sistema de apareamiento endogámico que se utiliza cuando se desea incorporar un gen en la población que no lo posee, se cruza el progenitor recurrente R con el progenitor donante D, obtenida la F1 ésta se retrocruza con el progenitor R obteniéndose la retrocruza uno (RC1), ésta nuevamente se retrocruza con R obteniéndose la RC2 y así sucesivamente. Conforme procede la retrocruza se hace una doble selección del carácter determinado por el gen que se desea incorporar y del genotipo del progenitor recurrente para recobrarlo (Márquez, 1995).

Actualmente se tienen 250 000 plantas de diez ciclos de retrocruza, pero aún no se tienen resultados claros, una vez obtenida la planta de interés, se pretende que no se patente para que las personas en todos los países tengan un fácil acceso a la semilla (Página en red: CIMMYT, 2007).

Además de las cruza, en 1993 se inició un nuevo proyecto para identificar los genes de la apomixis en *T. dactyloides*, para aislarlos y así poder transferirlos. Para esto se realizó el mapeo genético y se ha encontrado un gen homólogo en el maíz

denominado *alongado*; sin embargo, hacen falta más estudios al respecto (Página en red: CIMMYT, 2007).

Entre los investigadores involucrados está Daniel Grimanelli (del IRD y del CIMMYT, México) quien ha analizado histológicamente el mecanismo apomítico en *T. dactyloides* enfocándose en la dinámica de los cromosomas y cromatina y las características del citoesqueleto durante la apomeiosis (concepto que incluye a la diplosporia y aposporia (Asker y Jerling, 1992)) observando que algunas anormalidades que ocurren durante la apomeiosis son similares a las que ocurren durante el desarrollo de mutantes de maíz (APO:2001, 2001).

La mayor parte de los programas para introducir la apomixis en el maíz no han sido exitosos y aún no se han obtenido plantas con niveles agrónomicamente aceptables de juegos de semillas (Bicknell y Koltunow, 2004). Trabajos en este sentido se han desarrollado desde los años sesenta; los más publicados son los del ARS-USDA, organismo gubernamental que logró patentes para sus "Apomictic maize" y supuestos genes que lo influyen, los investigadores Bryan Kindiger y Victor Sokolov obtuvieron el crédito como co-inventores de sus maíces apomíticos, y sus publicaciones describen la incapacidad de esos maíces apomíticos de tener un comportamiento de maíz común; por otro lado el CIMMYT en convenio con ORSTOM-IRD de Francia quienes también obtienen patentes relativas a sus hallazgos en la unión Maíz-*Tripsacum*, han señalado que la fallida recuperación de cultivos apomíticos transformados puede ser una consecuencia directa de la complejidad genética de la apomixis y su relación con la genética en el que se inserta (Espinoza y De León, 2004).

### 3.3.1. Poliembrionía

La poliembrionía es la presencia de varios embriones en una sola semilla y el proceso del cual proviene puede o no ser apomíctico, es decir que se puede dar o no en presencia de fecundación y de meiosis. De acuerdo a Lakshmanan y Ambegaokar (1984) la poliembrionía se clasifica en “simple” o “múltiple” dependiendo de la presencia de uno (simple) o más (múltiple) sacos embrionarios en el mismo óvulo y los eventos que pueden ocurrir en ambos tipos se describen en la Figura 5.

La poliembrionía puede surgir en angiospermas por cuatro maneras. 1) Poliembrionía por cleavage o división del embrión para formar más de uno, 2) por la formación de embriones a partir de células del saco embrionario diferentes a la ovocélula, 3) por el desarrollo de más de un saco embrionario dentro de un mismo óvulo derivado de la misma célula madre de la megaspora, de varias o de células de la nucela; y finalmente 4) por la activación de una célula somática o esporofítica del óvulo para formar un embrión (Bhojwani y Bhatnagar, 1974).

La poliembrionía por cleavage está representada ampliamente en las orquídeas, como es el caso de *Eulophia epidendreaea* (Bhojwani y Bhatnagar, 1974). En este tipo de poliembrionía se generan embriones a partir del cigoto y en ocasiones de su *suspensor* dentro del mismo saco embrionario, dando lugar a embriones genéticamente iguales al cigoto ( $2n$ ) (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984). La poliembrionía suspensorial es común en el género *Exocarpus* de la Familia Santalaceae, así como también *Opuntia tomentosa*, donde se forman embriones del suspensor del embrión cigótico por proliferación celular, además de embriones nucelares (Flores-Rentería, 2002).

Las sinérgidas son las células más comunes dentro del saco embrionario para formar embriones, éstas pueden ser fecundadas al igual que la ovocélula por el mismo tubo polínico; sin embargo, al no haber fecundación de los núcleos polares no hay endospermo y todo colapsa. Pueden estar implicados varios tubos polínicos que fecunden a la ovocélula, la sinérgida y a los núcleos polares y ser exitoso, como se presenta en *Aristolochia bracteata*, *Poa alpina* y *Sagittaria gramínea* (Bhojwani y Bhatnagar, 1974). También la sinérgida puede no ser fecundada y autónomamente convertirse en embrión (haploide si el saco es reducido o diploide si no lo es) pero es difícil su crecimiento por la competencia del cigoto (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984), este fenómeno se ha observado en *Argemone mexicana* y *Phaseolus vulgaris* (Bhojwani y Bhatnagar, 1974).

Los embriones que se forman de células esporofíticas ( $2n$ ) se conocen como adventicios y se forman a partir de células de la nucela y de los tegumentos. En la *poliembrionía nucelar*, las células generalmente contienen un citoplasma denso y almidón, se dividen activamente y se convierten en masas embrionarias dirigiendo su camino hacia el saco embrionario, la activación de las células puede ser autónoma o estimulada por la entrada del tubo polínico al saco o incluso por la polinización. Los géneros que se distinguen por tener *poliembrionía nucelar* son *Citrus* y *Mangifera* (Bhojwani y Bhatnagar, 1974). Estos embriones dependen de la fecundación para la formación del endospermo o la formación de endospermo autónomo (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984).

En la *poliembrionía tegumentaria* los embriones no dependen de la fecundación de la ovocélula y generalmente se detiene su desarrollo, se presenta en especies del género *Euonymus* (Bhojwani y Bhatnagar, 1974). También existe la

*poliembriónía endotelial* (epidermis interna del tegumento) que se da únicamente después de la fecundación de la ovocélula y generalmente los embriones que se producen no llegan a la madurez (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984).

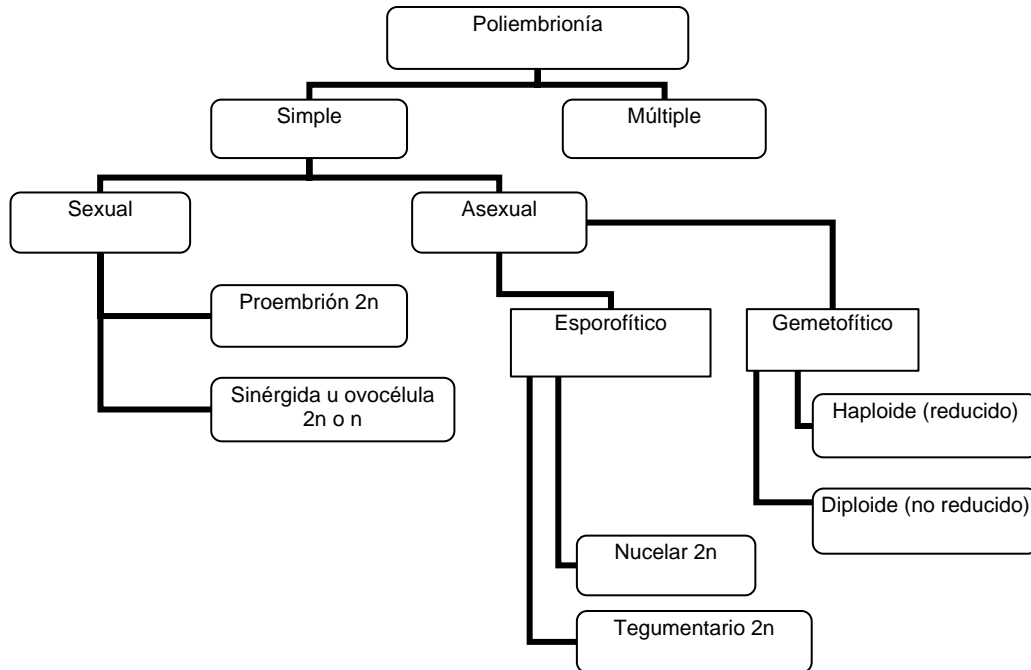


Figura 5. Diagrama de la clasificación de la poliembriónía de acuerdo a Lakshmanan y Ambegaokar (1984).

En cuanto a la ploidía se presentan entonces una variedad de casos dependiendo del fenómeno que ocurra. Existen reportes de plantas con dos o más embriones que pueden presentar las siguientes combinaciones: en el caso de dos embriones la progenie puede ser haploide-haploide, haploide-diploide, haploide-triploide, diploide-diploide y diploide-triploide; para el caso de los triples son diploide-diploide-diploide, diploide-diploide-triploide y diploide-haploide-haploide (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984).

#### **4. Justificación**

La poliembrionía es un fenómeno sumamente deseable para los cultivos de maíz, debido a que se puede obtener más de una planta por semilla, lo cual resulta favorable para el incremento en la producción de granos y en el ahorro de semilla para siembra.

Es necesario conocer el origen de este fenómeno para comprender la naturaleza biológica de la población. Un primer acercamiento embriológico permitirá conocer el origen de los brotes múltiples que se observan al germinar una semilla.

#### **5. Objetivo general**

Determinar el origen de los tallos múltiples en la población de maíz tipo UAAAN-IMM-BAP® por medio de estudios embriológicos.

#### **6. Objetivos particulares**

- Realizar el estudio descriptivo de la estructura de las flores femeninas en antesis.
- Describir los procesos de embriogénesis durante las primeras etapas del desarrollo.
- Describir la anatomía y morfología de los embriones maduros.



## **7. Material y Método**

### ***7.1. Material vegetal***

El material biológico recolectado consiste en flores maduras femeninas (colectadas previo a la polinización), flores femeninas fecundadas de los días uno a seis, 11, 16 y 21 después de la polinización y semillas maduras. Este material se obtuvo a partir de colectas realizadas en dos campos experimentales de la UAAAN en donde se tuvieron siembras de la población denominada UAAAN-IMM-BAP<sup>®</sup>. Uno de ellos es el campo “Dr. Mario E., Castro Gil” ubicado en Tepalcingo, Morelos dentro de las coordenadas 18° 36' N y 98° 51' O, a una altitud de 1160 msnm, una precipitación acumulada anual promedio de 885 mm y una temperatura media anual de 24°C; el otro campo es el “Buenavista” que se encuentra en Saltillo, Coahuila, ubicado a 25° 21' N y 101° 102' O, a una altitud de 1738 msnm., con una precipitación acumulada anual promedio de 400 mm y cuya temperatura media anual es de 17°C (Dr. José Espinoza Velásquez, comunicación personal). Las muestras de los días 0, 1, 6, 11, 16 y 21 se obtuvieron del campo ubicado en Tepalcingo, las correspondientes a los días 2, 3, 4 y 5 provienen del campo experimental Buenavista en Saltillo. También se contó con 100 semillas maduras de la misma población otorgadas por el Dr. José Espinoza Velásquez de la UAAAN, producto de la cosecha de junio del año 2007 del campo experimental “Dr. Mario E., Castro Gil”.

## **7.2. Polinización**

Las polinizaciones en el campo “Dr. Mario E., Castro Gil” fueron realizadas por los estudiantes de la UAAAN (cuyos trabajos de tesis están relacionados) y por algunos campesinos contratados para agilizar la labor. La polinización se realiza únicamente entre organismos que se sabe provienen de un grano con más de un brote. Al sembrar las semillas se colocan cada una a 20 cm de distancia de la otra, y al crecer se observan ya sea uno o más tallos (Figura 6. A), eliminando para la polinización a los que poseen solamente un tallo. La polinización se realiza con los siguientes pasos:

- Cubrimiento de los jilotes<sup>2</sup> con bolsas blancas enceradas (glacines) antes del amanecer para evitar que el polen caiga sobre los estigmas. Se embolsan únicamente los jilotes con estigmas abundantes (señal de madurez y que la mayoría de las flores se encuentran receptivas), los cuales se cortan con tijeras para asegurar y tener mayores posibilidades de una fecundación y posteriormente se cubren (Figura 6. B y C).
- Cubrimiento de la espiga masculina con “bolsas de polinización” de papel Craft (Figura 6. D, E y F).
- Las espigas masculinas embolsadas se sacuden fuertemente para obtener el polen (Figura 6. G), posteriormente el polen de todas las plantas se junta en una bolsa eliminando las anteras manualmente con ayuda de una hoja verde de maíz para evitar tocar el polen con la mano (Figura 6. H).

---

<sup>2</sup> Jilote. Término agronómico que refiere a la inflorescencia femenina del maíz, antes de la fecundación.

- Cada espiga femenina se descubre rápidamente y se coloca una porción del polen sobre los estigmas (Figura 6. I) y se embolsa de nuevo hasta el final del ciclo de reproducción (Figura 6. J y K).

### **7.3. Colecta**

La colecta se realizó en 10 etapas, que han sido determinadas en función del desarrollo de los embriones que describe Kiesselbach (1980) en el maíz común y que ha sido señalada en los antecedentes del presente trabajo. Estas etapas comienzan en el día cero (etapa 0), momentos previos a la polinización. La etapa siguiente corresponde al día 1 (etapa 1), es decir, al día siguiente de la polinización en donde podríamos encontrar óvulos ya fecundados e incluso embriones de 2-4 células. Posteriormente las colectas se realizaron al día 2 (etapa 2), 3 (etapa 3), 4 (etapa 4), 5 (etapa 5), 6 (etapa 6), 10 (etapa 7), 15 (etapa 8) y 20 (etapa 9) posterior a la polinización, cuando se alcanza el desarrollo embrionario completo, dando un total de 10 etapas.

La colecta de las etapas 0, 1, 6, 7, 8 y 9 se realizó a partir del 13 de marzo del 2008 al 3 de abril del 2008 en el campo "Dr. Mario E., Castro Gil". Las etapas 2, 3, 4 y 5 fueron colectadas por el Dr. José Espinoza Velázquez del 28 al 31 de Agosto del 2008 en el campo experimental "Buenavista".

Como un apoyo al seguimiento del crecimiento y desarrollo de las plantas, así como también para determinar el tiempo de la colecta se consultó una guía de las etapas por las que pasa una planta de maíz común, siendo éstas las mismas que la población BAP<sup>®</sup> (Anexo 1, Tabla 1).

Las etapas del desarrollo se dividen en dos grupos, el grupo de etapas Vegetativas (V) y el de las etapas Reproductivas (R). Dentro del primero se encuentra la etapa Vegetativa de Emergencia (VE) (Anexo 1, Figura 1. A) a la que le siguen las etapas V3, V5, V6 (Anexo 1, Figura 1. D y B), V9, V10, V12, V15, V17, y V18 (Anexo 1, Figura 1. E1 y E2), en estas etapas los números corresponden al número de hojas que posee la planta, siendo estas etapas las más representativas. La etapa final vegetativa se denomina VT (Anexo 1, Figura 1. C y F) que corresponde a la floración masculina. Posteriormente siguen las etapas Reproductivas que varían en función de los cambios físicos que experimentan las carióspsides y de su madurez, las etapas son R1 o emergencia de estilos (Anexo 1, Figura 1. G), R2 o de ampolla (Anexo 1, Figura 1. H), R3 o lechosa, R4 o de masa, R5 o dentada (Anexo 1, Figura 1. I y J) y R6 o madurez fisiológica (las características específicas se señalan en la Tabla 1 del Anexo 1).

#### **7.4. Procesamiento de las muestras**

Las muestras colectadas fueron tratadas como se indica en el manual de López *et al.*, (2005), se fijaron en FAA durante 48 horas y se deshidrataron en etanoles graduales, durando dos horas en cada paso. Se utilizaron dos técnicas, la inclusión en Paraplast (utilizando como solvente para la infiltración Slide Brite) y en LR-White; los cortes se realizaron en micrótopo de rotación (con grosor de 7  $\mu\text{m}$  a 8  $\mu\text{m}$ ) y ultramicrótopo (con grosor de 1.5  $\mu\text{m}$ ). Las tinciones utilizadas fueron Safranina-Verde rápido y Azul de Toluidina respectivamente.

Los cortes de semillas se obtuvieron a partir de los granos otorgadas por la UAAAN, estas semillas corresponden a la población BAP<sup>®</sup> de los cultivos

experimentales pertenecientes a esta universidad. Los granos debido a su dureza se colocaron durante 3 días en agua destilada y en refrigeración (para evitar el disparo del metabolismo) con la finalidad de ablandar los tejidos, posteriormente los granos se disecaron (Figura 7. A) eliminando el pericarpio (Figura 7. B), la cubierta seminal, toda la porción de endospermo (Figura 7. C y D) y el escutelo (Figura 7. E), dejando únicamente el eje embrionario. Esto se debe a que el endospermo al poseer grandes cantidades de almidón dificulta la buena infiltración en los tejidos y por lo tanto la obtención de cortes histológicos. Una vez disecados se fijaron en FAA durante un día y se deshidrataron en etanoles graduales (desde etanol al 30% hasta etanol absoluto durando 12 horas en cada paso para ablandar y deshidratar más los tejidos), la inclusión se llevó a cabo con Slide Brite en Paraplast siguiendo la técnica de López *et al.* (2005). Los cortes se realizaron en el micrótopo de rotación con un grosor de 8  $\mu\text{m}$ , y se tiñeron con Safranina-Verde rápido.

Parte del material se procesó para su observación al Microscopio electrónico de barrido (MEB). El material se deshidrata en una serie de etanoles graduales hasta alcohol absoluto, posteriormente las muestras se desecan a punto crítico por medio de  $\text{CO}_2$  en el desecador BAL-TEC CPD 030. Se colocan las muestras en un portamuestras y se adhieren con cinta doble de carbón y se cubren con una capa de oro de 250 nm aproximadamente. Para su observación en el MEB se utilizó el modelo JSM-S30LV de la marca JEOL y las imágenes obtenidas se capturaron por medio del software ORION de la misma marca.

Algunas de los granos maduros se sembraron en cajas *petri* con una base de papel absorbente para la observación de los individuos múltiples y la toma de fotografías.

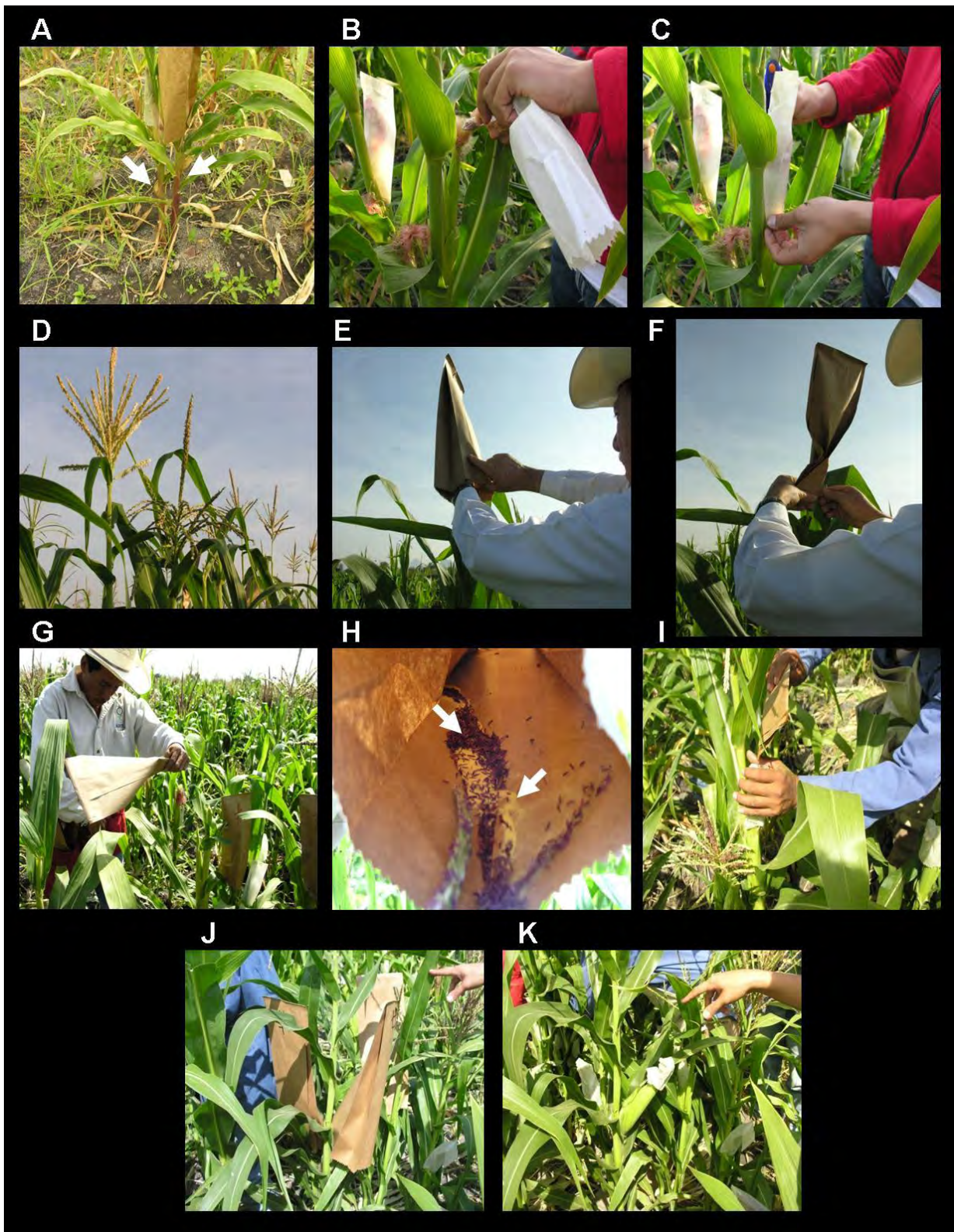


Figura 6. Polinización en campo. **A.** Plantas con más de un tallo (flechas) utilizadas para la polinización como paterna y materna. **B.** A los jilotes con estigmas abundantes se les cortan los mismos con tijeras dejando 1 cm. **C.** Ya sin los estigmas se cubren con bolsas blancas enceradas. **D.** Espiga masculina. **E y F.** La espiga masculina se envuelve con bolsas de polinización de papel Craft. **G.** Las espigas masculinas embolsadas se sacuden fuertemente para obtener el polen. **H.** El polen (flecha inferior) se junta en una bolsa eliminando manualmente las anteras en color café (flecha superior). **I.** Cada espiga femenina se descubre rápidamente y se coloca una porción del polen sobre los estigmas. **J y K.** La espiga femenina se embolsa de nuevo.



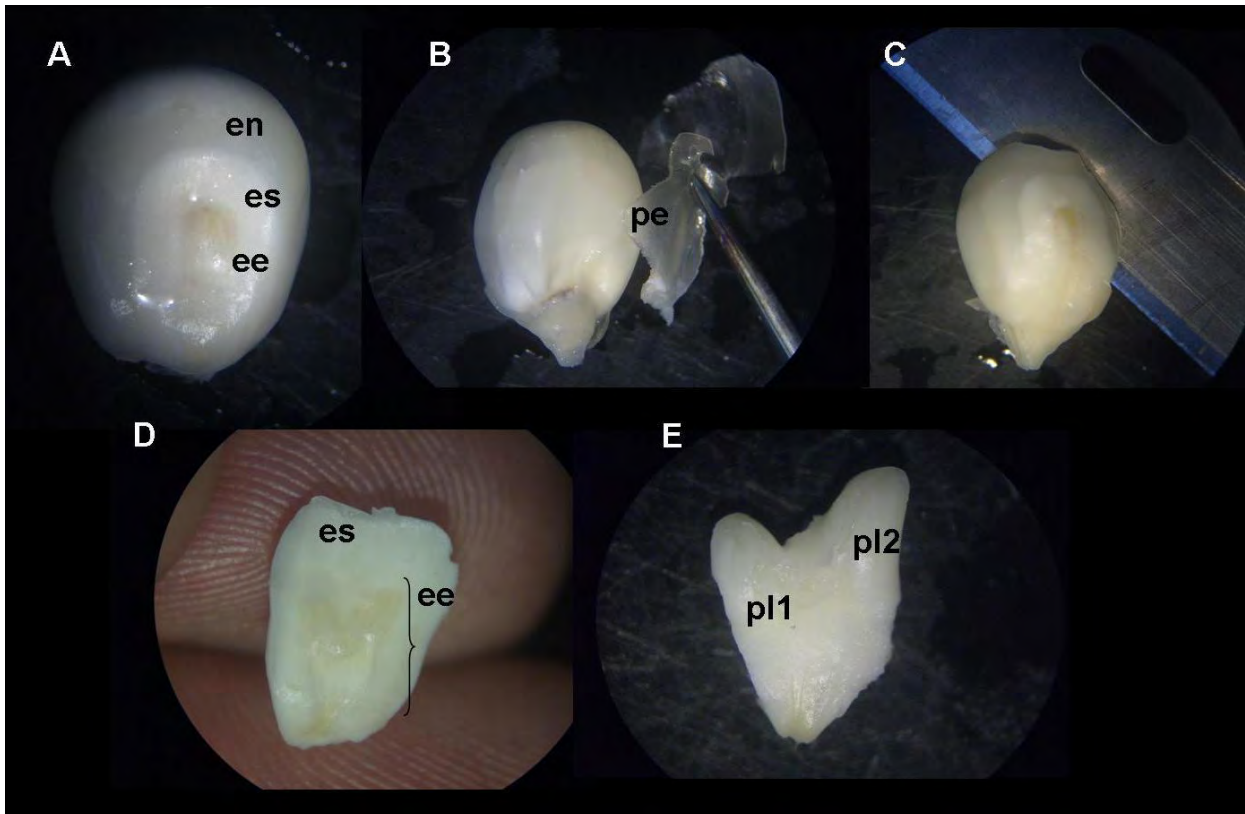


Figura 7. **A.** Cariópside o grano maduro completo, se observa la diferencia de tejidos entre el endospermo (en), el escutelo (es) y el eje embrionario (ee). **B.** Se elimina el pericarpio (pe). **C.** Eliminación del endospermo. **D.** Embrión completo, se observa el escutelo (es) y el eje embrionario (ee) mostrando dos plúmulas en un tono más oscuro. **E.** Eje embrionario con dos plúmulas (pl). Fotografías tomadas con ayuda de un microscopio estereoscópico.

## **8. Resultados**

### ***8.1. Germinación***

La germinación de las semillas muestra generalmente la presencia de múltiples brotes que emergen de una misma semilla, al igual que en los cortes, se observaron de dos a tres brotes por semilla (Figura 8. A y C). También fue observada la presencia un solo brote por semilla, ya que los brotes múltiples están presentes solo en aproximadamente el 60% de la población. Posterior a la germinación (aproximadamente tres semanas) se han observado plántulas que poseen una raíz (Figura 8. D) o varias raíces (Figura 8. B), que bien pueden ser raíces laterales (que surgen de la raíz primaria) o ser varias raíces primarias, que podrían corresponder a la presencia de múltiples plúmulas.

### ***8.2. Flores femeninas desde la etapa 0 a la 9***

Los cortes de las etapas 0 y 1, previo a la polinización y un día posterior a ella, corresponden a flores femeninas maduras, en ellos se observan las estructuras florales, como lo son el estilo (removido manualmente casi en su totalidad), la pared del ovario o carpelo y el óvulo compuesto por la nucela, tegumentos y saco embrionario (Figura 9. A y C). Los cortes de ovario en su mayoría no muestran al óvulo completo ya que la técnica de paraplast colapsa fácilmente los tejidos y porque la degradación de la nucela es prácticamente inmediata a la polinización, en el mejor de los casos se observa el tegumento interno formando al micrópilo y el saco embrionario (Figura 9. B y D); sin embargo, en las observaciones al microscopio electrónico de barrido es posible apreciarlo en su totalidad (Figura 9. C). Dentro del



saco embrionario se identificó el aparato del huevo (Figura 10. A y C) formado por dos sinérgidas y la ovocélula. Las sinérgidas en este caso poseen en su membrana plasmática y pared celular un arreglo que forma al aparato filiforme incrementando la superficie para el momento de la fecundación (Figura 10. B).

En las siguientes cinco etapas (correspondientes a los días dos a seis posteriores a la polinización) se observa el desarrollo de un embrión en fase de proembrión. Los embriones mejor diferenciados dentro del ovario se logran apreciar a partir del día cuatro después de la polinización (etapa 4) en los que comienza una diferenciación entre las células del suspensor y el embrión propio. La formación de endospermo que en su inicio es de tipo nuclear, ahora con paredes celulares, rodea al embrión abarcando sólo una fracción de la semilla (Figura 10. D y 11. A y B). Durante estas etapas la nucela se encuentra en degradación, mientras que se da la diferenciación del pericarpio dejando atrás la estructura floral transformándose en un fruto o cariósido, en el caso del estilo lo que prevalece es una cicatriz (Figura 11. C y D). En la fase de proembrión, éste cuenta con las estructuras de suspensor y embrión propio claramente diferenciadas, como se observa en el embrión en etapa 6 de la Figura 12. B. El endospermo en la parte calazal posee un cúmulo de células que podrían ser antípodas que se multiplican durante las primeras etapas del desarrollo embrionario y persisten confundiendo con el endospermo (Figura 12. A). El resto del tejido que abarca el futuro fruto o cariósido pertenece a la nucela que se encuentra en desintegración (Figura 11. C y D).

En la etapa posterior, etapa 7, el embrión ya ha pasado la fase de transición, fase en la que se forma la protodermis, ahora se encuentra en la siguiente fase, la coleoptilar. En esta fase se tiene aún suspensor y comienza la diferenciación de los

tejidos meristemáticos apicales y subapicales que darán lugar a la radícula y a los primordios foliares. En la Figura 12. C se señala la presencia de este tejido meristemático al centro del embrión teñido de un rojo intenso.

Dentro de las siguientes fases embrionarias se observa ya la aparición de las estructuras que posee el embrión en su madurez. Estas estructuras son el escutelo, el coleoptilo, la plúmula (epicótilo formado por los primordios foliares y el meristemo apical), la radícula y la cofia o coleorriza (término aplicado a maíz). En muestras procesadas para MEB en etapa 7 se observa todo lo anterior, embriones completos con la singularidad de poseer varios grupos de primordios foliares (Figura 13. A-E). Estos “juegos” de primordios foliares o múltiples plúmulas se encuentran rodeados por un solo coleoptilo, así como también comparten el resto de las estructuras, como el escutelo y la radícula. En todos los casos hay solamente un escutelo. Se han encontrado desde dos (Figura 13. A-E y Figura 15. B) a tres (Figura 14. A y B) plúmulas por embrión. Otras muestras procesadas en etapa 7 se encuentran con un menor desarrollo en fase de proembrión (Figura 12. D y E).

Conforme avanza el desarrollo embrionario a partir de la etapa 8 el embrión sigue su madurez y no se dan cambios estructurales visibles (Figura 14. C, D y E), aunque pueda haber diferenciación de tejidos; al mismo tiempo se da la maduración del fruto o “llenado del grano”, momento en el cual el endospermo abarca prácticamente todo el fruto y las capas externas como la aleurona, cubierta seminal y pericarpio terminan su transformación (Figura 15. A). Igualmente durante la etapa 9 se observa el crecimiento de los primordios foliares y la maduración de las diferentes estructuras, se siguen presentando juegos de plúmulas que comparten un solo

escutelo y coleoptilo (Figura 15. C-F), e igualmente una sola radícula como se observa en la Figura 16. A.

### **8.3. Semillas maduras**

Los cortes en semillas maduras muestran embriones con la misma conformación que en las etapas 8 y 9, la cual consta de un escutelo (que en este caso fue removido para facilitar la obtención de cortes), coleoptilo, múltiples plúmulas (de dos a tres) (Figura 16. B, C, E y F) y raíz primaria (Figura 17. A). Solamente en una de las muestras procesadas encontramos una conformación distinta, en la que se observa un embrión con escutelo, tres plúmulas rodeadas por el coleoptilo y dos raíces primarias, cada una con su cofia (Figura 16. D) y rodeadas superficialmente por otro tejido en común que bien puede ser la epidermis o parte del córtex (Figura 16. F). En los cortes transversales de semillas completas se observa la formación completa del endospermo, de la aleurona y del pericarpio (Figura 17. B y C). También se aprecia la formación de raíces adventicias antes de la germinación (Figura 17. D).

La población BAP<sup>®</sup> posee aproximadamente un 60% de poliembrionía, por lo tanto podemos encontrar semillas con una sola plúmula, es decir, un embrión con un eje embrionario común (Figura 17. B), Sin embargo, en ningún grano se observó la presencia de más de un embrión propiamente, es decir, embriones completamente aislados y separados uno de otro.

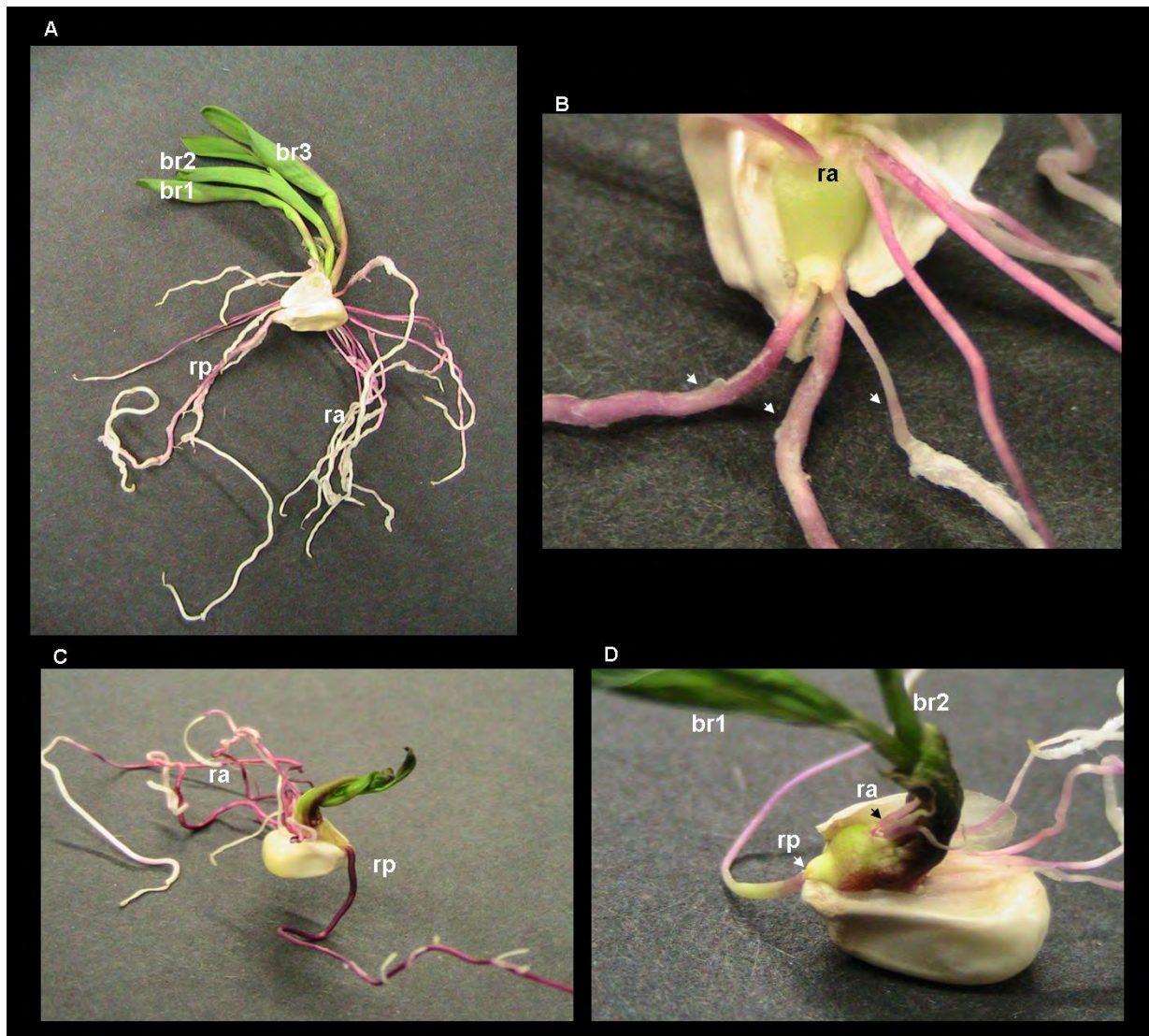


Figura 8. **A- D.** Semillas germinadas de entre tres a cuatro semanas, tamaño aproximado de las plántulas 5 cm. **A.** Una semilla de las cuales emergieron 3 brotes con varias raíces. **B.** Acercamiento a la raíz primaria y a posibles raíces laterales señaladas con flechas y raíces nodulares o adventicias. **C.** Semilla germinada con dos brotes, se observan varias raíces adventicias y una raíz primaria. **D.** Acercamiento a una semilla con dos brotes, una raíz primaria y varias raíces adventicias. Brotes (br), raíces adventicias (ra) y raíz primaria (rp).



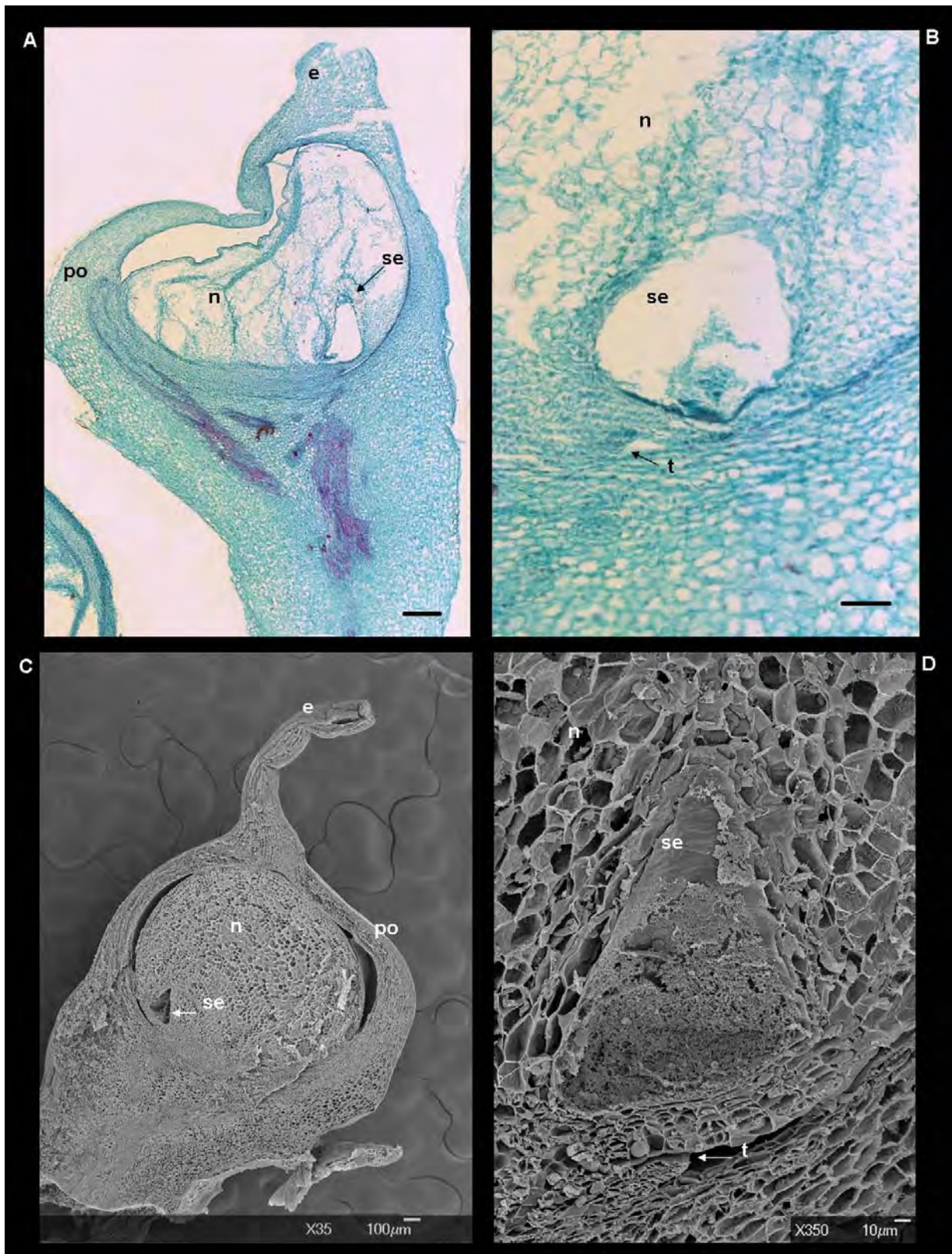


Figura 9. Fotomicrografías **A** y **B** cortes longitudinales con tinción Safranina-verde rápido en campo claro; **C** y **D** en MEB. **A.** Flor femenina en etapa 0, 10X, barra 200  $\mu\text{m}$ . **B.** Saco embrionario en etapa 0, 50X, barra 100  $\mu\text{m}$ . **C.** Flor femenina en etapa 1, 35X, barra 100  $\mu\text{m}$ . **D.** Saco embrionario en etapa 1, 350X, barra 10  $\mu\text{m}$ . Estilo (e), nucela (n), pared del ovario (po), saco embrionario (se) y tegumento (t).



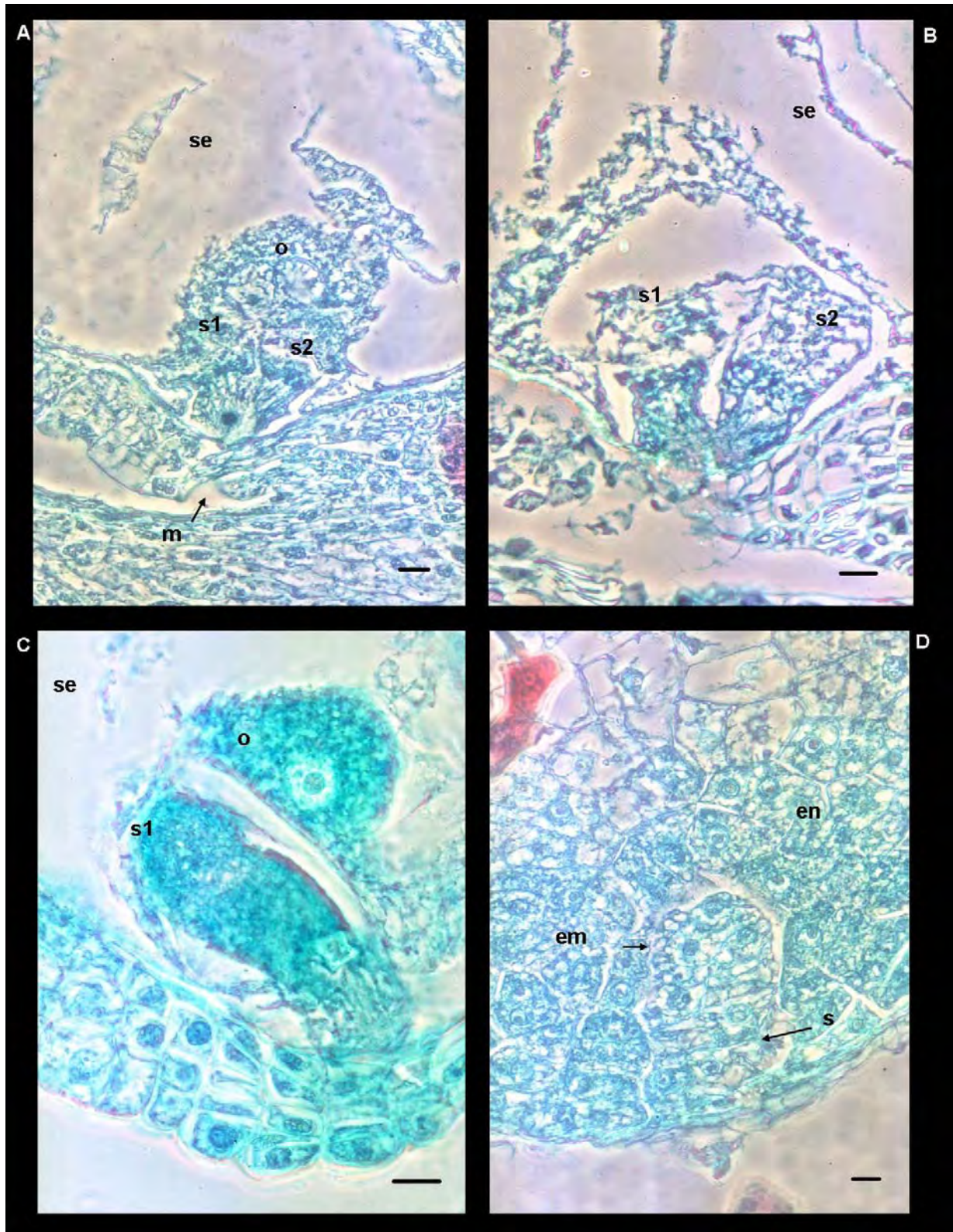


Figura 10. Fotomicrografías **A-D** cortes longitudinales con tinción Safranina-verde rápido en contraste de fases. **A.** Aparato del huevo en etapa 2, 155X, barra 10  $\mu$ m. **B.** Sinérgidas en etapa 1, 195X, barra 10  $\mu$ m. **C.** Sinérgida y ovocélula en etapa 2, 250X, barra 10  $\mu$ m. **D.** Embrión en etapa 4, 152X, barra 10  $\mu$ m. Endospermo (en), embrión (em), Micrópilo (m), ovocélula (o), saco embrionario (se), sinérgidas (s1 y s2) y suspensor (s).



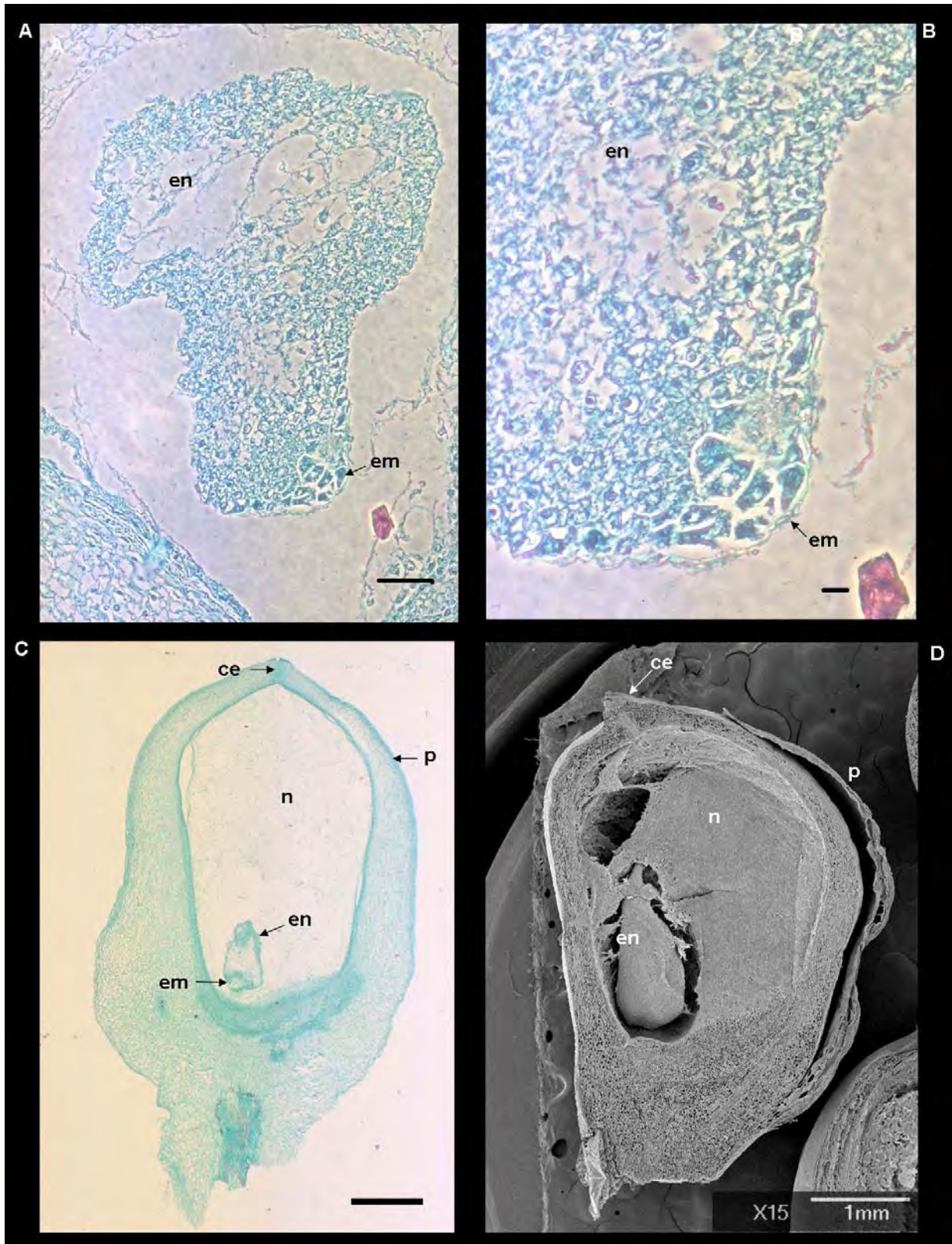


Figura 11. Fotomicrografías **A-C** cortes longitudinales con tinción en Safranina-verde rápido, **A** y **B** en contraste de fases; **C** en campo claro y **D** en MEB. **A.** Embrión y endospermo en etapa 4, 122X, barra 50  $\mu\text{m}$ . **B.** Acercamiento de embrión en etapa 4, barra 10  $\mu\text{m}$ . **C.** Cariópside en etapa 6, mostrando al embrión y endospermo en formación con nucela degradándose, 5X, barra 600  $\mu\text{m}$ . **D.** Cariópside en etapa 6 en un corte lateral para mostrar el endospermo en formación, 15X, barra 1 mm. Cicatriz estilar (ce), endospermo (en), embrión (em), nucela (n) y pericarpio (p).



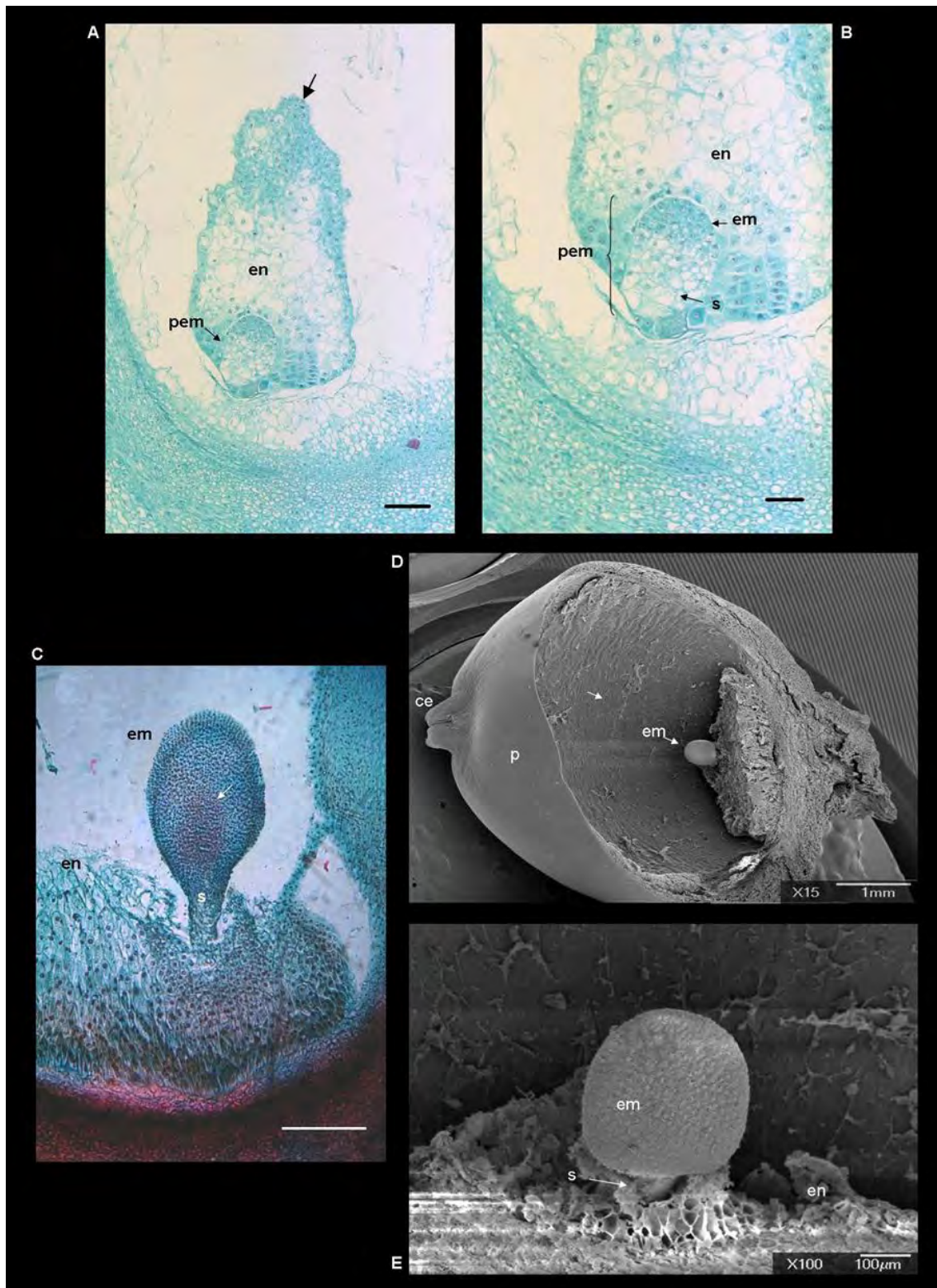


Figura 12. Fotomicrográficas **A-C** cortes longitudinales con tinción en Safranina-verde rápido en campo claro. **D-E** en MEB. **A.** Proembrión en etapa 6, endospermo con cúmulo de células que pueden ser antípodas persistentes (flecha), 25X, barra 100  $\mu$ m. **B.** Proembrión en etapa 6, se diferencian el suspensor y el embrión propio, 50X barra 50  $\mu$ m. **C.** Embrión en etapa 7 en el que se observa una zona meristémica teñida en rojo al centro (flecha), 10X, barra 500  $\mu$ m. **D.** Cariópside en etapa 7 con endospermo removido, la flecha señala los restos de la nucela y de los tegumentos, en la base se aprecia el embrión inmerso en el endospermo, 15X, barra 1 mm. **E.** Acercamiento al embrión con suspensor en etapa 7, en su base parte del endospermo removido, 100X, barra 100  $\mu$ m. Cicatriz estilar (ce), endospermo (en), embrión (em), pericarpio (p), proembrión (pem) y suspensor (s).



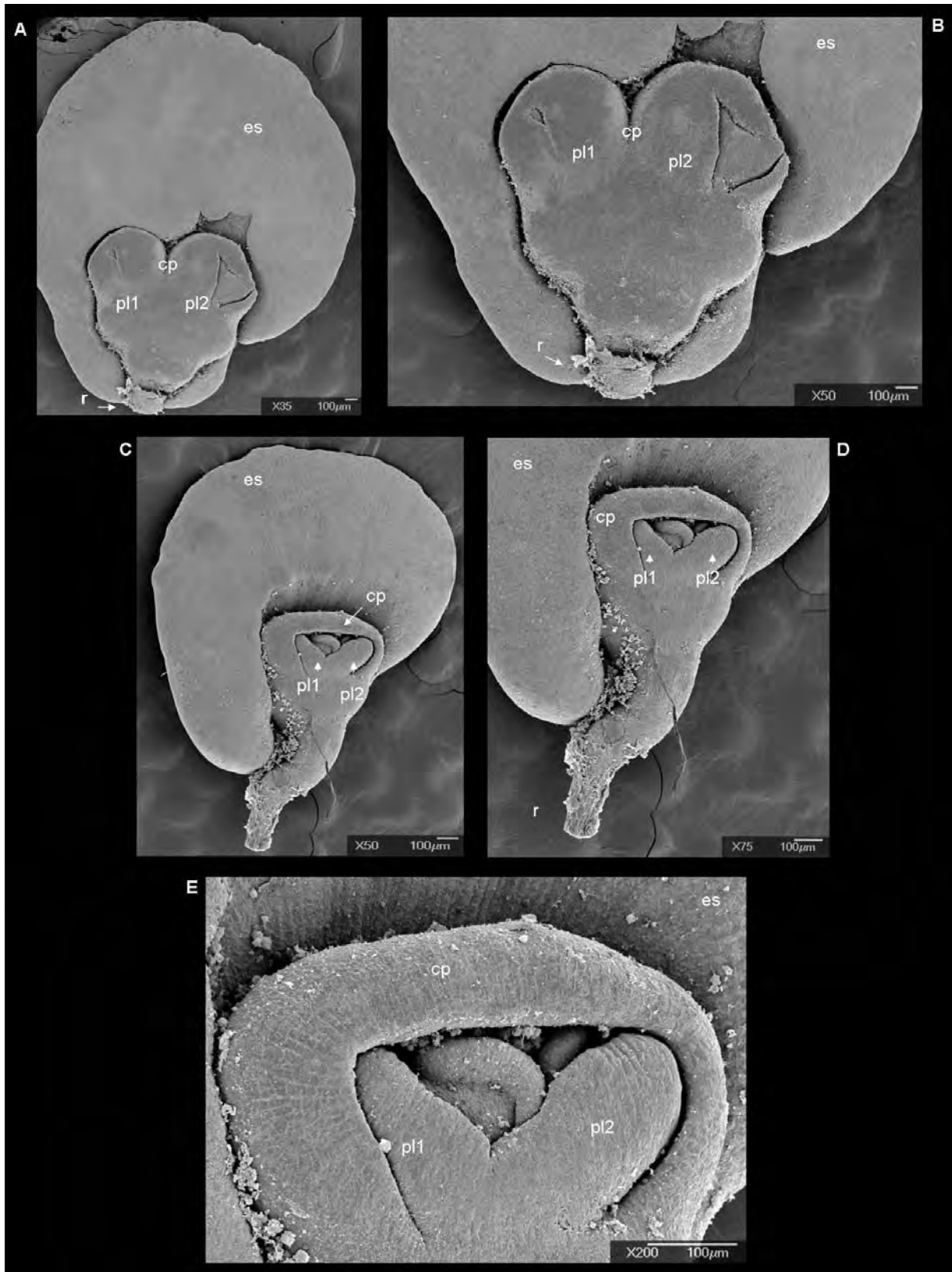


Figura 13. Fotomicrografía **A-E** en etapa 7 en MEB. **A.** Embrión mostrando dos plúmulas rodeadas por el coleoptilo, se observan las partes del embrión (escutelo, raíz, coleoptilo y plúmulas), 35X, barra 100  $\mu\text{m}$ . **B.** Embrión mostrando dos plúmulas rodeadas por el coleoptilo, 50X, barra 100  $\mu\text{m}$ . **C.** Embrión mostrando dos plúmulas rodeadas por un coleoptilo en común, 50X, barra 100  $\mu\text{m}$ . **D.** Embrión mostrando dos plúmulas rodeadas por un coleoptilo en común, 75X, barra 100  $\mu\text{m}$ . **E.** Dos plúmulas rodeadas por un coleoptilo en común, 200X, barra 100  $\mu\text{m}$ . Coleoptilo (cp), escutelo (es), plúmula (pl) y radícula (r).

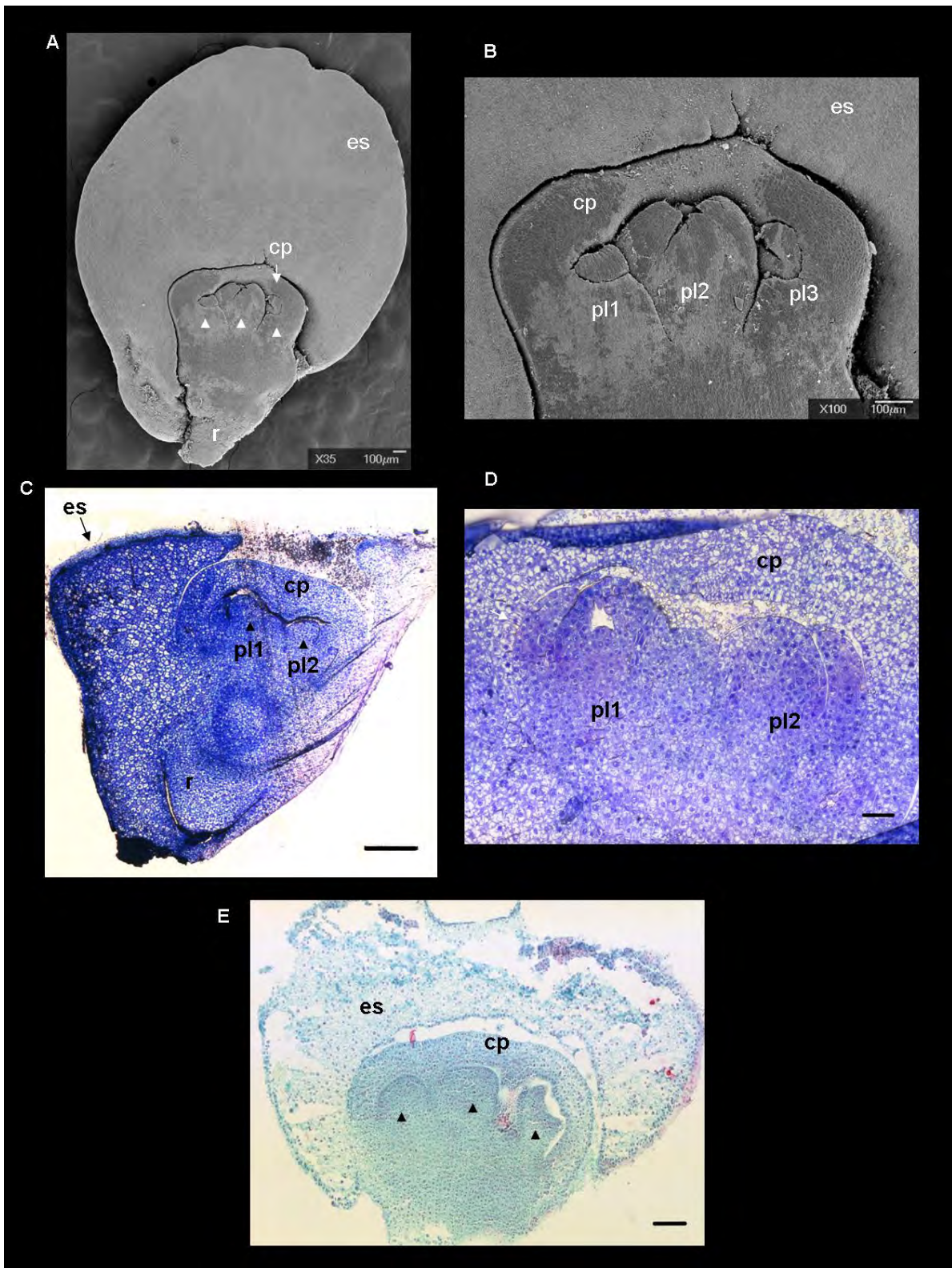


Figura 14. Fotomicrografías **A** y **B** en MEB, **C**, **D** y **E** cortes transversales en campo claro, **C** y **D** con tinción de Azul de Toluidina y **E** con tinción Safranina-verde rápido. **A** y **B** etapa 7 y **C-E** etapa 8. **A**. Embrión mostrando tres plúmulas (flechas), 35X, barra 100  $\mu$ m. **B**. Acercamiento de tres plúmulas de un embrión rodeadas por un coleoptilo en común, 100X, barra 100  $\mu$ m. **C**. Embrión, se observan la raíz, el coleoptilo, un escutelo y dos plúmulas, 15X, barra 200  $\mu$ m. **D**. Dos plúmulas formando parte de una estructura embrionaria rodeadas por el coleoptilo, 50X, barra 50  $\mu$ m. **E**. Embrión mostrando tres plúmulas (flechas) rodeadas por un coleoptilo en común, 25X, barra 100  $\mu$ m. Coleoptilo (cp), escutelo (es), plúmula (pl) y radícula (r).



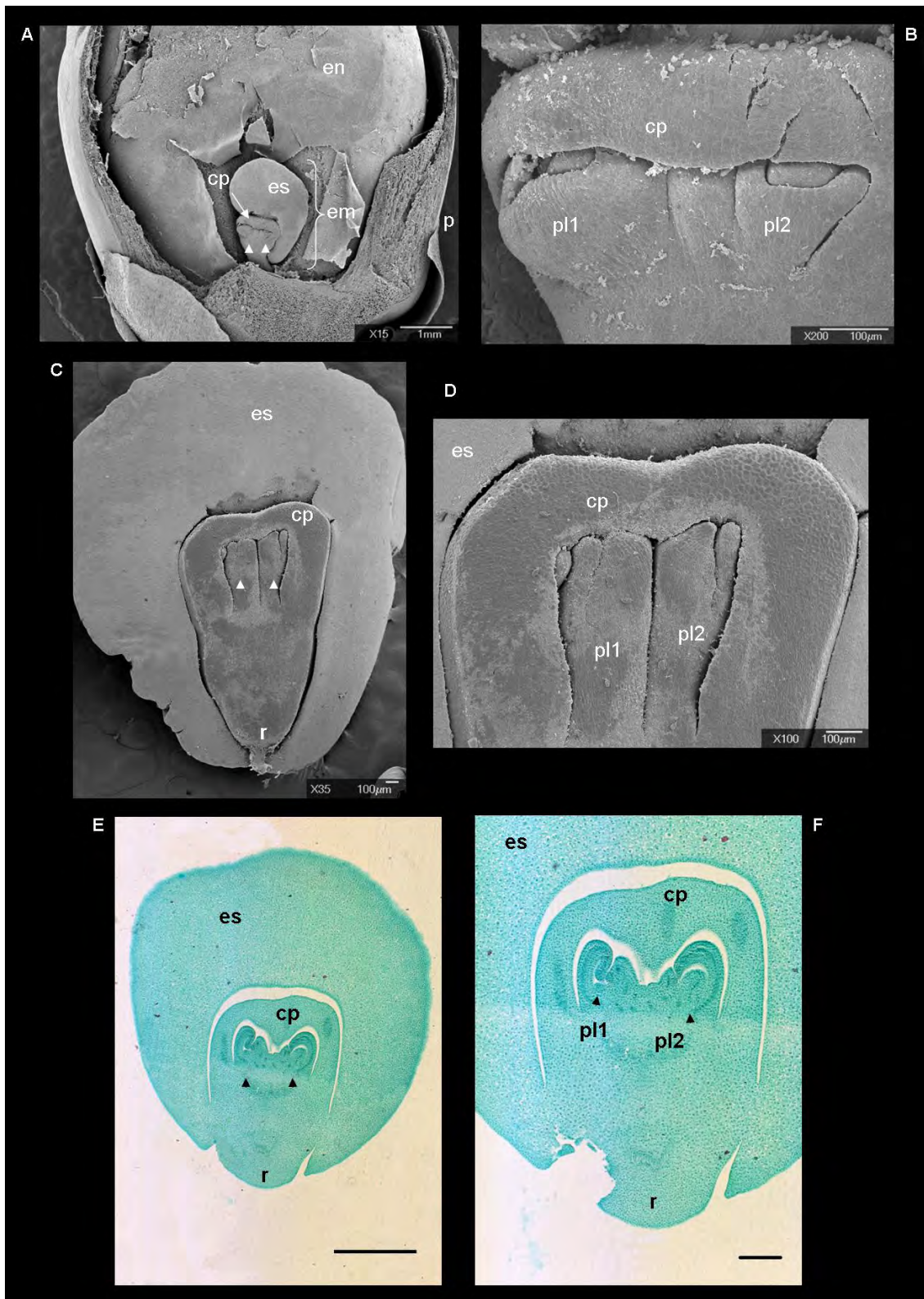


Figura 15. Fotomicrografías **A-D** en MEB, **E** y **F** cortes longitudinales en campo claro y con tinción Safranina-verde rápido. **A** y **B** en etapa 8 y **C-F** en etapa 9. **A**. Cariópside con embrión, se aprecian dos plúmulas (flechas) rodeadas por un coleoptilo, 15X, barra 1 mm. **B**. Dos plúmulas rodeadas por un solo coleoptilo, 200X, barra 100 µm. **C**. Embrión completo con dos plúmulas, 35X, barra 100 µm. **D**. Dos plúmulas rodeadas por un solo coleoptilo, 100X, barra 100 µm. **E**. Embrión completo con dos plúmulas, 7.6X, barra 657 µm. **F**. Acercamiento de embrión completo mostrando dos plúmulas y un coleoptilo, 15.2X, barra 200 µm. Coleoptilo (cp), endospermo (en), embrión (em), escutelo (es), pericarpio (p), plúmula (pl) y radícula (r).



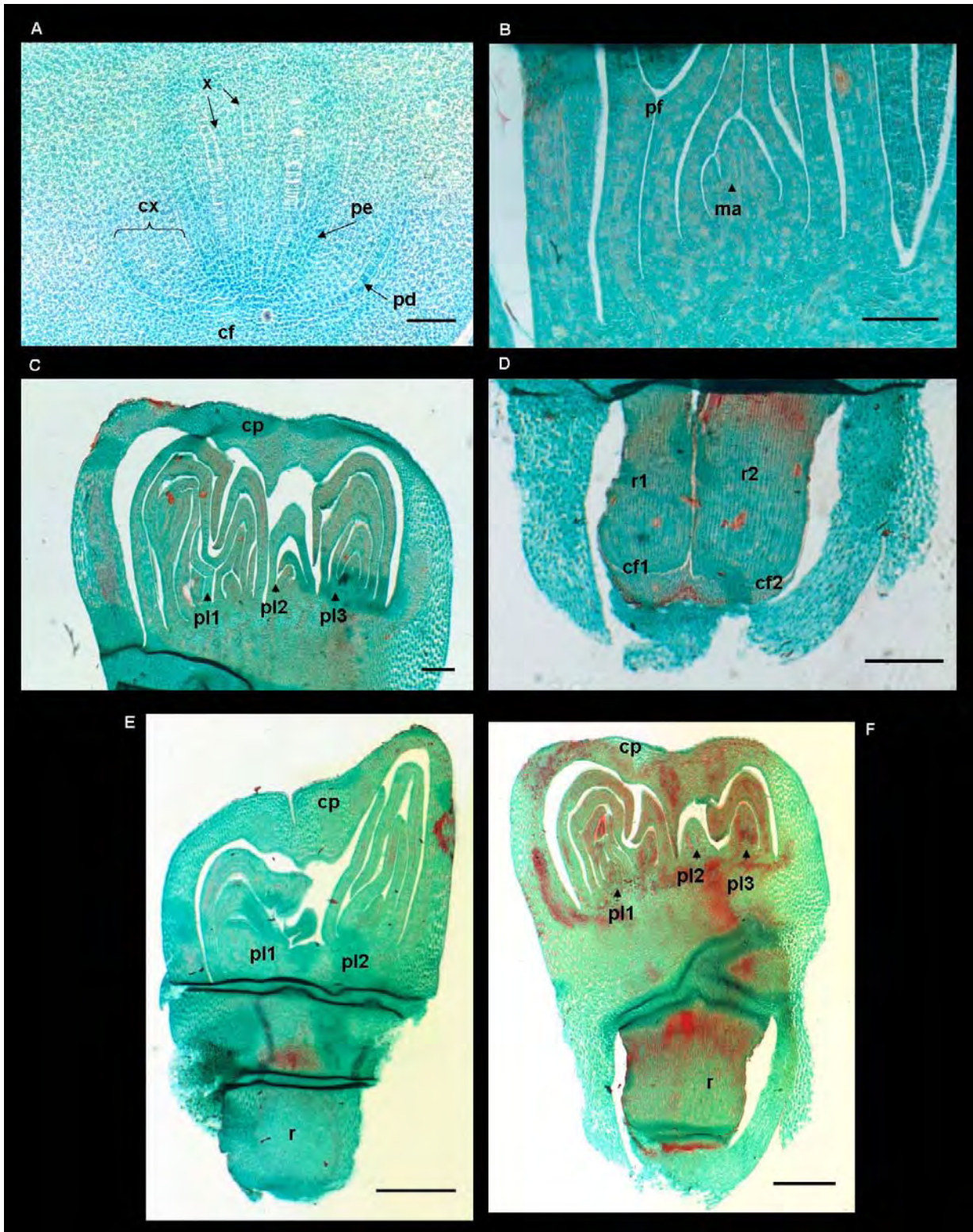


Figura 16. Fotomicrografías **A-F**, cortes longitudinales en campo claro con tinción Safranina-verde rápido. **A.** en etapa 9 y **B-F** semillas maduras. **A.** Radícula de embrión, 38X, barra 100  $\mu$ m. **B.** Acercamiento a una de las plúmulas mostrando los primordios foliares y el meristemo apical, 10X, barra 500  $\mu$ m. **C.** Epicótilo de embrión maduro con tres plúmulas, 50X, barra 40  $\mu$ m. **D.** Surgimiento de dos raíces primarias compartidas por tres plúmulas, 7.75X, barra 670  $\mu$ m. **E.** Embrión maduro, el escutelo fue removido y se aprecian dos plúmulas con un coleoptilo y la radícula, 7.5X, barra 666  $\mu$ m. **F.** Embrión maduro, el escutelo fue removido y se aprecian tres plúmulas con un coleoptilo y la radícula, 7.5X, barra 266  $\mu$ m. Cofia (cf), coleoptilo (cp), córtex (cx), meristemo apical (ma), periciclo (pe), plúmula (pl), primordio foliar (pf), protodermis (pd), radícula (r) y xilema (x).



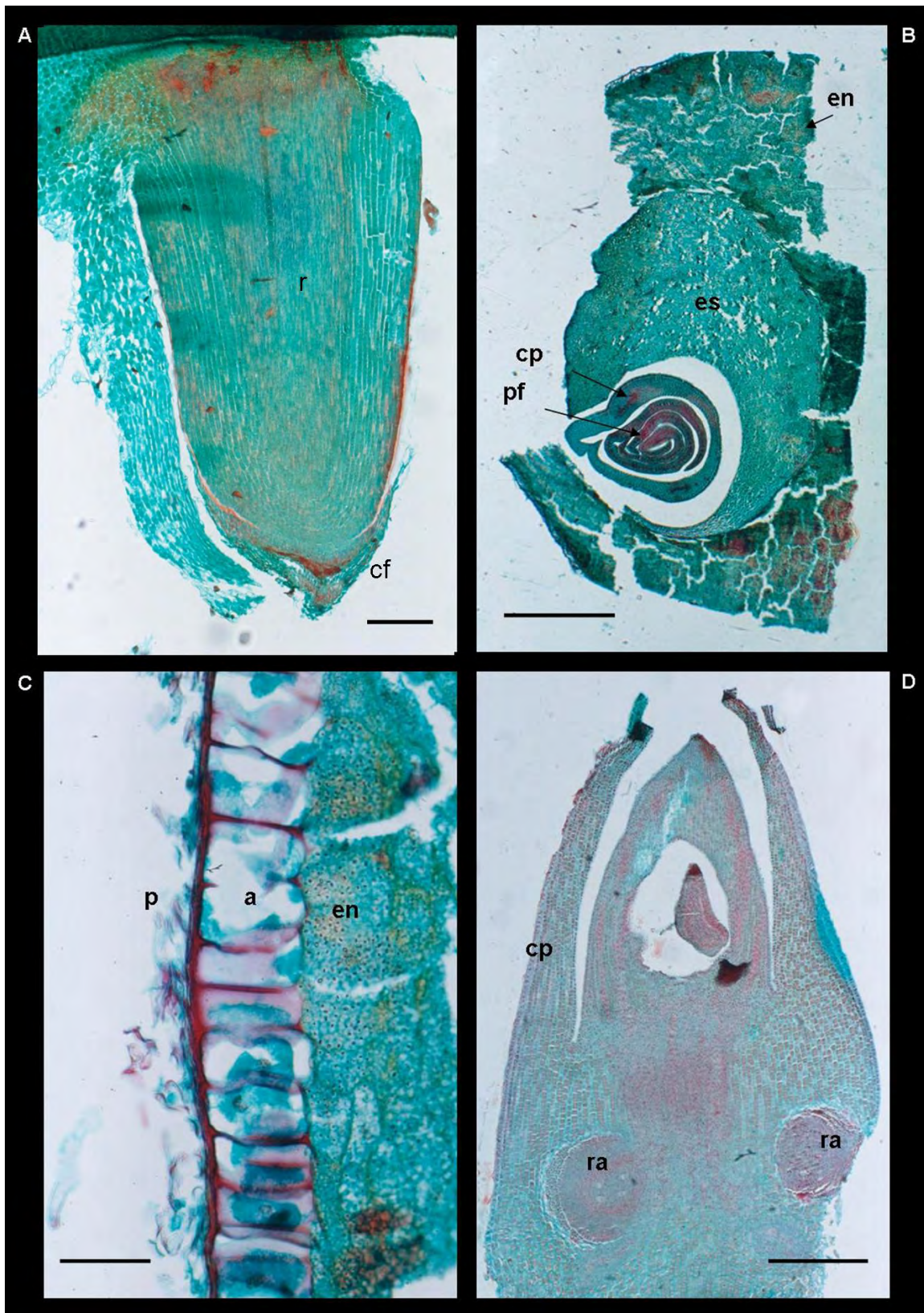


Figura 17. **A-D** Semillas maduras con tinción Safranina-verde rápido. **A** y **D** cortes longitudinales y **B-C** cortes transversales. **A**. Radícula con cofia, 12.5X, barra 240  $\mu\text{m}$ . **B**. Semilla en la que se aprecia una plúmula, incluido el endospermo y parte del pericarpio, 5.7X, barra 700  $\mu\text{m}$ . **C**. Acercamiento a la pared del fruto (pericarpio), aleurona y endospermo, 100X, barra 5  $\mu\text{m}$ . **D**. Presencia de raíces adventicias en semillas maduras con escutelo removido, 11.2X, barra 446  $\mu\text{m}$ . Aleurona (a), cofia (cf), coleoptilo (cp), endospermo (en), escutelo (es), pericarpio (p), primordio foliar (pf), radícula (r) y raíz adventicia (ra).

## 9. Discusión

El proyecto inicial en esta población de maíz BAP<sup>®</sup>, comenzó al observar en los campos experimentales el surgimiento de más de un tallo por cada semilla sembrada, cuando lo común es que de cada semilla emerja un tallo; esta condición generó el nombre del cultivar BAP<sup>®</sup>, siglas que significan braquítica de alta poliembrionía, sugiriendo la presencia de más de un embrión por grano. Se confirmó que de cada grano germinado en el laboratorio, surgen entre una y tres plántulas (Figura 8. A). Mediante el estudio de la ontogenia se determinó que en una semilla pueden existir una, dos, tres o más brotes, que comparten en su mayoría una raíz y a veces varias.

Sin embargo, hay otros casos en los que se observan sistemas radiculares que funcionan separados, estructuras embrionarias en las que se reportan coleoptilos independientes para cada una de las plúmulas y embriones completamente aislados (Espinoza Velázquez, comunicación personal). Los fenotipos<sup>3</sup> observados de las plantas a lo largo de los ciclos de siembra de la población BAP<sup>®</sup> varían. Se observan plantas con dos brotes y con fenotipos gemelos (con una frecuencia del 80% al 85%), de aquí que la mayoría de los casos observados en este estudio sean de plantas con dos brotes, ya que la muestra de este estudio embriológico consta de aproximadamente 15 embriones analizados, por lo que la probabilidad de tener plantas con dos brotes es alta. Espinoza Velázquez (comunicación personal) ha observado semillas con fenotipos de brotes triples en los que dos son fenotípicamente iguales y plantas con cuatro brotes con dos pares iguales en fenotipo entre cada

---

<sup>3</sup> El fenotipo se determina por observaciones en la altura de los brotes, el ancho y forma del tallo, la coloración de las espigas, entre otras.

planta de cada par y plantas con cinco brotes o más con diferentes combinaciones de plantas gemelas (los últimos tres casos aparecen en la población en un 10% a 15%); y finalmente casos de plantas con dos brotes fenotípicamente diferentes (menos del 5% de los casos).

En todos los casos observados hay dos regiones en el grano, separadas por el mesocótilo a partir de las cuales surgen raíces. Una región se encuentra inmediatamente debajo de la plúmula o de las primeras hojas, estas raíces son de tipo adventicias (Figura 8. B), ya que en monocotiledóneas éstas se originan del hipocótilo, de los nudos o meristemos intercalares del tallo o incluso de las raíces (Esau, 1977); y ya sea desde etapas de embrión como se observa en la Figura 17. D, plántula o planta adulta. Estas raíces corresponderán en la madurez a las raíces nodulares que son definitivas y pueden o no ser de tipo aéreas.

La otra región se aprecia en la parte subapical de la plántula, la cual corresponde al sistema radical seminal, donde surge la raíz primaria (radícula), en esta zona se observó la presencia de una raíz (Figura 8. C y D) o varias (Figura 8. B). En el sistema radical seminal (SRS) las raíces surgen de manera progresiva, siendo la primera la radícula (en etapa embrionaria) o raíz primaria (posterior a la germinación), le siguen las raíces laterales y las vellosidades y posteriormente en la base del tallo las nodulares (aéreas y subaéreas) que serán las definitivas para la planta adulta. En el caso de la presencia de varias raíces, éstas podrían ser laterales (secundarias) o ser múltiples raíces primarias. Su origen no se puede definir a simple vista ya que las raíces laterales surgen de manera endógena a partir del periciclo de la raíz primaria y pierden conexión con ella durante el desarrollo (Esau, 1985).

En relación al surgimiento de la primera raíz, en monocotiledóneas la raíz primaria muere pronto y las raíces adventicias permanecen formando el sistema radical que es de tipo fibroso o fasciculado (Flores-Vindas, 1999); sin embargo, Ritchie *et al.* (1993) menciona que en el maíz el SRS prevalece durante la planta adulta pero las raíces que intervienen en los procesos fisiológicos son las nodulares. Algunos autores como Esau (1985) consideran que la coleorriza corresponde a la raíz primaria suprimida y se sabe que durante la germinación la coleorriza atraviesa el pericarpio, pero ésta es atravesada a su vez por la radícula (Esau, 1977).

La estructura floral observada en cortes de las etapas 0 a 1 sirvió para tener un panorama amplio de la formación del fruto y por lo tanto del embrión, así como también de la posición del saco embrionario y algunas de las células que lo conforman.

La embriogénesis en maíz de acuerdo a Vernoud *et al.* (2005) se divide en tres grandes fases, durante la primera hay un patrón de desarrollo responsable de la polaridad del embrión y la posición de los órganos, durante esta fase se establece el eje apical-basal y se inicia la morfogénesis dando lugar a la formación de los órganos y a la diferenciación de los tejidos. La segunda fase corresponde a la maduración, marcada por el crecimiento del embrión y la acumulación de sustancias de reserva, y finalmente en la tercera fase, el embrión entra en latencia hasta que se den las condiciones óptimas para la germinación de la semilla.

En un sentido más amplio las etapas por las que atraviesa el embrión se muestran en el esquema de la Figura 15 tomada de Vernoud *et al.* (2005). Estas van desde cigoto, embrión bicelular, proembrión temprano y tardío, transición, coleoptilar



temprana y tardía, maduración y embrión maduro. En la Figura 15 la escala se da en días después de la polinización (DDP). Esta fue la forma en la que se manejaron las etapas en el presente trabajo. Cabe aclarar que esta escala es dependiente de las condiciones ambientales y de la genética de la especie o variedad.

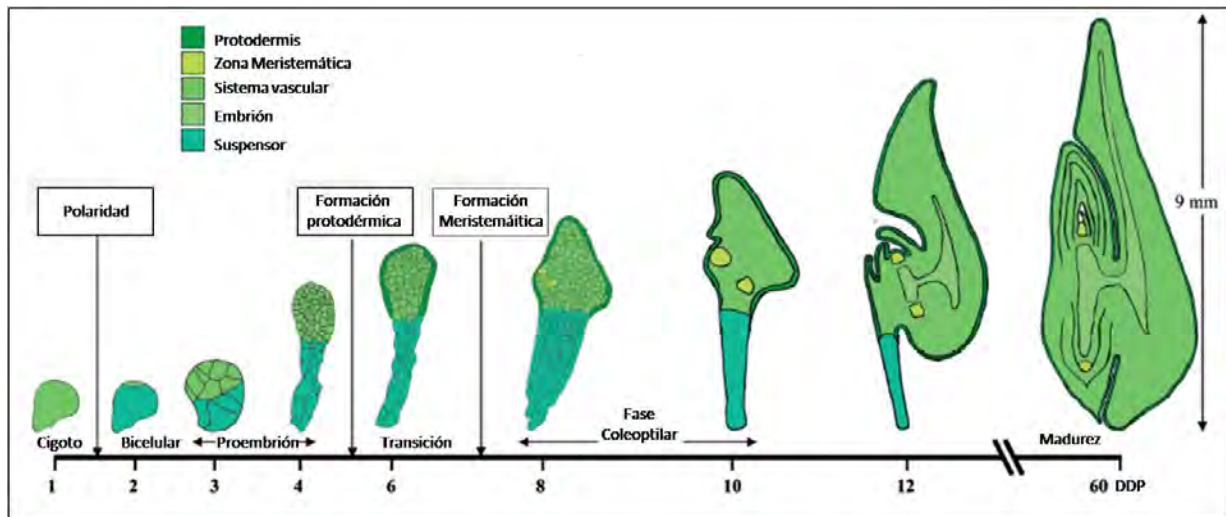


Figura 18. Esquema de la embriogénesis en maíz. Se muestran las fases de cigoto, embrión bicelular, proembrión temprano y tardío, transición, coleoptilar temprana y tardía, maduración y embrión maduro. La escala corresponde a los días transcurridos después de la polinización y la escala de tamaño se refiere únicamente al embrión maduro. Tomada de Vernoud *et al.* (2005).

En los resultados de esta tesis, el embrión en etapa 4 (Figura 10. D y 11. A y B) correspondería de acuerdo al esquema de la Figura 18 a una etapa intermedia entre un embrión bicelular y un proembrión, ya que la diferenciación entre las células del suspensor y el embrión propio no es clara. En cambio el embrión en etapa 6 (Figura 11. C y 12. B) coincide claramente con un proembrión temprano (Figura 18.). En etapa 7 se cuenta con un embrión en fase coleoptilar, en la que comienza la diferenciación de los tejidos meristemáticos tanto del ápice del tallo como de la raíz (de acuerdo a la Figura 18.), éstos involucran la diferenciación de células que se manifiesta por un decremento en tamaño, pérdida de vacuolas, incremento en el citoplasma y por lo tanto de la actividad celular. Con la tinción de Safranina-Verde rápido se aprecian en los cortes con una tinción roja intensa (Figura 12. C). Las

siguientes fases que se presentan en este trabajo corresponden a la maduración de los órganos y de los tejidos, hasta llegar a embriones maduros.

La peculiaridad que tienen como objeto de discusión las etapas 7, 8, 9 y semillas maduras es la misma, la presencia de múltiples plúmulas durante el desarrollo embrionario y la madurez y de múltiples aparatos radiculares<sup>4</sup>, observado solamente en frutos maduros y durante la germinación. Esta característica explica la observación inicial en la población de maíz UAAAN-IMM-BAP®. Durante la germinación de la semilla se da el crecimiento por separado de cada una de estas plúmulas y que se observa en su parte aérea como múltiples brotes. *Sensu stricto* un embrión de monocotiledónea está compuesto por un escutelo cuyo eje embrionario se encuentra lateralmente formado por el epicótilo y el aparato radicular (Esau, 1977). Lo que se observa en este estudio es únicamente una estructura embrionaria o embrión y no varios, cuyo eje embrionario posee uno o varios aparatos radiculares y un epicótilo con un coleoptilo y varios “juegos” de primordios foliares y un escutelo<sup>5</sup>.

La presencia de múltiples plúmulas se podría explicar por la presencia de una mutación en el área meristemática, que afecte al meristemo del tallo y al de la raíz. El efecto de la mutación podría reflejarse en la producción de múltiples zonas meristemáticas o en la diferenciación de los tejidos, provocando un fenotipo con múltiples plúmulas y raíces. Esta diferenciación y destinos celulares se da en etapas

---

<sup>4</sup> Entendiéndose por aparato radicular al conjunto de varias radículas rodeadas superficialmente por un tejido común.

<sup>5</sup> Un embrión de angiosperma está constituido por los cotiledones (hojas de reserva que van de una en monocotiledóneas llamada también escutelo, a dos en dicotiledóneas), el epicótilo (parte terminal apical del embrión formada por la plúmula y el coleoptilo y que será el futuro tallo de la planta), el hipocótilo (parte axial del embrión situado entre el o los cotiledones y el sistema radicular) y la radícula (raíz embrionaria que se desarrolla en raíz primaria) (Schmidt y Loker, 2001). En maíz de acuerdo a Carvalho y Nakagawa (1988) la conformación del embrión es la misma, cotiledon o escutelo, epicótilo, hipocótilo y sistema radicular (radícula y cofia o coleorriza), se puede considerar también al mesocótilo ubicado entre el escutelo y epicótilo.

intermedias de la embriogénesis como se ha demostrado en *Arabidopsis thaliana*, no en fase de proembrión, y ambos eventos están fuertemente influenciados por interacciones celulares y no solamente por un mecanismo de linaje celular determinado (Aida y Tasaka, 2000). Posiblemente en nuestro material esto ocurre durante las etapas 6-7 y 7-8 (de los días 6 a 11 y del 11 al 16 después de la polinización), en los que hay 5 días de diferencia y por lo que no se observó claramente el origen y el destino de las estructuras observadas.

En un estudio previo que muestra una composición de embriones similar a las de este trabajo, Chung *et al.* (2007) caracterizaron el gen *ZmSMU2* de maíz que se expresa en el embrión, en el endospermo y en el ápice del tallo. La mutante *zmsmu2*, resultado de la inserción del mutante *Mu*, tiene afectado el desarrollo meristemático, lo que ocasiona la presencia de fenotipos con múltiples ápices meristemáticos y raíces, además de estar involucrado en el procesamiento de RNA ribosomal, la biogénesis de los ribosomas y la síntesis de proteínas durante el desarrollo del endospermo. Las semillas de los mutantes muestran poca viabilidad y las plantas sobrevivientes son estériles, al contrario que las de la población BAP<sup>®</sup>, donde la germinación y la capacidad reproductiva de las plantas múltiples son normales a las plantas de maíz común. Chung *et al.* (2007), a partir de una población de mutantes *Mu* cuyos individuos fueron llamados *mto*, encontraron que el mutante *mto38* poseía una proliferación inusual en los primordios foliares y varios fenotipos a los 16 DDP, unos con dos ápices y dos raíces (Figura 19. A) y otros con un ápice y una raíz como un embrión común (Figura 19. B y C).

También en otras especies de la misma familia Poaceae hay mutaciones que dan fenotipos similares a los observados en este trabajo, tal es el caso del arroz

(*Oryza sativa* L.). En el mutante *OsCem* de esta especie se encontró un patrón alterado del eje embrionario que produce múltiples plúmulas o radículas. Estos mutantes presentan tres fenotipos: 1) embriones con múltiples ápices del tallo o varias plúmulas con una radícula en común, 2) con múltiples radículas y un ápice del tallo en común, y 3) embriones con dos plúmulas y dos radículas. Esto demuestra que ambas regiones del eje embrionario tienen potenciales similares durante su desarrollo (Yang y Hwa, 2008).

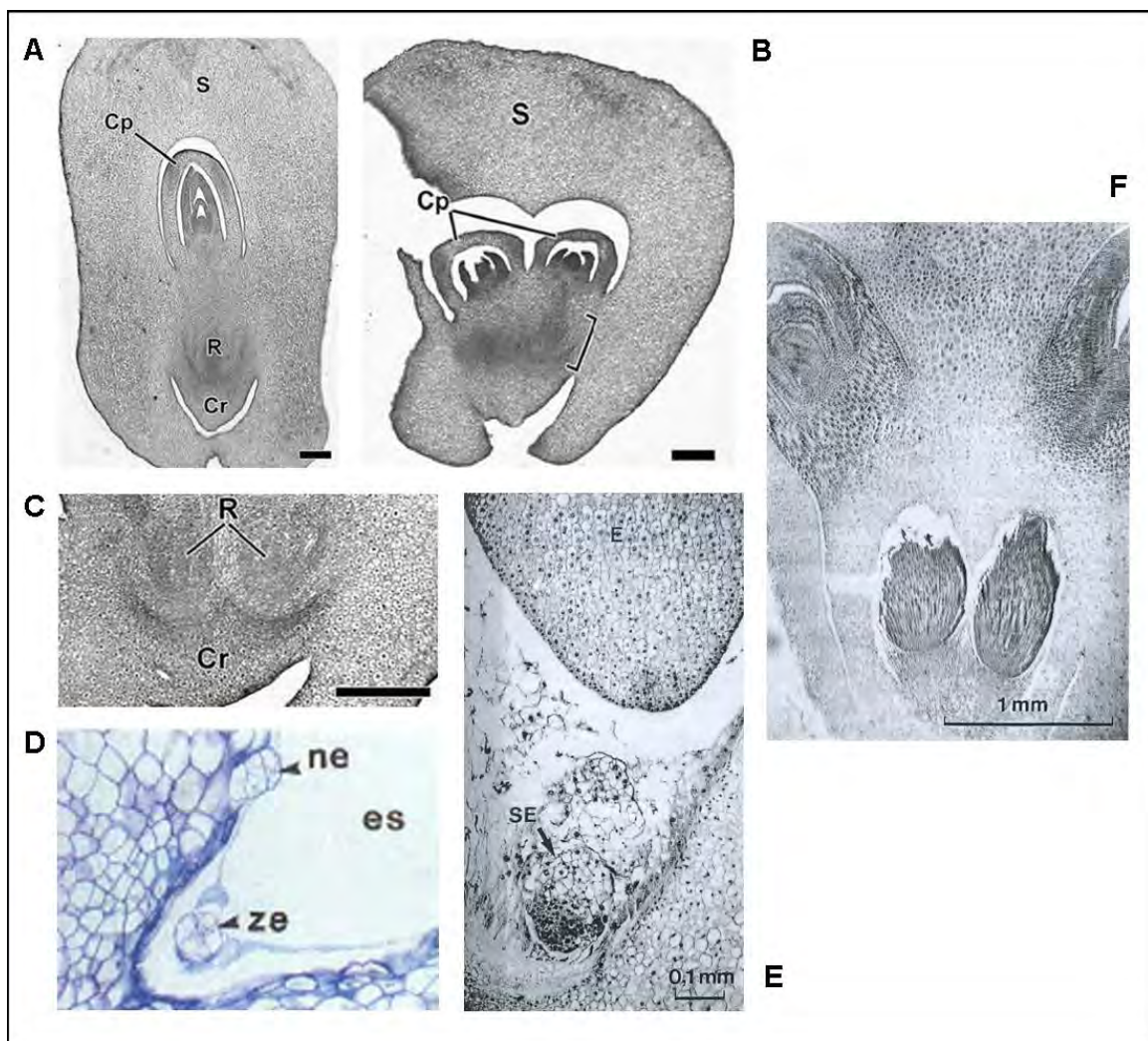


Figura 19. **A-C.** Cortes longitudinales de embriones mutantes de maíz *mto38* a los 16 DDP, barra 0.2 mm. **A.** embrión con fenotipo común. **B.** Embrión con fenotipo de dos ápices. **C.** Embrión con fenotipo de dos raíces. Figura. **D.** Corte transversal de saco embrionario fecundado de *Citrus*, se observa la formación de un embrión adventicio a partir de la nucela. **E.** Corte longitudinal de embrión formado en células del suspensor de un embrión de maíz a los 20 días DDP. **F.** Corte longitudinal de maíz mostrando poliembriónía por división espontánea. Coleoptilo (cp), coleorriza (cr), embrión cigótico (E y ze), embrión nuclear (ne), embrión suspensorial (SE), escutelo (s), raíz (r) y saco embrionario (se). A-C. Tomadas de Cheng *et al.* (2007). D. Tomado de: Koltunow, 1993. E y F. Tomadas de Erdelská y Vidovencová (1992).

En el estudio de *Oryza sativa* L. (Yang y Hwa, 2008), los análisis genéticos y el mapeo molecular utilizando microsatélites como marcadores, revelan la acción de un gen recesivo en la formación de este tipo de embriones denominados *siameses* (con fenotipos similares a las encontradas en los embriones de la población BAP<sup>®</sup>). Es posible que ese sea el caso de los embriones BAP<sup>®</sup>, y ya que se ha observado el fenómeno a nivel de plúmula y de raíz, es probable que se deba a dos loci que actúen independientemente afectando en la parte apical o en la basal del eje embrionario. Sin embargo, las proporciones de fenotipos que se observan en campo no se ajustan a un modelo clásico mendeliano de dos genes recesivos, de ser así se esperaría una proporción 9:3:3:1 en la generación F2. Nueve con fenotipo silvestre (una plúmula y una radícula), tres con fenotipo de una plúmula con varias raíces, tres con fenotipo de varias plúmulas con una radícula y un fenotipo de varias plúmulas con varias radículas. En campo e invernadero se han observado fenotipos silvestres en un 40% de la población y fenotipos con múltiples plúmulas en un 60%, de las cuales entre el 10% y el 16% desarrollan múltiples raíces (Espinoza Velázquez, comunicación personal). Lo anterior sugiere por lo tanto que hay una distorsión genética en la segregación de los alelos, siendo la interacción génica epistática la que más se ajusta a este fenómeno.

Se sugiere que el fenómeno de apomixis podría estar involucrado en la poliembriónía para el caso de la población BAP<sup>®</sup>, misma población que se estudió en esta investigación (Espinoza y de Leon, 2004). Dentro de los fenómenos apomícticos están la diplosporia, aposporia y embriónía adventicia, la posibilidad de que ocurra la diplosporia o la aposporia en este caso quedó descartada con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que en el primer caso el producto es un embrión proveniente de una reproducción asexual y no resulta en una semilla poliembriónica.

En cuanto a la aposporia deberían observarse varios sacos embrionarios, lo cual no fue observado durante el desarrollo de este estudio. En la embrionía adventicia el resultado sí es una semilla poliembriónica, ya que los embriones surgen de tejidos somáticos como la nucela o los tegumentos, estos embriones son independientes uno del otro y crecen junto al embrión cigótico dentro del mismo saco embrionario (Figura 19. D) (Koltunow y Grossniklaus, 2003), caso que tampoco fue observado en nuestro estudio. Hay reportes de embriones formados sin polinización; sin embargo, en este estudio este no fue el caso.

Retomando el caso de la poliembriónía, el término implica más de un embrión dentro de una misma semilla (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984; Bhojwani y Bhatnagar, 1974), mientras que en el caso de las semillas BAP<sup>®</sup> se observa un solo embrión pero con dos o más plúmulas o dos raíces con varias plúmulas pero formando una sola estructura; sin embargo, existe un tipo de poliembriónía descrito como poliembriónía cigótica. En este tipo de poliembriónía como describen Lakshmanan y Ambegaokar (1984), se desarrollan embriones a partir de células del cigoto, generalmente del suspensor<sup>6</sup>, pero en la mayoría de los casos el embrión cigótico es el único que llega a la madurez (Bhojwani y Bhatnagar, 1974). Algunos autores como Erdelska y Vidovencová (1992) consideran dos tipos de poliembriónía en maíz de la línea VIR17, una es llamada suspensorial, que al igual que en la cigótica que describen Lakshmanan y Ambegaokar (1984) surgen embriones de manera espontánea en células del suspensor del embrión cigótico en etapas de 20 días después de la fecundación (Figura 19. E).

---

<sup>6</sup> Existen varias clasificaciones de poliembriónía, en el caso de Bhojwani y Bhatnagar (1974) se consideran la poliembriónía cigótica y la poliembriónía suspensorial como fenómenos distintos.

El otro tipo de poliembrionía que consideran Erdelska y Vidovencová (1992) es la llamada *cleavage polyembryony*, proceso por el cual se da una división en el embrión cigótico que eventualmente da lugar a dos o más embriones. La poliembrionía por *cleavage* es una de las cuatro vías consideradas por Bhojwani y Bhatnagar (1974) para la formación de una semilla poliembrionica<sup>7</sup>. Este tipo de poliembrionía fue observada por Erdelska y Vidovencová (1992) de manera espontánea y de manera inducida con ácido 2, 4 - Diclorofenoxiacético<sup>8</sup> (2,4-D), el fenotipo final son embriones con varios coleoptilos y raíces con escutelo y suspensor en común (Figura 19. F). En este caso los autores sugieren que el número de ejes embrionarios observado (en el caso de inducción con 2,4-D al segundo día después de la polinización) depende del número de células que tenga el proembrión al momento del tratamiento y que afecta a la totipotencialidad de las células del embrión propio y no del suspensor. Sin embargo, no se reportan etapas tempranas donde se observe una clara separación de los embriones, como tampoco la hay en el presente trabajo. De igual manera no se observó la poliembrionía suspensorial en esta investigación.

En el mutante *OsCem* de *Oryza sativa* (Yang y Hwa, 2008) se sugiere también la acción de las auxinas. Los autores midieron los niveles de ácido indol - 3 - acético (IAA), un tipo de auxina natural que actúa sobre la morfogénesis del embrión en *Arabidopsis thaliana*. En el caso del mutante *OsCem*, la diferencia en los niveles de

---

<sup>7</sup> Las otras tres maneras de llegar a una poliembrionía son la formación de embriones a partir de otras células del saco embrionario diferentes a la ovocélula, el desarrollo de más de un saco embrionario en un mismo óvulo y la formación de embriones a partir de células esporofíticas del óvulo (Bhojwani y Bhatnagar, 1974); estos fenómenos coinciden con los tipos de apomixis, por lo que no hay en la literatura a la fecha un acuerdo concreto en relación a los términos poliembrionía y apomixis.

<sup>8</sup> El ácido 2,4-D es una auxina sintética que actúa principalmente como hormona de crecimiento en el ápice y yemas de la planta, interviene también modificando la expresión génica durante el desarrollo de planta (Azcón-Bieto y Talón, 2008 y Taiz y Zeiger, 2002).

IAA es significativa comparada con las plantas silvestres que poseen cantidades mucho más bajas que el mutante, sugiriendo que las auxinas juegan un papel importante en el desarrollo de la anomalía de la morfogénesis en embriones del mutante *OsCem*.

Un embrión tanto de monocotiledónea como de dicotiledónea posee un eje embrionario y uno o dos cotiledones, respectivamente. El embrión consta en un *epicótilo* situado debajo de los cotiledones y que origina a la plúmula y una porción debajo de éste llamada *hipocótilo* que origina a la radícula (Bhojwani y Bhatnagar, 1974). Para los embriones observados en este estudio se puede considerar un embrión con un eje embrionario modificado que presenta una o varias plúmulas y una o varias radículas, los cuales pueden estar formando parte de uno o varios ejes embrionarios.



## **10. Conclusiones**

1. En las semillas de la población de maíz BAP<sup>®</sup> estudiadas en esta tesis, estrictamente se observa un embrión con múltiples plúmulas que comparten al coleoptilo, un solo escutelo y una o varias raíces.

2. La posibilidad de que el fenómeno sea consecuencia de la apomíxis en esta población es nula de acuerdo a lo observado.

3. Las evidencias de este trabajo señalan que los fenotipos mutantes observados en la población BAP<sup>®</sup>, podrían ser el producto de mutaciones que no afectan el número de embriones, pero si al desarrollo de la plúmula y la raíz, provocando una embriogénesis atípica, lo que genera múltiples raíces y plúmulas. O bien como un fenómeno de poliembrionía por *cleavage* que afecta a la división de células proembrionarias haciéndolas formar varios ejes embrionarios adheridos por ciertas estructuras.

## ANEXO 1

Tabla 1. Etapas del desarrollo del maíz.

<b>Etapas</b>	<b>Características</b>
VE- etapa Vegetativa: Emergencia	- Emergencia de la plántula a los 5 días (Anexo 1, Figura 1. A).
V3	- Ápice del tallo debajo de la superficie del suelo. - Hojas y brotes de espigas femeninas han iniciado su formación.
V5	- Se completa la iniciación de las hojas y brotes de espigas femeninas, la espiga masculina se halla microscópicamente en el ápice del tallo.
V6	- Ápice y espiga masculina se hallan sobre la superficie (Anexo 1, Figura 1. D). - Espigas femeninas visibles en el tallo cercano al suelo (Anexo 1, Figura 1. B). - Pérdida de las 2 hojas inferiores.
V9	- Las espigas se forman antes de la 6° u 8° hoja, las dos superiores serán las que lleguen a la madurez. - Los internudos y las espigas femeninas superiores crecen antes que la que se encuentra debajo de ellas.
V10	- El lapso de tiempo entre cada surgimiento de hoja es de 2 a 3 días. - En esta etapa se requieren de nutrientes.
V12	- Se puede determinar el número de óvulos y el tamaño de la espiga, se establece el número de hileras pero no el de semillas (esto ocurre hasta 1 semana después de la etapa R1 o en V17). - La espiga superior es la más pequeña.
V15	- Se está a 10 o 15 días de la etapa R1 (silking). - La espiga superior supera en tamaño a las inferiores. - El lapso de tiempo entre cada surgimiento de hoja es de 1 a 2 días.
V17	- Se observa la punta tanto de la espiga masculina como de la femenina.
V18	- Los primeros estigmas no visibles surgen de las flores basales (Anexo 1, Figura 1. E1 y 2).

<p>VT- Vegetativa: <i>Tasseling</i> (ornamenta)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La última rama de la espiga masculina es completamente visible y los estigmas emergen (Anexo 1, Figura 1. C).</li> <li>- Se está a 2 o 3 días de la etapa R1.</li> <li>- El tiempo entre la etapa VT y R1 varía y se comienza la salida del polen en las mañanas y temprano en la tarde (Anexo 1, Figura 1. F).</li> </ul>
<p>Reproductiva 1- <i>Silking</i> (estigmas)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estigmas visibles fuera de la cubierta, esto toma de 2 a 3 días, creciendo de 2 a 3.8 cm por día hasta la fecundación (Anexo 1, Figura 1. G).</li> <li>- Ocurre la polinización y le toma al tubo polínico 24 hrs llegar al óvulo y realizar la fecundación.</li> <li>- Óvulo sepultado en la mazorca.</li> <li>- Embrión no visible en el fruto si se disecciona con navaja.</li> </ul>
<p>R2- <i>Blister</i> (ampollas), 10 a 14 días después de la etapa R1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Semillas blancas con forma de ampolla (Anexo 1, Figura 1. H).</li> <li>- Embrión visible, se ha formado la radícula, el coleoptilo y las hojas embrionarias.</li> <li>-Las espigas se secan y adquieren un color más oscuro influenciado por las condiciones ambientales.</li> </ul>
<p>R3- <i>Milk</i> (lechosa), 18 a 22 días después de la etapa R1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Semillas amarillentas con base lechosa por el almidón.</li> <li>- Embrión visible con una disección.</li> <li>- Estigmas cafés y secos.</li> </ul>
<p>R4- <i>Dough</i> (masa) , 24 a 28 días después de la etapa R1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La sustancia lechosa ahora tiene consistencia de pasta.</li> <li>- Hojas embrionarias formadas (5).</li> <li>- Mazorca (base) cambiante de color.</li> <li>- La punta de la semilla comienza a secarse.</li> </ul>
<p>R5- <i>Dent</i> (abolladura) , 35 a 42 días después de la etapa R1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Semillas secas, en la punta opuesta al embrión se observa una línea blanca de almidón (Anexo 1, Figura 1. I y J).</li> </ul>
<p>R6- Madurez fisiológica, 55 a 65 días después de la etapa R1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Semillas con el máximo peso seco acumulado.</li> </ul>

(Ritchie *et al.*, 1993)

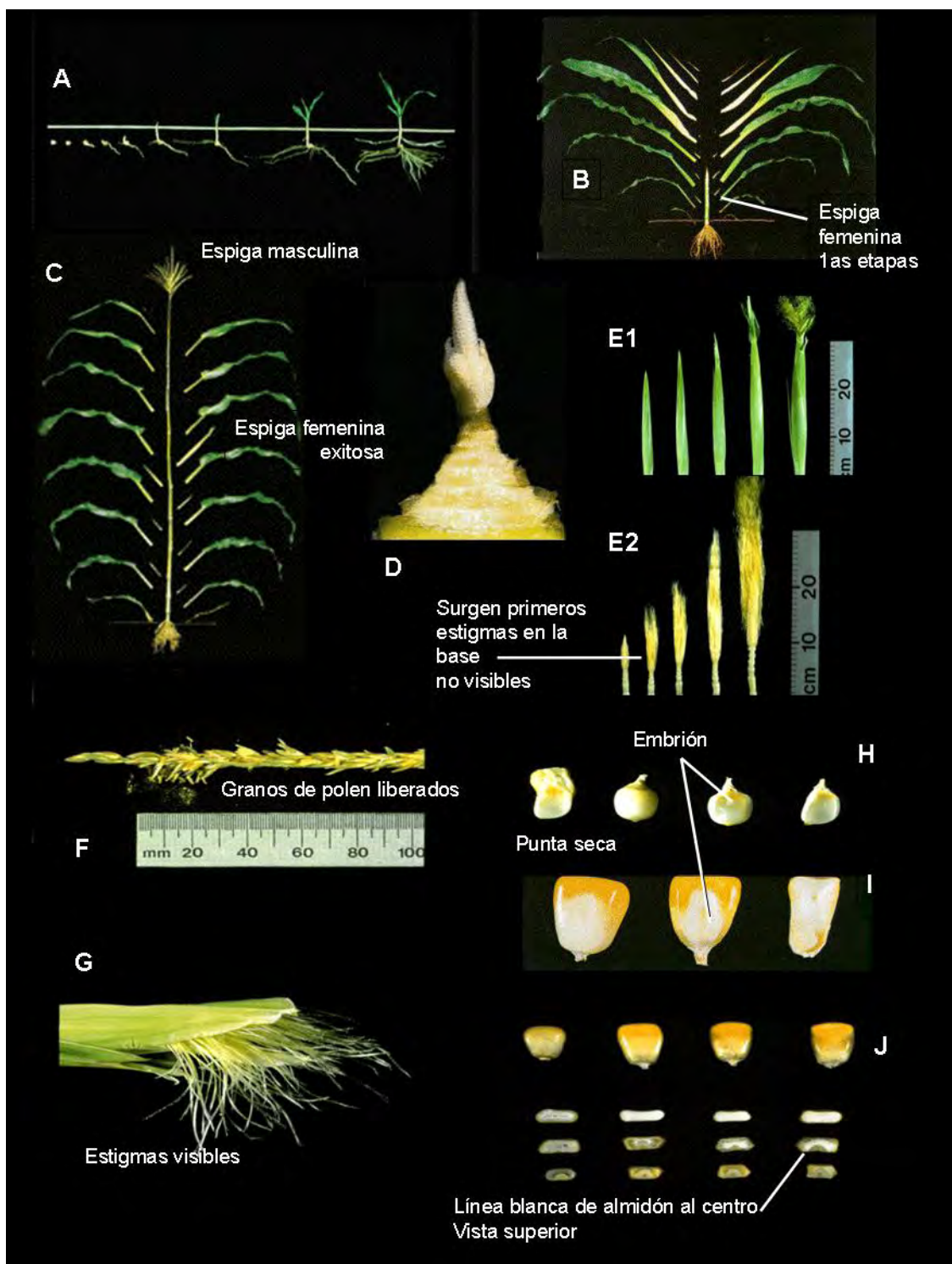


Figura 1. Imágenes que ejemplifican las características de las etapas del desarrollo de acuerdo a la Tabla 1. **A.** Emergencia de la planta. **B.** Espigas femeninas ya son visibles en la base del tallo, se encuentran ocultas por hojas envolventes, en este caso se removieron. **C.** La espiga masculina y los estigmas son visibles completamente, la espiga superior es la exitosa, las inferiores abortan. **D.** Espiga masculina desde las primeras etapas del desarrollo. **E1.** Desarrollo de la espiga femenina. **E2.** Desarrollo de la espiga femenina sin las hojas envolventes mostrando que los primeros estigmas no visibles surgen de las flores basales. **F.** Liberación del polen. **G.** Estigmas visibles fuera de la cubierta. **H.** Semillas blancas con forma de ampolla con embrión visible. **I.** Cambio en la coloración de la semilla y la punta comienza a secarse. **J.** Se puede observar en la punta una línea blanca de almidón (Ritchie *et al.*, 1993).

**Bibliografía**

Aida M. y M. Tasaka. 2000. Shoot apical meristem formation in higher plant embryogenesis. En: Mc Manus M. y Veit B. 2000. Meristematic tissues in plant growth and development. Sheffield Academic Press Ltd. E.U.A. 301 pp.

Albertini E., G. Marconi, L. Reale, G. Barcaccia, A. Porceddu, F. Ferranti y M. Falcinelli. 2005. SERK and APOSTART. Candidate Genes for Apomixis in *Poa pratensis*. Plant Physiology Preview. 15 pp. Aceptado.

Albertini E., A. Porceddu, F. Ferranti, L. Reale, G. Barcaccia, B. Romano y M. Falcinelli. 2001. Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis*: A cytological investigation. Sex. Plant Reprod. 14:213–217.

Anderson E. y H. C. Cutler. 1942. Races of *Zea mays*: I. Their Recognition and Classification. Annals of the Missouri Botanical Garden. 29(2): 69-86.

Asker S. y L. Jerling. 1992. Apomixis in Plants. CRC Press. E. U. A. 298 pp.

Azcón-Bieto J. y M. Talón. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. 2da ed. McGraw Hill. España. 651 pp.

Batygina T. B. 2006. Embryology of flowering plants. Terminology and concepts. Vol 2. Seed. Science Publishers. India. 786 pp.

Bhojwani S. y S. Bhatnagar. 1974. The embryology of angiosperms. Vikas Publishing House PVT LTD. India. 357 pp.

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

Bonnett O. T. 1954. The Inflorescences of Maize. *Science*. 120 (3107): 77-87.

Brown W. V. 1959. The Epiblast and Coleoptile of the Grass Embryo. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 86(1):13-16.

Brown W. V. 1960. The morphology of the grass embryo. *Phytomorphology*. 10: 215-223.

Brown W. V. 1965. The grass embryo: A rebuttal. *Phytomorphology*. 15: 274-223.

Brown W. V. y H. P. Emery. 1958. Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. *American Journal of Botany*. 45(4): 253-263.

Carvalho N. M. y J. Nakagawa. 1988. Semillas: Ciencia, Tecnología y Producción. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur. Uruguay. 406 pp.

Castro-Gil M. 1979. Estudio sobre herencia y valor nutritivo de semillas con doble embrión. 24-25 pp. En: Informe de Avances de Investigación, IMM, 86-87.

Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo. (CIMMYT). 2007. Página en red: [www.cimmyt.org](http://www.cimmyt.org).

Chen L., C. Miyazaki, A. Kojima, A. Saito, y T. Adachi. 1999. Isolation and characterisation of a gene expressed during early embryo sac development in an apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). J. Plant Physiol. 154:55-62.

Chung T., Cheol Soo K., Nguyen. H. N., Meeley R. B. y Larkins B. A. 2007. The maize *Zmsmu2* gene encodes a putative RNA-Splicing factor that affects protein synthesis and RNA processing during endosperm development. Plant Physiology. 144: 821-835.

Cutler H C. y M. C. Cutler. 1948. Studies on the Structure of the Maize Plant Annals of the Missouri Botanical Garden. 35(4) Special Number: The 1947 Conference on the Inflorescences of *Zea Mays*: 301-316.

Dadong L., Blakey A., Dewald C. y Dellaporta S. L. 1997. Evidence for a common sex determination mechanism for pistil abortion in maize and in its wild relative *Tripsacum*. Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 4217-4222.

Dellaporta S. L. y Calderon-Urrea A. 1994. The Sex Determination Process in Maize. Science. 266 (5190): 1501-1505.

De Wet J. M. J., J. R. Harlan y A. V. Randrianasolo. 1978a. Morphology of Teosintoid and Tripsacoid Maize (*Zea mays* L.). American Journal of Botany. 65(7):41-747.

De Wet J. M. J., J. R. Harlan, H. T. Stalker y A. V. Randrianasolo. 1978b. The Origin of Tripsacoid Maize (*Zea mays* L.). *Evolution*, 32(2): 233-244.

Doebley J. F. y H. H. Iltis. 1980. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I. A. Subgeneric Clasificación with key to taxa. *American Journal of Botany*. 67 (6): 982-993.

Erdelska O. y Z. Vidovencová. 1992. Cleavage Polyembryony in maize. *Sex. Plant Reprod.* 5:224-226.

Eriksen B. y M. Fredrikson. 2000. Megagametophyte development in *potentilla nivea* (Rosaceae) from Northern Swedish Lapland. *American Journal of Botany*. 87(5): 642–651.

Esau K. 1977. *Anatomy of seed plants*. 2da Edición. John Wiley and Sons. Canadá. 550 pp.

Esau, K. 1985. *Anatomía Vegetal*. 3ª Ed. Editorial Omega. España. 615 pp.

Espinoza J., M. C. Vega, E. Navarro y G. A. Burciaga. 1998. Poliembrionía en maíces de porte normal y enano. *Agronomía Mesoamericana*. 9(2):83-88.

Espinoza V. y H. de León. 2005. Apomixis, ¿un fenómeno en proceso de adopción natural en maíz? En: Valdés Reyna J. 2005. *Resultados de Proyectos de Investigación 2004*. 245–252 pp. Dirección de Investigación, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.



Farquharson L. I. 1955. Apomixis and Polyembryony in *Tripsacum dactyloides*. American Journal of Botany. 42(8):737-743.

Flores-Rentería LI. 2002. Estudio embriológico de *Opuntia tomentosa* SALM-DYCK VAR. *Tomentosa* SALM-DICK (CACTACEAE). Tesis de licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F. 79 pp.

Flores-Vindas E. 1999. La planta, estructura y función. Volumen II. Editorial Libro Universitario Regional. Costa Rica. 884 pp.

Gómez-González J. R. 1980. Selección para la alta frecuencia de semillas de maíz con doble embrión. Pág. 112. En: Informe de Avances de Investigación, IMM, 86-87.

Gómez-González J. R. 1983. Estudio sobre herencia y valor nutritivo de semillas de maíz con doble embrión. 77-78 pp. En: Informe de Avances de Investigación, IMM, 86-87.

Grimanelli D., O. Leblanc, E. Espinosa, E. Perotti, D. G. De Leon y Y. Savidan. 1998. Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: One gene or several genes? Heredity 80:33–39.

Grimanelli D., M. García, E. Kaszas, E. Perotti y O. Leblanc. 2003. Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*. Genetics. 165: 1521-1531.

Guingnard J. L. y Meshe. 1970. L'embryon des Graminées. *Phytomorphology*. 20: 190-197.

Johri B. M. 1984. *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag. Alemania. 830 pp.

Kellogg E. A. 1987. Apomixis in the *Poa secunda* Complex. *American Journal of Botany*. 74(9):1431-1437.

Kiesselbach T. A. 1980. *The Structure and Reproduction of Corn*. University of Nebraska Press. E.U. 96 pp.

Koltunow A. M. 1993. Apomixis: Embryos sacs and Embryos Formed without Meiosis or Fertilization in Ovules. *The Plant Cell*. 5:1425-1437.

Koltunow A. M. y U. Grossniklaus. 2003. APOMIXIS: A Developmental Perspective. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 547- 574.

Lakshmanan K. K. y K. B. Ambegaokar. Polyembryony. En: Johri B. M. 1984. *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag. Alemania. 445-474 pp.

Leblanc O., M. D. Peel, J. G. Carman, Y. Savidan. 1995. Megasporogenesis and Megagametogenesis in Several *Tripsacum* Species (Poaceae). *American Journal of Botany*, 82(1):57-63.

López C., J. Márquez y G. Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas, Libro de Laboratorio. Las Prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México D. F. 178 pp.}

Márquez-Sánchez. F. 2007. Ecuación básica para el cálculo de la endogamia de la progenie aleatoria sin autofecundación, de una línea parcialmente autofecundada de maíz. *Agrociencia*. 41: 521-525.

Márquez F. 1995. Métodos de mejoramiento genético del maíz. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 77 pp.

Martínez E.J., M. H. Urbani, C. L. Quarín y J. P. A. Ortiz. 2001. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135:19–25.

Matzk F., S. Prodanovic, H. Baumlein y I. Schubert. 2005. The Inheritance of Apomixis in *Poa pratensis* Confirms a Five Locus Model with Differences in Gene Expressivity and Penetrance. *The Plant Cell*. (17):13–24.

Morgan D. T. Jr. y R. O. Rappleye. 1951. Polyembryony in maize and lily, following X-irradiation of the pollen. *J. Hered* 42(2):91-93.

Naumova T. N., J. V. Osadchiy, V. K. Sharma, P. Dijkhuis y K. S. Ramulu. 1999. Apomixis in plants: Structural and functional aspects of diplospory in *Poa nemoralis* and *P. palustris*. *Protoplasma* 208:186–195.

Nickerson H. N. 1954. Morphological Analysis of the Maize Ear. *American Journal of Botany*. 41(2.): 87-92.

Orr A. R. y M. D. Sundberg. (1994). Inflorescence Development in a Perennial Teosinte: *Zea perennis* (Poaceae). *American Journal of Botany*. 81(5): 598-608.

Pessino S. C., J. P. Ortiz, O. Leblanc, C. B. do Valle, C. Evans y M. D. Hayward. 1997. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theor. Appl. Genet.* 94:439–444.

Philipson W. R. (1985). Is the Grass Gynoecium Monocarpellary? *American Journal of Botany.* 72(12):1954-1961.

Ramírez N. M., J. Espinoza-Velázquez, V. M. González-Vázquez, J. E. Gallegos-Solórzano y H. L. Castillo. 2008. Características de plántulas en familias derivadas de una población de maíz poliembriónico. *Rev. Fitotec. Mex.* 31(4):399-402.

Richards A. J. 1997. *Plant Breeding Systems*. 2nd ed. Chapman and Hall. Londres.

Ritchie S. W., J. J. Hanway, G. O. Benson, J. Clayton, S. J. Lupkes, R. J. Salvador, R. Satter, W. Miller y A. Kitzman. 1993. How a corn plant develops. Special Report. Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service. E. U. A. No. 48.

Roche D., P. S. Cong, Z. B. Chen, W. W. Hanna, Gustine D. L., R. T. Sherwood y P. Ozias-Akins. 1999. An apospory-specific genomic region is conserved between buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and *Pennisetum squamulatum* Fresen. *Plant J.* 19:203–208.

Savidan Y. 1980. Chromosomal and embryological analyses in sexual 3 apomictic hybrids of *Panicum maximum* Jacq. *Theor. Appl. Genet.* 57:153–156.

Schmidt L. y D Joker. 2001. Glossary of seed biology and technology. Danida Forest Seed Centre. Nota Técnica No. 59.

Schranz E., C. Dobes, M. A. Koch y T. Mitchell-Olds 2005. Sexual reproduction, hybridization, apomixis, and polyploidization in the genus *Boechera* (Brassicaceae). American Journal of Botany 92(11): 1797–1810.

Sokolov V. A., B. Kindiger y I. V. Khatypova. 1998. Apomictically reproducing 39-chromosome maize-*Tripsacum* hybrids. Genetika 34:499–506.

Spichiger R. E., V. Savolainen, M. Figeat y D. Jeanmonod. 1995. Systematic of botany of flowering plants. A new phylogenetic approach of the temperate and tropical regions. Science Publishers Inc. India. 413 pp.

Spielman M., R. Vinkenoog y R. J. Scott. 2003. Genetic Mechanisms of Apomixis. Phil. Trans.: Biological Sciences. R. Soc. Lond. 358(1434):1095-1103.

Stalker H.T., J. R. Harlan y J. M. J. de Wet. 1977. Observations on Introgression of *Tripsacum* into Maize. American Journal of Botany. 64(9):1162-1169.

Sundberg M. D. y Orr A. 1990. Inflorescence Development in Two Annual Teosintes: *Zea mays* subsp. *mexicana* and *Z. mays* subsp. *Parviglumis*. American Journal of Botany. 77(2): 141-152.

Taiz. L. y E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. 3a ed. Sinauer Associates Inc. Pub. E. U. A. 690 pp.

Vernoud V., M. Hajduch, A. S. Khaled, N. Depège, P. M. Rogowsky. 2005. Maize embryogenesis. *Maydica*. 50: 469-483.

Yang X. y C. Hwa. 2008. Genetic and physiological characterization of the *OsCem* mutant in rice: formation of connected embryos with multiple plumules or multiple radicles. *Heredity*. 101:239–246.

2001. APO2001: A sexy apomixer in como. *The Plant Cell*. 13:1477-1497.