



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN EL DESARROLLO  
EMBRIONARIO DE LA POBLACIÓN DE MAÍZ UAAAN-IMM-  
BAP**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**JUAN MANUEL SÁNCHEZ RAMÍREZ**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ  
GUZMÁN**

**2010**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Sánchez

Ramírez

Juan Manuel

56 49 09 40

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

300159114

### 2. Datos del tutor

Dra.

Guadalupe Judith

Márquez

Guzmán

### 3. Datos de sinodal 1

Dra.

Martha Juana

Martínez

Gordillo

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.

Sonia

Vásquez

Santana

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.

José

Espinoza

Velázquez

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Karina

Jiménez

Duran

### 7. Datos del trabajo escrito

Muerte celular programada en el desarrollo embrionario de la población de maíz

UAAAN-IMM-BAP

50 p

2010

## AGRADECIMIENTOS.

A la Dra Guadalupe Judith Márquez Guzmán (mi asesora) a quien agradezco de todo corazón por su paciencia, apoyo, amor, cariño y comprensión a lo largo de mi estancia en el laboratorio. Ella fue quien ordenó mis ideas cuando estaban en un mar de confusión y fue mi guía en la construcción de esta tesis que ya llegó a su fin

Al Dr José Espinoza por toda la ayuda, facilidades y disposición que nos brindo a lo largo de este proyecto, sin dejar de mencionar los conocimientos que compartió con nosotros.

A la Dra Sonia Vásquez Santana por sus siempre acertados consejos, gran sabiduría y el enorme apoyo que en ella encontré.

A la M. en C. Karina Jiménez (kari) por su confianza, disposición, conocimientos, recomendaciones, calidad y el apoyo en microscopía confocal, sin duda alguna fundamental.

Al Men C Alejandro Martínez Mena por la toma de fotomicrografías.

A la Dra Martha Juana por aceptar ser mi sinodal y dedicarle tiempo a mi tesis.

A la Dra Margarita Collazo quien fue mi profesora durante el taller y de quien aprendí mucho todos estos años.

A Monica Karina Pérez Pacheco y Ricardo Won por todos los consejos brindados, además de su grata compañía.

A Patricia Pérez Belmont por la compañía y el apoyo en las colectas, además de su colaboración desinteresada.

A mis padres y a mis hermanitas por todo el apoyo, confianza, comprensión y amor. Sé que cuento con ellos y que por siempre los llevo en el corazón.

A la Facultad de Ciencias, a la UNAM por aceptarme, por brindarme un espacio, por darme una identidad, por formarme no solo como biólogo, sino como persona.

A mis amigos por el amor, la confianza y lealtad.

A Astro por esos momentos de distracción y apoyo moral.

Finalmente a todas las personas que se cruzaron en este camino y que me dieron palabras de aliento y apoyo.

## DEDICATORIA

Al finalizar un trabajo arduo siempre llega la satisfacción personal junto con una sonrisa en el rostro e indiscutiblemente llega también un muy humano egocentrismo, que nos lleva a recordar el gran aporte que hemos hecho y a darle el mayor mérito. Pero el razonamiento objetivo nos muestra rápidamente que la magnitud de nuestro aporte hubiera sido prácticamente imposible sin la intervención de muchas personas e instituciones que nos facilitaron las cosas y la vida y es en gran medida a ellos que este trabajo encontró el final. Es por eso para mí un verdadero placer brindarles este espacio para expresarles mis gratitudes.

Deseo agradecer profundamente a la casualidad de la vida que me puso en un hogar magnífico al nacer y como consecuencia con unos padres maravillosos y unas hermanas asombrosas. Sin su presencia la vida no sería la misma, quiero reconocer a mis padres por haberme forjado con tan buenos principios, por infundirme la ética y el rigor, agradecerles por creer y confiar en mí, por su paciencia, por su amor, por darme la oportunidad de formarme en las filas de la biología y por soportar mis ausencias que por ende implico.

La gran responsable de esta tesis, la Dra. Judith que indiscutiblemente es una gran asesora y una excelente persona, es ella quien me ha guiado desde hace varios años, quien ha ordenado mis ideas desordenadas. Quiero hacer gran

énfasis en Judith por tenerme la enorme paciencia ante mis dudas de joven inexperto, nunca podre agradecerle lo suficiente el grandísimo esfuerzo de soportarme durante todos estos años y al mismo tiempo quiero reconocer los sabios consejos que de ella escuché, los cuales no solo se restringieron en el ámbito académico.

El gran equipo de trabajo que conforma al Laboratorio de Desarrollo de Plantas, Mague, Soni, Richi, Moni, Kari, todos ellos grandes científicos pero sobre todo grandes personas, que se distinguen por su preparación y capacidad, los cuales me han dejado grandes enseñanzas y a quienes les tengo un gran respeto y profunda admiración.

A mis compañeros de laboratorio Elizabeth, Saúl, Magali, Aldebaran, Paty, Rulo, Alfredo, Diana, Poncho, Silvia con quien compartí estos últimos años y con quien he hecho una buena amistad, a todos y cada uno de ellos gracias.

Pavel Granados una de las grandes personas que la vida me ha puesto en frente y con quien he compartido mi vida en los últimos 11 años de lucha constante, de gratas vivencias, de momentos exitosos, también de angustias y desesperanzas, sin duda alguna mi gran amigo, agradezco su amor, entrega, pasión, lealtad y confianza.

Gabriel Merino Díaz una de las personas más capaces, humanas y humildes que he encontrado en la vida, a quien conocí el primer día de clases y con quien estuve a lo largo de toda mi estancia en la facultad, persona por demás inteligente, un excelente amigo, gracias por la confianza y lealtad.

A mis amigos siempre fieles de la facultad, a mis amigos del Tae Kwon Do y a mis amigos de la vida por darme siempre aliento para continuar luchando en esta vida que a veces se torna terrorífica.

Y por último a mi gran amigo Astro con quien me ha dado grandes momentos y quien ha dejado grandes recuerdos.

Otro demérito de los falsos problemas es el de promover soluciones que son falsas también. A Plinio (historia natural, libro octavo) no le basta observar que los dragones atacan en verano a los elefantes: aventura la hipótesis de que lo hacen para beberles toda la sangre que, como nadie ignora, es muy fría.

Jorge Luis Borges

## Índice

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	2
<b>3. Antecedentes</b> .....	5
3.1 <i>Zea mays</i> .....	5
3.1.1 Inflorescencia masculina .....	6
3.1.2 Inflorescencia femenina.....	7
3.1.3 Embriogénesis del maíz.....	8
3.1.4 Etapas de desarrollo y estructuras del embrión.....	9
3.2 Poliembrionía.....	12
3.3 Muerte celular programada.....	13
3.3.1 Muerte celular programada en plantas.....	15
3.3.2 Muerte celular programada durante el desarrollo en plantas.....	18
<b>4. Justificación</b> .....	21
<b>5. Objetivo general</b> .....	21
<b>6. Objetivos particulares</b> .....	21
<b>7. Materiales y Método</b> .....	22
7.1 Colecta del material biológico .....	22
7.2 Polinización.....	22
7.3 Procesamiento de las muestras .....	27
7.4 Prueba de TUNEL para la detección de muerte celular programada.....	27
<b>8. Resultados</b> .....	30
8.1 Muerte celular programada.....	32
<b>9. Discusión</b> .....	42
<b>10. Conclusión</b> .....	47
<b>Bibliografía</b> .....	48

## RESUMEN

Las semillas de la población de maíz Braquíptico de Alta Poliembriónía (UAAAN-IMM-BAP®) tienen la capacidad de producir múltiples plúmulas al germinar. El presente trabajo tuvo como propósito detectar la existencia de muerte celular programada en semillas de maíz tipo BAP durante su desarrollo, bajo el supuesto de la presencia de poliembriónía al presentar un número de plántulas variables por semilla al germinar en condiciones de campo.

Se utilizó material colectado en los campos experimentales de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro de Coahuila (UAAAN); uno, el “Dr. Mario E, Castro Gil” ubicado en Tepalcingo, Morelos, y el otro: “Campo Experimental Buenavista” en Saltillo, Coahuila, sede de la institución.

El desarrollo experimental de laboratorio incluyó estudios anatómicos de las flores femeninas y de las semillas en desarrollo de individuos que pertenecen a la población BAP®, aplicando la prueba de TUNEL para detectar muerte celular programada. Los resultados indican que cada eje embrionario presenta varias plúmulas y una sola radícula. Para el caso de la muerte celular programada, los resultados indicaron que éste no es un mecanismo de eliminación de embriones como inicialmente se propuso, ya que en los casos estudiados sólo se detectó un solo embrión con múltiples plúmulas. La muerte celular se presenta sólo en el suspensor del embrión y el escutelo regiones en donde ocurre naturalmente durante el desarrollo de semillas no poliembriónicas.

## 2 INTRODUCCIÓN

Entre 1968 y 1971 un grupo de agrónomos mexicanos crearon una población de maíz, a la que llamaron “Selección Súper Enana (SSE)”, donde el enanismo y una mayor producción por hectárea eran las principales características. Esta población se originó a partir de cruzamientos entre una población segregante para el gen de enanismo “braquítico-2” (la población combinaba germoplasma del Compuesto Puebla 1 y un grupo Tuxpeño) con un maíz argentino, grano amarillo y cristalino, de tallo cuadrado y altura de 40 cm, de hojas erectas y opuestas. De estos cruzamientos (F1) fue derivada la población recombinada de progenies F2 (segunda filial), de las cuales fueron seleccionadas 500 familias, representando plantas de porte enano, erectas, y prolíficas (dos mazorcas); fue a esta selección la que fue denominada como “SSE” (Castro, 1973). Tiempo después fue observado que en progenies emparentadas con plantas tallo cuadrado se detectaban plantas “gemelas” idénticas provenientes de granos con doble embrión; condición que permitió plantear y realizar trabajos de selección para incrementar la frecuencia del carácter e introducirlo en una población sintética enana, con fines de estudio y para diseño de nuevas variedades de maíz (Castro y colaboradores, 1978). Este fue el principio de la integración de la población BAP, con la que se trabajó esta investigación. Además de estos primeros reportes sobre el tema, son de interés los trabajos sobre poliembrionía en maíz, publicados por Morgan y Rappleye (1951), y Rodrigues y Castro (1978), quienes informan del fenómeno desde otras perspectivas.

Los primeros individuos producidos por las semillas de esta población fueron llamados gemelos y representaban no más de 1.5% del total de la población. Los descendientes que presentaban dos o más plántulas por semilla fueron aislados y cruzados entre sí para aumentar la frecuencia de poliembrionía en la población (Castro, 1979), logrando llegar al 48% de presencia de poliembrionía. Estos individuos también se cruzaron con otros de talla más alta, originando una nueva población denominada NAP (Normal de Alta Poliembrionía®).

La UAAAN continuó el trabajo de investigación con la finalidad de incrementar la frecuencia de la poliembrionía en sus poblaciones, llegando a 60% en el ciclo de selección 2009. Bajo este supuesto de poliembrionía, incluso con la posibilidad de detectar apomixis fue iniciada esta investigación.

En otro orden de ideas, la muerte celular programada (MCP) ha sido definida como una secuencia de eventos que controlan y organizan la eliminación de las células (Lockshin y Sakeri, 1998). Este es un proceso crucial de los individuos como respuesta contra organismos patógenos y para el correcto desarrollo del cuerpo multicelular en plantas (Lam, 2000). La MCP es considerada como parte integral en el desarrollo de plantas y animales, obedeciendo a señales externas e internas; el fenómeno puede estar involucrado como una contraparte necesaria a la división celular para determinar la forma y morfología de los tejidos y órganos durante la morfogénesis. La MCP en plantas está catalogada en tres tipos diferentes: apoptótica, autofágica y no lisosomal (Rogers, 2006).

En el maíz se sabe que la MCP ocurre de una manera normal durante las dos fases, esporofítica y gametofítica (Buckner *et al.*, 1998); se presenta durante la formación unisexual de las flores, durante la microesporogénesis y megasporogénesis para eliminar uno de los verticilos sexuales como el gineceo y androceo en flores finalmente masculinas y femeninas respectivamente (Dellaporta y Calderon-Urrea, 1993).

En este trabajo se determinó el papel de la muerte celular programada durante el desarrollo embrionario del maíz BAP®, por medio de la prueba de TUNEL, bajo la premisa de la eliminación de embriones en semillas poliembriónicas - apopmíticas.

### **3 ANTECEDENTES**

Las plantas, como organismos sésiles han desarrollado mecanismos y estrategias para sortear situaciones desfavorables durante el crecimiento, una de ellas es la interrupción de su ciclo vital, bajo determinadas circunstancias. Las angiospermas se caracterizan por sus flores, en cuyo gineceo se forman las semillas, las cuales son estructuras originadas a partir de la fecundación del óvulo, generando el embrión; de los núcleos polares o de fusión, derivando en el endospermo, y otros tejidos de origen materno.

#### **3.1 *Zea mays***

Las Poaceae son una familia de plantas herbáceas, muy raramente leñosas, perteneciente al orden Poales, de las monocotiledóneas. Con más de 670 géneros y cerca de 10,000 especies descritas, las poáceas son la cuarta familia con mayor riqueza de especies luego de las compuestas (Asteraceae), las orquídeas (Orchidaceae) y las leguminosas (Fabaceae); pero, definitivamente, es la primera en importancia económica global. El género *Zea*, es el más importante en relación con la alimentación de los humanos. En este género se encuentra la especie *Zea mays* (Bortolini, 1989; Judd, *et al*; 2002)

El maíz forma un tallo erguido y macizo que se divide en nudos y entrenudos; tiene tres componentes importantes en sus tejidos: la corteza o epidermis, los haces vasculares y la médula. Los haces vasculares están ordenados en círculos

concéntricos con una mayor densidad de haces y anillos hacia la zona periférica epidérmica, y reducida hacia el centro del tallo (médula). La altura es muy variable y oscila entre 40 cm en ciertas variedades enanas, llegando hasta los 6 m. Presenta hojas alternas, largas y estrechas, raíces adventicias y racimos de inflorescencias masculinas y femeninas.

El maíz es una excepción dentro de los cereales, ya que presenta inflorescencias masculinas y femeninas separadas, aunque se forman sobre la misma planta, por lo que es una especie monoica. En la parte apical se ubica la inflorescencia estaminada o masculina; la inflorescencia pistilada o femenina se desarrolla de forma lateral en los nudos del tallo formando el jilote.

### **3.1.1 Inflorescencia masculina**

La inflorescencia masculina cumple con la función de producir granos de polen, para poder asegurar la fecundación del órgano femenino y culminan su desarrollo dos semanas después de su aparición, primero se presenta el alargamiento del ápice del tallo y surgen los primeros primordios de las ramificaciones. Los primordios son bilobulados y cada lóbulo origina una inflorescencia masculina, con dos flores, las cuales son rodeadas por la gluma y después por la lema y la palea. Brotan tres estambres, dos lodículos y un pistilo rudimentario. Presenta una antera que es tetra-esporangiada y bilobulada (Kiesselbach, 1980).

La inflorescencia masculina es una panícula formada por numerosas flores pequeñas, llamadas espículas, cada una con tres anteras pequeñas que producen los granos de polen, que contienen a los gametos masculinos.

### **3.1.2 Inflorescencia femenina**

La inflorescencia femenina (xilote, o jilote) crece envuelta en hojas modificadas o brácteas llamadas profilas, cuenta con dos venas medias y carece de lígula; las fibras sedosas o pelos que brotan de la parte superior del xilote son los estilos prolongados, unidos cada uno de ellos a un ovario individual. El óvulo que se forma es sécil, campilótropo y bitégmico. El ovario es tricarpelar. En el proceso de la megasporogénesis, la célula arqueosporial da origen a la célula madre de la megaspora. El polen de la panícula masculina, arrastrado por el viento (polinización anemófila), cae sobre los estilos, donde germina y el tubo polínico avanza hasta llegar al ovario; cada ovario fecundado crece hasta transformarse en un fruto llamado cariósido o grano de maíz. El xilote una vez fecundado se transforma en una infrutescencia llamada mazorca, que llega a agrupar hasta un millar de semillas dispuestas sobre un eje duro conocido coloquialmente como olote.

### 3.1.3 Embriogénesis del maíz

La embriogénesis se entiende como la suma de eventos durante todo el crecimiento y desarrollo del embrión, incluyendo los procesos de diferenciación a partir de una sola célula diploide (cigoto) a un organismo multicelular, altamente organizado llamado embrión. La fecundación de la célula huevo por una célula espermática origina la formación del cigoto y esta etapa marca la transición de la etapa gametofítica a la esporofítica. En el maíz, la embriogénesis puede ser dividida en tres etapas. En la primera se lleva a cabo la diferenciación de los tejidos responsables de la polaridad y la posición de los órganos, también ocurre la formación de éstos. La segunda fase de maduración está marcada por el crecimiento del embrión y la acumulación de sustancias de reserva. Durante la tercera fase, el embrión se deshidrata y entra en una etapa de latencia. Durante la germinación el embrión del maíz consumirá sus propias sustancias de reserva (Vernoud, 2005 ) (Fig.1). El embrión y el endospermo son productos de una doble fecundación, evento típico en las angiospermas. El segundo producto de la fecundación es el endospermo, que resulta de la fusión de los núcleos de la célula central con la segunda célula espermática y es un tejido esencial de almacenamiento (Magnard *et al.*, 2004). En términos evolutivos, el endospermo y el embrión tienen un origen similar. En las plantas actuales, el embrión es una estructura altamente diferenciada, que nunca pierde su totipotencialidad y continúa desarrollándose después de la germinación para formar las estructuras vegetativas y eventualmente una planta madura. El endospermo es un tejido esencial de almacenamiento.

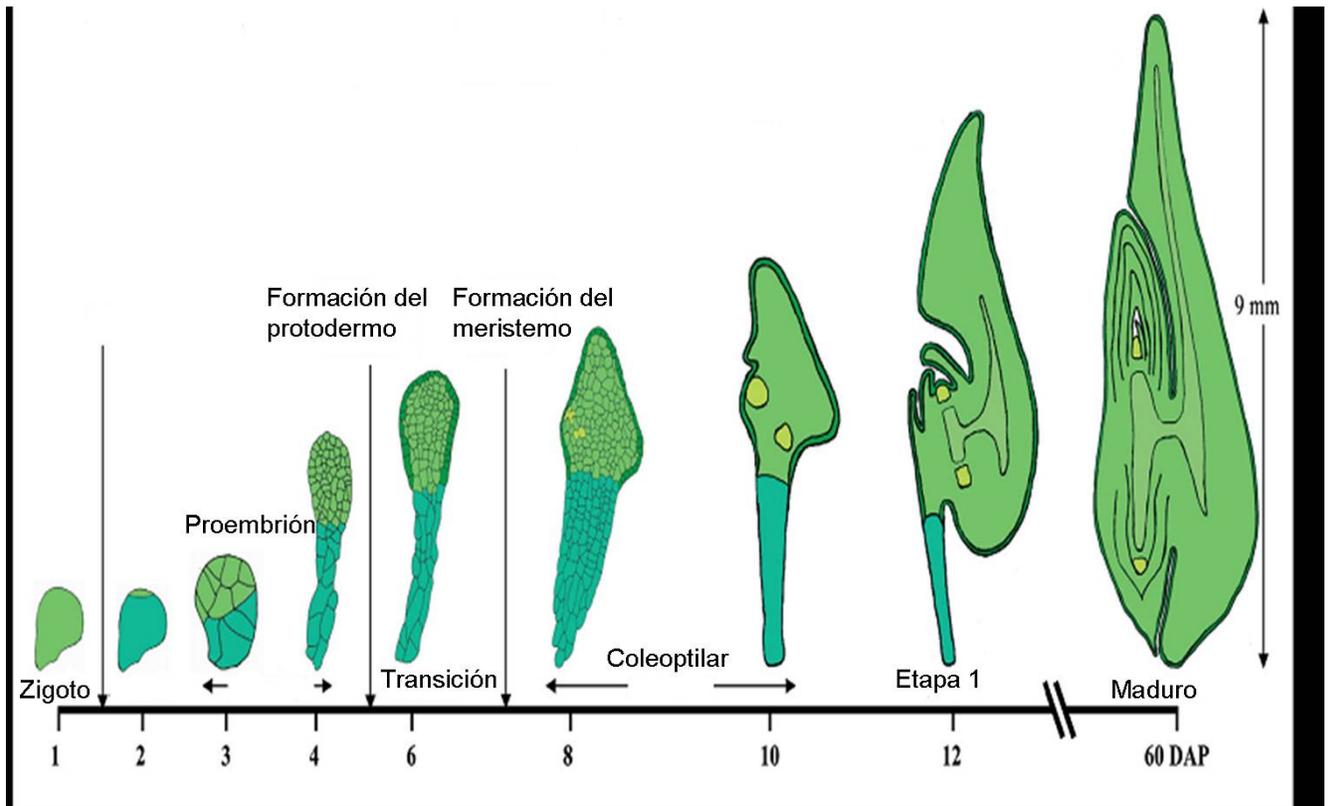


Figura 1. Desarrollo embrionario en *Zea mays*. Se muestran las principales etapas del embrión del maíz. De izquierda a derecha; cigoto, proembrión, transición, coleoptilar, etapa 1 y maduro. (Tomada de Vernoud, 2005)

### 3.1.4 Etapas de desarrollo y estructuras del embrión

La formación del cigoto es la etapa inicial en la ontogénesis. En el curso de la secuencia de las transformaciones morfogénicas, el cigoto desarrollará un embrión multicelular y más tarde un individuo (Magnard *et al.*, 2004).

En *Zea mays* alrededor de la segunda hora después de la fecundación empieza la formación del endospermo, el cual es del tipo nuclear, formándose de 128 hasta 256 núcleos, la primera división del cigoto es de tipo transversal y origina una

célula apical y una basal, las divisiones siguientes son asimétricas. El suspensor es un órgano especializado del embrión que se desarrolla en la parte basal del proembrión, es el principal camino de nutrientes y transporte de hormonas hacia el embrión. Morfológicamente el suspensor puede tener varias formas y tamaños, puede ser unicelular o multicelular, pequeño o largo, no participa en la formación del propio embrión, pero la presencia del suspensor es esencial para su desarrollo (Yeung y Meinke, 1993).

La hipófisis, es la célula o el grupo de células, que se encuentran en la parte basal del proembrión, donde se originarán elementos del embrión como la radícula. La epífisis, es la célula o el grupo de células en la parte apical del proembrión, donde se inicia la epidermis del tallo.

El embrión desarrolla una radícula, que en algunos casos es reducida, ésta forma parte del eje embrionario y junto con el hipocótilo integran el llamado eje hipocótilo-radícula. Normalmente la radícula contiene un número de tejidos meristemáticos que difieren en origen, ubicación y características del desarrollo, aunque se representa generalmente por un meristemo basal.

El epicótilo, es la parte apical del eje embrionario localizado sobre el nudo cotiledonario (unión del cotiledón con el eje), está formado por el meristemo apical y los primordios foliares.

El cotiledón es la primera hoja del embrión. La estructura particular del cotiledón está condicionada por el nivel de desarrollo, por la ubicación y su función (reserva, protección y fotosíntesis) (Shull, 1909).

En la cariósida madura del maíz (fruto) se distinguen tres partes principales: el revestimiento exterior del fruto que es el pericarpo, unido íntimamente a la cubierta de la semilla, el endospermo y el embrión, que dará origen a la nueva planta (Bortolini, 1989) .

El pericarpo cumple con la función de proteger a la semilla de los ataques de patógenos externos. El endospermo constituye la principal reserva energética de la cariósida, de donde la plántula obtiene azúcares y sustancias proteicas. El embrión (esporofito) cuenta ya con las principales partes meristemáticas para que se desarrolle una planta adulta, las cuales son la plúmula (meristemo apical y primordios foliares) y la radícula (meristemo basal).

El embrión en las gramíneas tiene una ubicación basal lateral, rodeado por el endospermo y la cubierta seminal, unida al pericarpo. Según una interpretación del embrión de las poáceas, la lámina del único cotiledón se encuentra dilatada a modo de escudo formando el escutelo, la lígula de la hoja cotiledonaria adopta una configuración tubular formando el coleóptilo, que protege al ápice caulinar y los primordios foliares. El epiblasto, representa a la vaina de la hoja cotiledonaria. La estructura intermedia, resultado de la unión entre parte de la hoja cotiledonaria y el hipocótilo, forma el mesocótilo (Fig. 2).

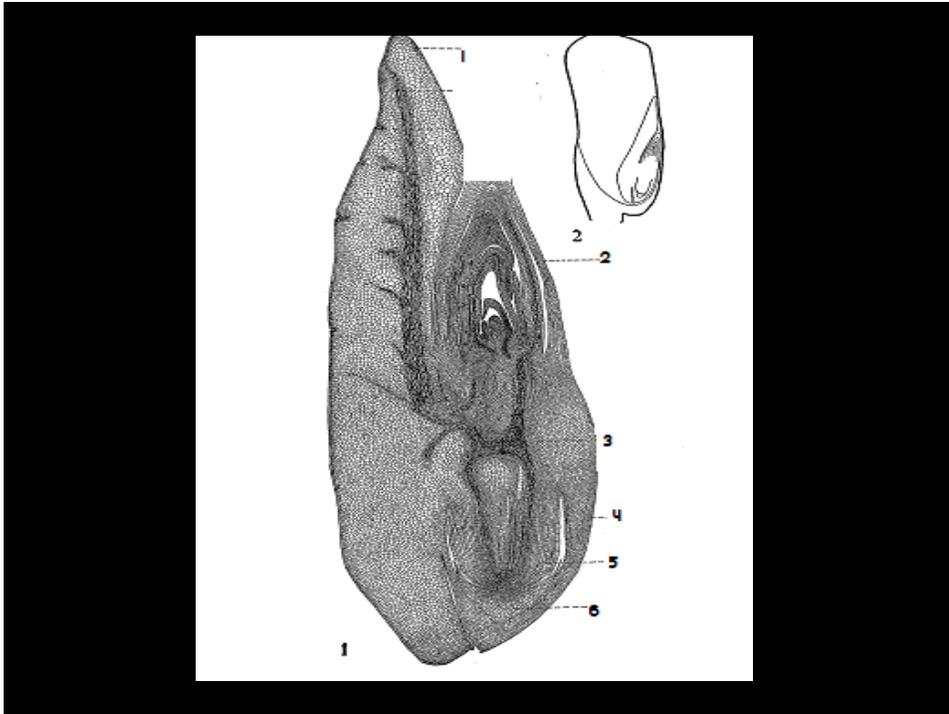


Figura 2. Corte longitudinal del embrión del maíz. 1) escutelo, 2) coleoptilo, 3) nodo escutelar, 4) coleoriza, 5) raíz primaria 6) raíz. (Figura tomada de Shull, 1909).

### 3.2 Poliembrionía

La poliembrionía es la presencia de más de un embrión en la semilla, dando como posible resultado la producción de más de un individuo por semilla. Este es un proceso que ocurre naturalmente en muchas especies, por varias vías: ya sea a partir del cigoto (ovocélula), de las sinérgidas, de las antípodas (tres células del saco embrionario localizadas en la región calazal), de la nucela (tejido somático que rodea al saco embrionario), o de los tegumentos (tejido que rodea a la nucela). Las plántulas producidas pueden ser haploides, diploides o triploides, en distintas combinaciones, dependiendo de su origen. Una poliembrionía simple es cuando en un mismo saco embrionario se desarrollan varios embriones, y se dice

que es múltiple cuando se forman en varios sacos embrionarios. En algunas angiospermas puede darse el caso que el cigoto, después de la primera mitosis, se divide en dos, y así se forme un embrión de cada una de las partes. La poliembrionía es un fenómeno raro en el maíz, que le confiere a la planta grandes beneficios, sobre todo cuando se trata de líneas genéticas con alta producción de aceites, almidón, etc. Gracias a que un grano de maíz poliembriónico puede originar de dos a siete plantas normales en un espacio pequeño, se favorece el número de plantas y por lo tanto de mazorcas, sobre todo cuando estas líneas almacenan un mejor contenido nutricional por el mayor número de embriones, ya que es en el embrión donde se encuentra la mayor proporción de proteínas y de aceite. En la actualidad se están realizando investigaciones para poder desarrollar nuevos y mejores híbridos y variedades con un alto nivel productivo, que tengan resistencia a enfermedades y algunos factores climáticos, además aquellas que cuentan con un alto contenido nutricional (Espinoza *et al.*, 1998) como es el caso de la variedad estudiada aquí.

### **3.3 Muerte celular programada**

La definición de la muerte celular programada (MCP) se entiende como la muerte celular que resulta de la activación del genoma que codifica para varias rutas bioquímicas que desencadenan procesos de eliminación de las células (Lockshin y Zakeri, 1998). También puede ser entendida como un proceso genético asociado con características morfológicas y bioquímicas distintivas. Forma parte del ciclo de

vida en los organismos multicelulares como los animales y las plantas, y que puede ser inducida por varios estímulos durante el desarrollo (Studzinski, 1999).

La MCP es un proceso esencial para mantener la homeostasis tisular en distintas formas de vida y es el proceso por el cual se regulan algunos mecanismos fisiológicos, tales como la germinación, la diferenciación celular, el crecimiento, la reproducción y el desarrollo de la semilla (Pérez, 2007).

El término apoptosis fue acuñado para describir la muerte celular, que implica la activación celular en un proceso de “suicidio” que está programado en las células (Potten, 2004). La MCP es un proceso fisiológico clave para la eliminación selectiva de células durante el desarrollo, senescencia, o la respuesta al estrés, tanto en animales como en plantas. El proceso más común de MCP es la apoptosis, la cual se caracteriza, en células animales, por una serie de cambios metabólicos y morfológicos que afectan a distintos compartimentos, como la mitocondria y el núcleo, así como por la actividad de proteasas específicas denominadas caspasas.

Este fenómeno es genéticamente controlado y la activación de este proceso es en ocasiones mediada por factores bióticos y abióticos. Es un proceso que se ejecuta bajo un estricto control, esencial para asegurar que sólo se lleve a cabo en las células indicadas (Sanmartín *et al.*, 2005).

Los mecanismos moleculares para la eliminación de células durante el desarrollo, son esenciales para el crecimiento exitoso en organismos complejos. Funcionan como un regulador en la tasa de división celular en organismos multicelulares y se produce porque estos organismos cuentan con vías bioquímicas para el control de la muerte celular. La muerte celular, puede ser utilizada en muchos otros procesos como el control de poblaciones de células y la defensa por invasión de algunos microorganismos (Greenberg, 1996).

No se sabe si la MCP es un proceso que se desarrolló de manera independiente en los diferentes reinos o si tiene un ancestro común. La evidencia más clara para poder hablar de un origen común en MCP está en algunos componentes moleculares de este proceso que se conservan en los diferentes reinos (Sanmartín, 2005).

### **3.3.1 Muerte celular programada en plantas**

Hoy en día es aceptado que la MCP se presenta en las células de las plantas, pero aún no está muy aceptado el uso del término clásico de “apoptosis” en plantas. Son varios los casos donde las células de las plantas mueren como una parte normal del desarrollo, mostrando ciertos cambios en la estructura, característica de la apoptosis. Estos cambios citológicos y bioquímicos incluyen la condensación nuclear, agregación de cromatina en los márgenes nucleares, y colapso celular. La evolución de la maquinaria apoptótica y la degradación puede ser que se encuentren conservadas en la filogenia de las especies.

Las caspasas son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos. Se encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser cortados para iniciar su actividad (Elinos-Báez, 2003).

Al igual que muchos organismos multicelulares, las plantas dependen de la MCP para poder seguir su desarrollo y crecimiento. En los animales, la morfogénesis está dada por la división celular, la migración celular y la muerte celular. La morfogénesis en plantas es determinada primariamente por la división celular y la muerte celular. Otro aspecto de la vida de las plantas que involucra la MCP es la interacción que se presenta entre las plantas y el medio ambiente. También es una defensa de las plantas contra factores bióticos y abióticos (Elinos-Báez, 2003).

Las metacaspasas, por otro lado, han sido consideradas como candidatas de la regulación y ejecución de la MCP en las plantas (Van der Hoorn y Jones, 2004). Su estructura tridimensional tipo hemoglobinas las agrupa en una superfamilia de proteasas, junto a las caspasas, paracaspasas, leguminasas y gingipainas (Dietrich *et al.*, 1997; Uren *et al.*, 2000).

La muerte celular en plantas está catalogada en tres tipos diferentes: apoptótica, autofágica y no lisosomal (Rogers, 2006).

El mecanismo de MCP apoptótica en plantas es similar al de animales, caracterizado por la liberación del citocromo c, la pérdida de la funcionalidad en la membrana de la mitocondria y activación de las caspasas. Se presentan fenómenos como la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA. Este mecanismo está reportado en la desintegración del tapete y en la degradación del tubo polínico (Rogers, 2006) (Fig 3).

El clásico ejemplo de muerte celular es el de apoptosis, el cual está caracterizado por sus peculiaridades fisiológicas y moleculares, ya que en este caso se activan unas proteasas específicas y nucleasas que son dependientes de calcio y que terminan fragmentando al DNA. Estos cambios bioquímicos son acompañados por cambios morfológicos drásticos, como la fragmentación del núcleo (Lockshin, 1998).

El mecanismo de MCP fagocítico es aquel donde una vacuola de la célula se comporta como un lisosoma animal. Lo que va a hacer es reducir a los organelos y las estructuras de la célula a bloques monoméricos mediante las proteasas, las cuales se cree pueden producirse debido a la exposición de una célula al estrés. Este mecanismo se presenta en la muerte de células de pétalos y sépalos y también en las sinérgidas (Rogers, 2006).

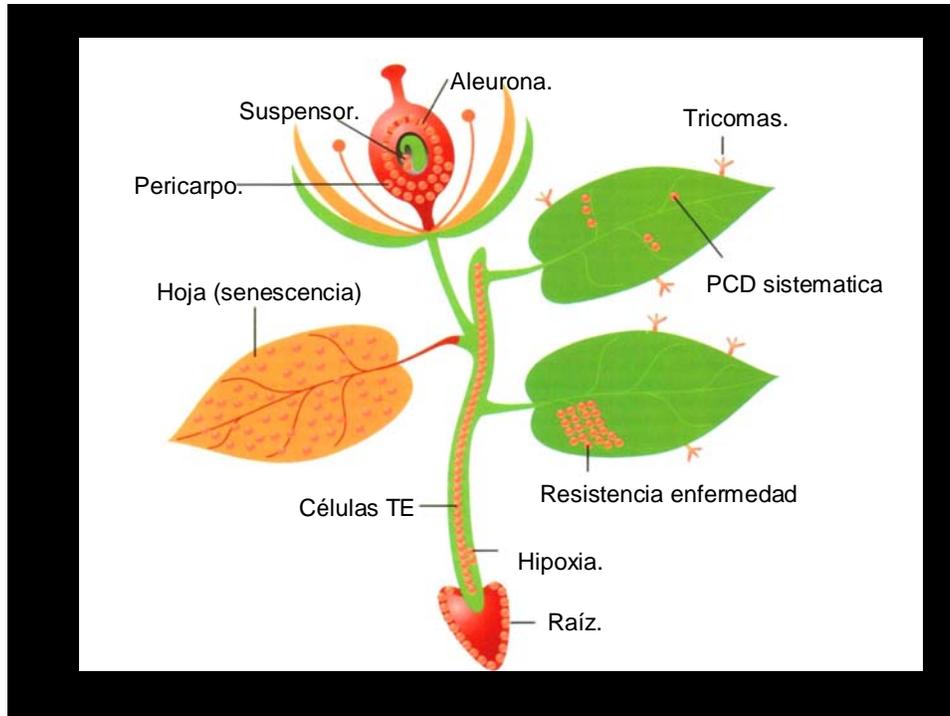


Figura 3. Sitios donde ocurre la MCP en plantas vasculares. Los círculos rojos representan las células muertas, (Tomada de Lamb, 1997).

### 3.3.2 Muerte celular programada durante el desarrollo de las plantas

La MCP es activada durante el proceso de desarrollo en plantas (Stryer *et al.*, 2003); Por ejemplo, durante la reproducción y el aborto de órganos florales. Algunas especies de plantas presentan flores unisexuales; sin embargo, la flor generalmente se inicia con la formación de los dos órganos sexuales reproductivos en los primordios florales. Cuando se genera una flor unisexual, generalmente uno de los órganos sexuales no se desarrolla, pues éste entra en un proceso de MCP. Recientemente se logró observar este proceso en maíz, con un gen que es similar al esteroide dihidróxido reductasa (Lockshin, 1998). La MCP se presenta en la formación de esporas femeninas, en un evento meiótico que resulta

en la formación de cuatro células haploides, (megasporas) de las cuales tres de ellas entran en MCP. Esto sucede en la formación de la megaspora funcional que forma al saco embrionario. (Lockshin, 1998). La MCP se presenta también durante la maduración del polen, cuando el tapete que está alrededor del lóculo del microsporangio sufre MCP (Lockshin, 1998).

La MCP está presente también durante la embriogénesis y la germinación en plantas. En el embrión, dos linajes de células son formadas en la primera división del cigoto. Una de ellas es para la formación del embrión y la otra formará el suspensor y cuando el desarrollo del embrión ha llegado a una etapa avanzada, el papel del suspensor se completa y entra en MCP (Vachova, 2007).

El desarrollo y la germinación de los embriones depende de los nutrientes que se encuentran en la semilla. Estos nutrientes se encuentran en el endospermo, cuya degradación se lleva a cabo por enzimas líticas (Arends, 1990).

Goreysca (1993) describe que la MCP ocurre en sitios y momentos específicos, mediante un reporte que presenta evidencias citológicas y moleculares, basadas en la prueba de TUNEL.

Young *et al.* (2000) demostraron que la MCP ocurre durante el desarrollo del endospermo, particularmente en la aleurona y el endospermo central, ya que su función es abastecer de nutrientes a la semilla.

Rogers (2006) explicó por que hay muerte celular en flores, por que unas viven más tiempo que otras, demostrando en su estudio que hay estructuras que al terminar con su función, mueren como una muestra de ahorro energético.

Bozhkov (2008) llevó a cabo estudios para determinar la actividad de la metacaspasa mcll-Pa, dentro del proceso de muerte celular en la especie *P abies*.

#### **4 JUSTIFICACION**

El linaje de maíz poliembriónico BAP (Braquítico de Alta Poliembriónía) contiene entre el 55% y el 65% de semillas poliembriónicas, que al germinar producirán más de una plántula de maíz. Por lo que es importante estudiar los procesos que se llevan a cabo durante el desarrollo de estos embriones. Posiblemente uno de estos posibles es la muerte celular programada (MCP), que puede intervenir durante la formación de los embriones o incluso en la eliminación de los mismos en caso de tratarse de múltiples embriones, que se forman durante el desarrollo de una cariósida poliembriónica.

#### **5 OBJETIVO GENERAL**

Detectar la presencia de muerte celular programada (MCP) durante el desarrollo de semillas de maíz poliembriónicas del linaje BAP, como un posible mecanismo de eliminación de embriones.

#### **6 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Observar el número de embriones que se originan en el óvulo.
- Detectar si todos los embriones culminan su desarrollo.
- Determinar si es por el proceso de MCP el mecanismo por el cual son eliminados algunos embriones.

## **7 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Colecta del material biológico**

Se colectó el material biológico, que consiste en flores femeninas antes de la polinización, flores femeninas fecundadas y frutos maduros, en uno de los campos experimentales de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) denominado “ Dr. Mario E, Castro Gil”, ubicado en Tepalcingo, Morelos en las coordenadas 18° 16’ N y 98° 51’ O y una altitud de 1160 msnm y en el campo “Buenavista” que se ubica en Saltillo, Coahuila con las coordenadas 25° 21’ N y 101° 102’ O y una altitud de 1738 msnm. La colecta se realiza un día antes de la polinización siendo éste el día cero, el día de la polinización el día uno y así sucesivamente; la colecta de material se realizó cada cinco días, obteniendo las etapas 6, 11, 16 y 21 todas estas muestras se obtuvieron del campo ubicado en Tepalcingo, Morelos y las etapas 2, 3 ,4 y 5 del campo ubicado en Saltillo, Coahuila ( Fig. 4).

### **7.2 Polinización**

La polinización en ambos campos la llevaron a cabo estudiantes de la UAAAN. Se realizaron antes de que amaneciera, entre individuos provenientes de semillas poliembriónicas.

Los jilotes, nombre común que reciben las inflorescencias femeninas, se cubren con una bolsa de cera blanca para evitar que les caiga polen no deseado sobre los estigmas, sólo se cubren los jilotes con abundantes estigmas, los que son cortados con tijeras, para poder incrementar la probabilidad de fecundación. Posteriormente a la polinización, éstos son cubiertos de nuevo ( Fig. 5). Las inflorescencias masculinas se cubrieron con bolsas de papel kraft, para colectarlo, y evitar la pérdida de polen deseado (Fig. 5).

Las inflorescencias masculinas cubiertas por las bolsas se sacudieron fuertemente para obtener la mayor cantidad de polen, una vez que ha sido colectado todo el polen de todas las plantas, se junta en una sola bolsa y después se retiran las anteras de manera manual por medio de una hoja, para evitar el contacto directo con el polen (Fig. 6).

La inflorescencia femenina se desembolsa de manera rápida y se coloca cierta cantidad de polen sobre los estigmas y se vuelve a embolsar (Fig. 6).

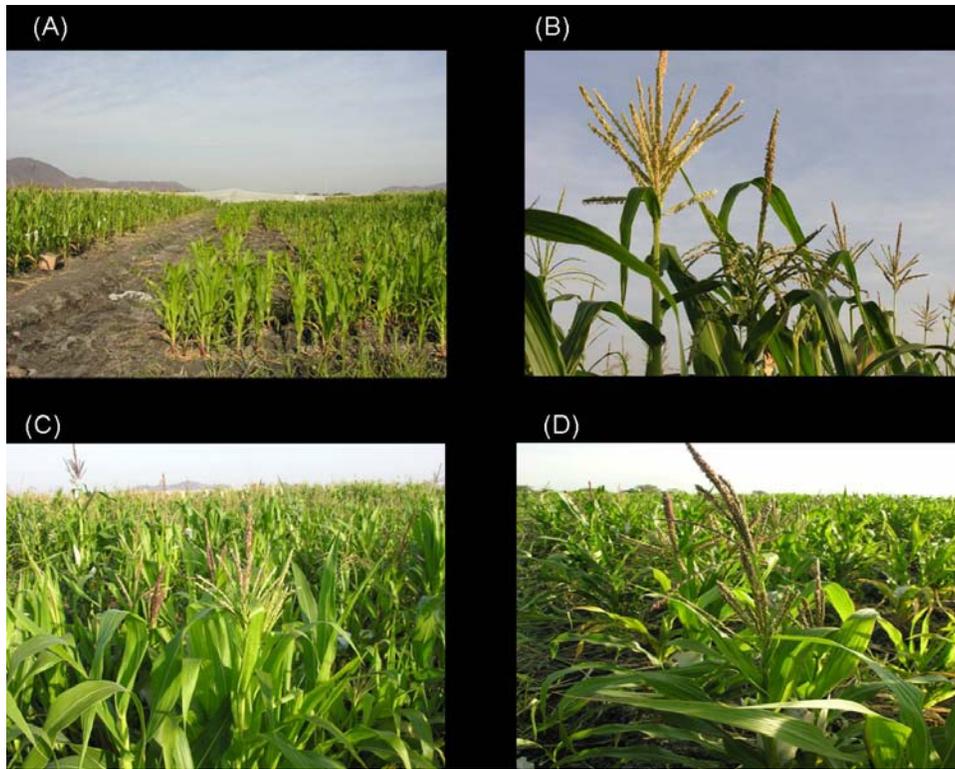


Figura 4. A,B, C y D distintas imágenes del campo de cultivo experimental “ Dr. Mario E, Castro Gil”, de la UAAAN en Tepalcingo, Morelos.



Figura 5. Polinización en campo experimental de cultivo de la UAAAN de Tepalcingo, Morelos. A) Inflorescencia masculina, B) Se embolsan las inflorescencias masculinas, C) La inflorescencia es sacudida para obtener el polen y D) Inflorescencia masculina embolsada.



Figura 6. Distintas fases del proceso de polinización del maíz en el campo de cultivo experimental “ Dr. Mario E, Castro Gil”, de la UAAAN en Tepalcingo, Morelos. A) Se recoge el polen en una bolsa, B) Se separa el polen retirando las anteras, C) y D) Polinización manual y embolsamiento de las inflorescencias femeninas.

La colecta de flores y frutos fue dividida en 10 etapas, de acuerdo al desarrollo del embrión del maíz. Siendo la etapa 0 momentos antes de la polinización, etapa 1 un día después de la polinización, las siguientes etapas se colectaron a partir de la colecta antecoro, catalogados de la siguiente manera día 2 (etapa 2), día 3 (etapa 3), día 4 (etapa 4), día 5 (etapa 5), día 6 (etapa 6), día 10 (etapa 7), día 15 (etapa 8), día 20 (etapa 9).

Las fechas de colecta para el material obtenido de los campos experimentales de Tepalcingo, Morelos, fueron las siguientes: 13, 14, 19, 24, 29 de marzo y 3 de

abril. Las fechas de colecta para el material obtenido del campo experimental Buenavista fueron del 28 al 31 de agosto, ambas en el 2008.

### **7.3 Procesamiento de las muestras**

Los frutos se fijaron en formaldehído al 4% con el amortiguador PBS 1x durante 24 hr, posteriormente se hicieron tres enjuagues con agua de 1 hr cada uno para seguir con la deshidratación gradual en alcohol. Se manejaron las técnicas de inclusión en Paraplast y de LR-white: los cortes en Paraplast se realizaron en un micrótopo de rotación, con un grosor de 8  $\mu\text{m}$  y para LR-White se hicieron en el ultramicrótopo con un grosor de 2  $\mu\text{m}$ . Las tinciones utilizadas fueron safranina - verde rápido y azul de toluidina, respectivamente (Lopéz *et al.*,2005).

Para poder obtener los cortes, se realizó una disección de los frutos, donde se eliminó el pericarpio, la cubierta seminal, toda la sección del endospermo y el escutelo, dejando solo los ejes embrionarios.

### **7.4 Prueba de TUNEL para la detección de muerte celular programada**

Para la prueba de TUNEL se obtuvieron cortes en paraplast de 8  $\mu\text{m}$  de grosor, los cuales se pusieron en portaobjetos especiales Superfrost (Fisher), para inmunolocalización, se desparafinaron durante 30 min a 60°C y posteriormente fueron colocados en Slide Brite durante 15 min, después se hidrataron en amortiguador de PBS 1x por 15 min. Se agregó la proteinasa K (dos gotas) y se

incubaron a 30-35° C por 15 min. Posteriormente se separó la láminilla, que fue utilizada como control positivo, a la cual se le agregó la DNAasa. El resto de las preparaciones se lavaron tres veces, con amortiguador de PBS, cada uno por 3 min y se esperó hasta terminar el tratamiento de la preparación del control positivo. También se separó la preparación que fue utilizada como control negativo (sin enzima TdT).

Para el control positivo: Se agregaron 50 µL de la solución con DNAasa I (3000 U/mL de DNAasa, en buffer 50mM tris-HCL, pH 7.5, 10 mM MgCl, 1 mg/ml BSA) se cubrieron los cortes con parafilm y se incubaron por 10 min, después, se lavaron tres veces con amortiguador PBS cada uno por tres minutos, se agregó 50 µL de la reacción de TUNEL (con enzima TdT, nucleótidos y fluorocromo) se cubrieron con parafilm y se incubaron por 1:30 h en una cámara húmeda, en oscuridad, a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó cada una de las muestras 4 veces, con amortiguador PBS por 3-5 min a temperatura ambiente (se mantuvieron en oscuridad entre cada lavado). Se montaron con medio de montaje DAKO más DAPI (4", 6-diamidino-2-fenilindoldihidrocloruro) en proporción 5:1 y se sellaron con barniz de uñas.

Para el control negativo: Se agregaron 50 µL de la solución de marcaje (sin enzima TdT), se cubrió la muestra con parafilm y se incubó por 1:30 h en una cámara húmeda, en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó cada una de las muestras 4 veces, con amortiguador PBS por 3-5 min a temperatura ambiente (se mantuvo en oscuridad entre cada lavado). Se montó

con medio de montaje DAKO más DAPI (4", 6-diamidino-2-fenilindoldihidrocloruro) en proporción 5:1 y se sellaron con barniz.

Las preparaciones se guardaron en refrigeración a 4° C en oscuridad y fueron observadas en el microscopio Confocal Olympus FV1000 y el microscopio Apotome Zeis.

## 8 RESULTADOS

Las flores femeninas (etapa 0 y 1) están constituidas por el estilo, la pared del ovario, y el óvulo, compuesto por la nucela, tegumentos y saco embrionario (Fig. 8 A). Es difícil observar el óvulo completo, debido a que con la inclusión en Paraplast el tejido se colapsa y porque la nucela está formada por células que se degradan de manera rápida después de la polinización.

En las siguientes etapas del desarrollo (2-6) se puede observar la presencia de un embrión, que corresponde a la fase de proembrión. Además del cúmulo de células propias de un proembrión (Fig. 7 B), se diferencia otra estructura que se conoce como el suspensor, hay de endospermo, que es del tipo nuclear, y también la aparición de algunas paredes celulares alrededor de los núcleos endospermicos. Estas descripciones se pueden observar claramente en etapas más desarrolladas 4 y 5 (Fig. 7 C y D). En imágenes además de las estructuras que acabamos de mencionar que se encuentran presentes podemos ver todavía a la nucela que se encuentra en proceso de desintegración.

Posteriormente el embrión empieza a diferenciarse, entra en la fase coleoptilar. En esta parte del desarrollo se conserva aún el suspensor y se hacen evidentes en el embrión los tejidos meristemáticos apicales y subapicales.

En las dos últimas etapas del desarrollo, ya se cuenta con todas y cada una de las estructuras que se presentan en la madurez del embrión. Se puede distinguir: el

escutelo, coleoptilo, la plúmula, la radícula, la cofia, la coleorriza. Estas características se pueden observar desde el día 11 y hasta el día 21, ya que no hay cambios evidentes en la organización. Los únicos cambios que se pueden registrar son en el tamaño de las estructuras.

En la etapa 21, se observan en una sola semilla dos brotes que comparten una misma radícula (Fig. 8 A y B).

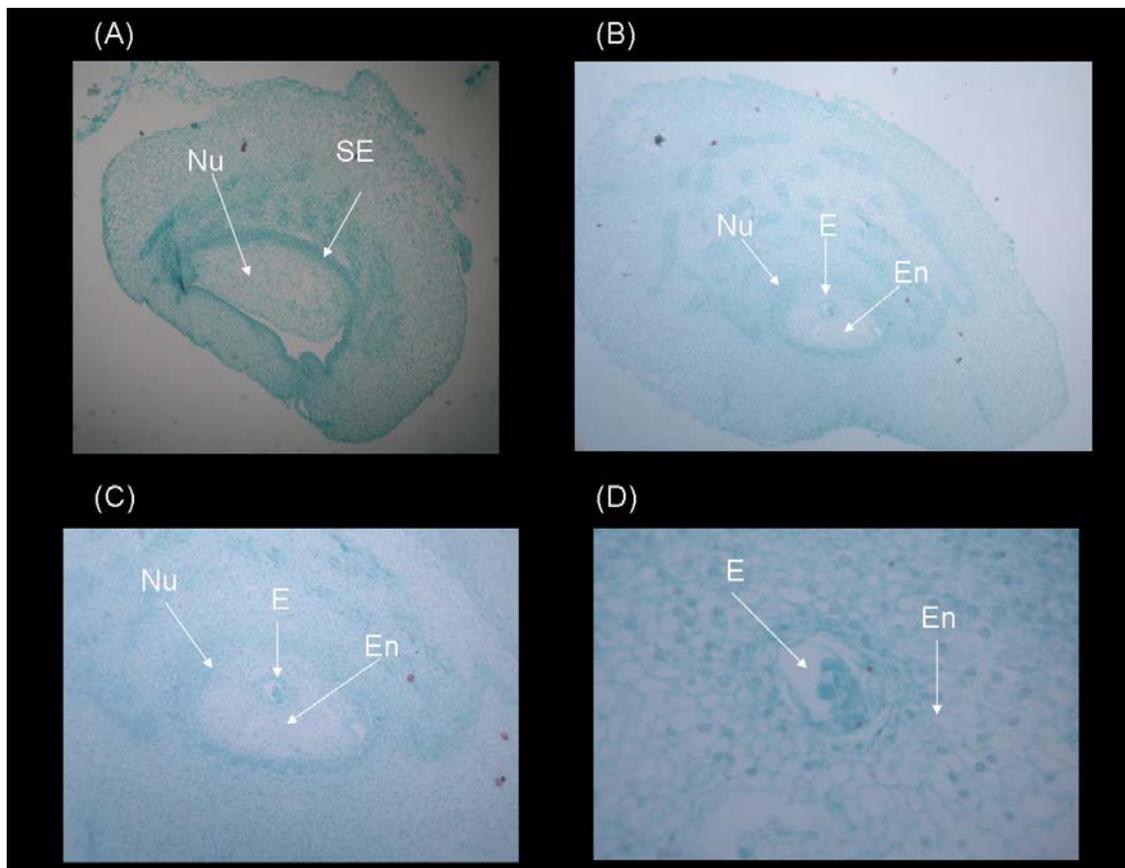


Figura 7. Inclusiones de semillas en paraplast con tinción safranina-verde rápido (cortes transversales) **A** Etapa 3 (1.5x). **B** Etapa 3 (5x). **C** Etapa 3 (10 x). **D** Etapa 3 (20 x). (E) embrión, (En) endospermo, (Nu) nucela, (SE) saco embrionario.

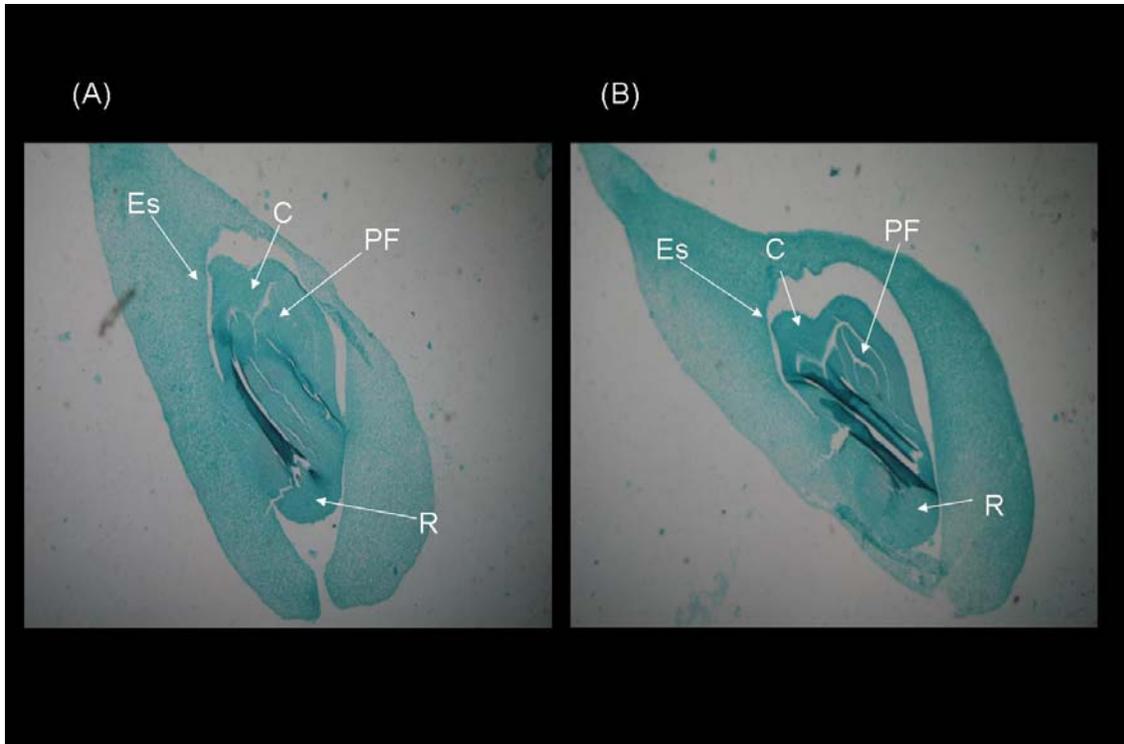


Figura 8. Cortes longitudinales de fruto de maíz de la etapa 21. tinción safranina-verde rápido. (C) coleoptilo, (Es) escutelo, (Pf) primordios foliares y (R) radícula.

### 8.1 Muerte celular programada

Para las muestras control se utilizaron cortes de diferentes etapas, al control positivo se le agregó previamente a la reacción de TUNEL, DNAasa. Al control negativo no se le agrega la enzima TdT, que es la encargada de unir los nucleótidos y el fluorocromo a los extremos libres de los nucleotidos, por lo tanto, como no hay incorporación de nucleótido no se observa la fluorescencia en los núcleos (Fig 9).

Los cortes observados a lo largo del desarrollo embrionario, demuestran que no se trata de una poliembrionía ya que es solo un embrión el que se origina durante

todo el proceso, este embrión cuenta con dos plúmulas y una radícula. Los resultados de estas pruebas demuestran que no hay eliminación de embriones ni de plúmulas en los casos donde se observan más de una, pues es sólo un embrión el que se forma y culmina su desarrollo.

En la etapa 1 que corresponde al día 1 después de la polinización (Fig. 10) se observa el DNA fragmentado en las células de la pared del ovario y en la nucela (Fig. 10).

En la etapa 3 se observa el DNA fragmentado en las células de la pared del ovario, el endospermo y en el embrión, el cual tiene poco tiempo de haberse formado. En el embrión la presencia de DNA fragmentado es muy poca (Fig. 11 y 12).

En la etapa 5 se observa la presencia de un embrión, que está en la etapa de transición del desarrollo, el cual se puede distinguir con bastante claridad y nitidez, éste se encuentra rodeado por el endospermo, que es el tejido de reserva que permite su desarrollo, en ambas estructuras se observa la presencia de DNA fragmentado, en magnitud mayor que en el endospermo (Fig. 13).

En la etapa avanzada del desarrollo, que es el día 21 se observa la presencia de DNA fragmentado, particularmente en la capa de células del escutelo que está rodeando a la radícula, también fue visible la presencia del DNA fragmentado en la

radícula. No se observa la presencia de DNA fragmentado en ninguna de las plúmulas. Todas ellas culminan su desarrollo (Fig. 14-15).

La MCP es un proceso que es muy evidente en las primeras etapas del desarrollo del embrión y se presenta de manera muy significativa en la región correspondiente al suspensor, llevando a la degeneración de éste, siempre respetando el patrón de desarrollo en cuanto tiempo y espacio.

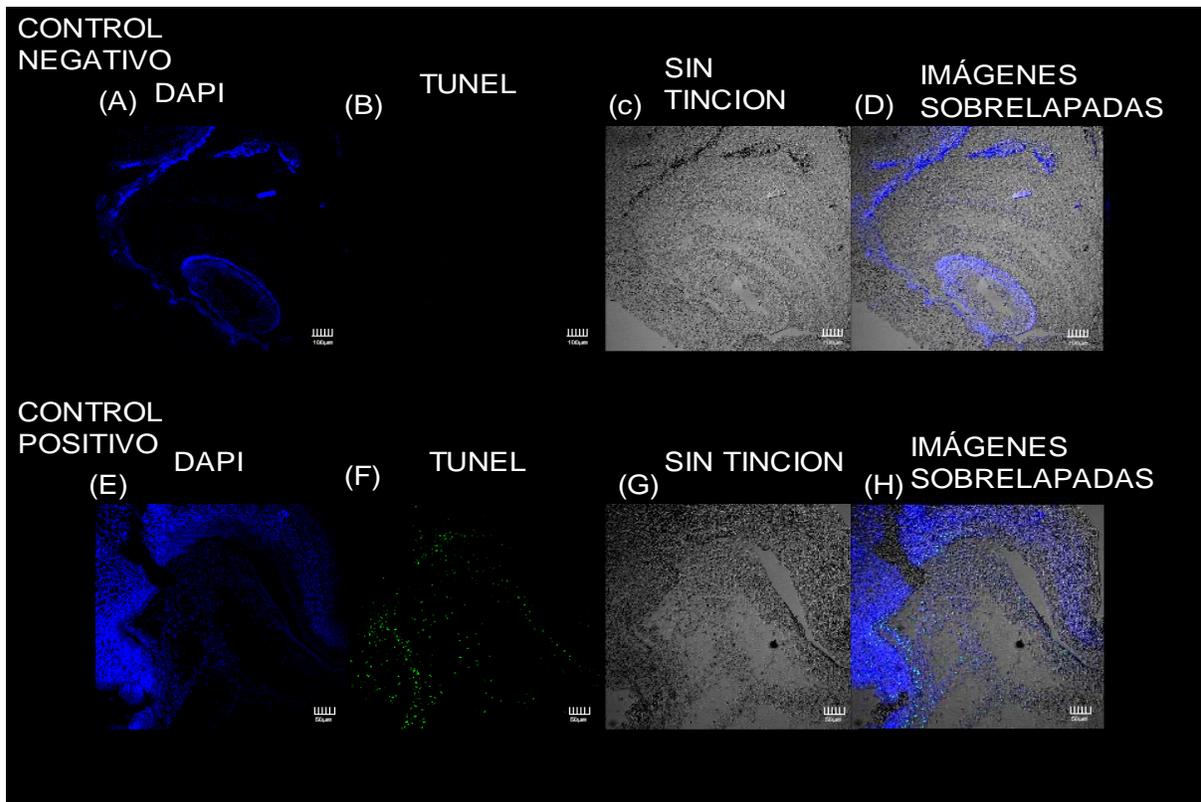


Fig. 9. Control negativo **A,B, C** y **D**. A este tejido no se le agrega la enzima TDT por lo que en la tinción de TUNEL no se observan núcleos fluorescentes

**A.** La tinción con DAPI (azul) evidencia los núcleos.

**B.** No se observa la tinción con TUNEL.

**C.** Imagen sin ninguna tinción.

**D.** Superposición de las imágenes A, B y C

Control positivo **E, F, G** y **H**. A este tejido se le agrega DNAasa para observar en todos los núcleos la fluorescencia con la tinción de TUNEL (verde),

**A.** La tinción de DAPI (azul) corresponde a los núcleos del tejido.

**B.** Se observa la tinción de TUNEL.

**C.** Imagen sin ninguna tinción.

**D.** Superposición de las imágenes A, B y C

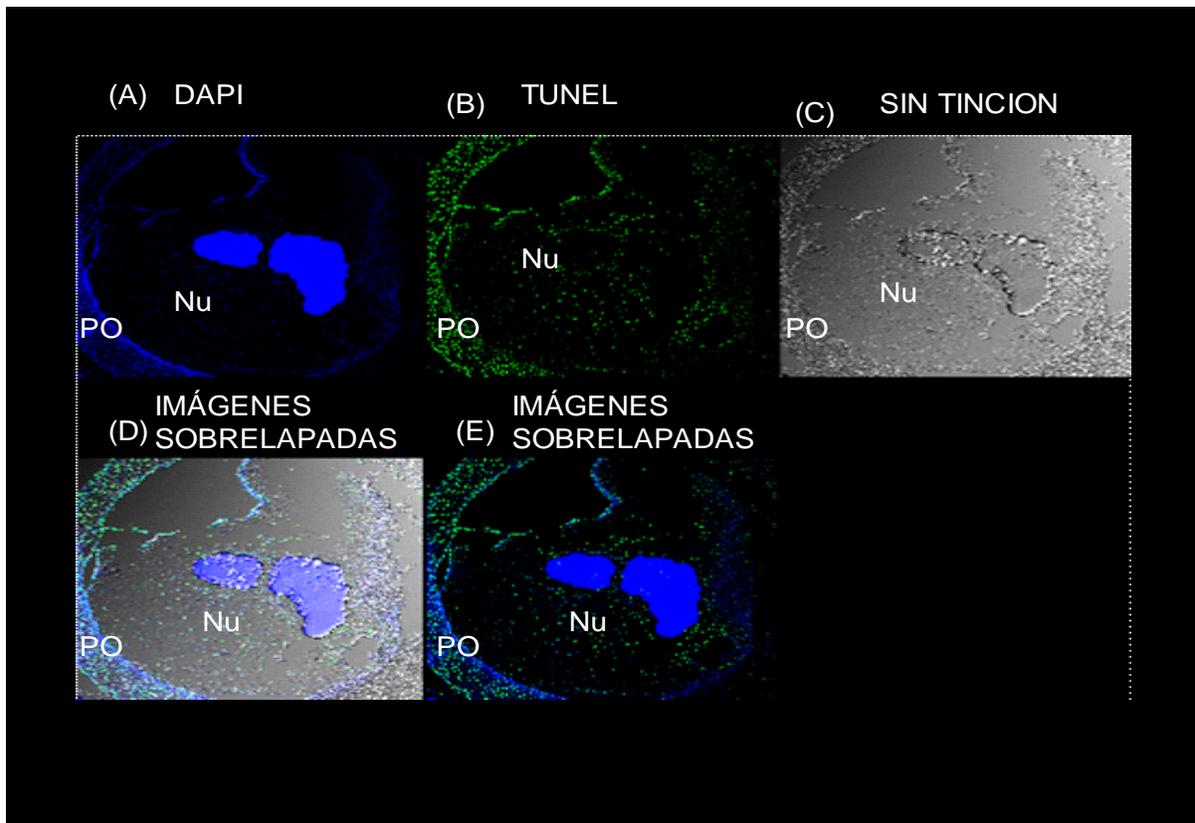


Fig. 10. Etapa 1, 10x, cortes longitudinales, se observan las estructuras pared del ovario (PO) y nucela (Nu)

- A.** Tinción de DAPI, se tiñen los núcleos del tejido en azul, en las siguientes estructuras; Pared del ovario y nucela.
- B.** Tinción de TUNEL, se tiñen los sitios donde hubo fragmentación de DNA de color verde en las siguientes estructuras; pared del ovario y nucela.
- C.** Imagen sin ninguna tinción.
- D.** Superposición de las imágenes A, B y C.
- E.** Superposición de las imágenes A y B (DAPI y TUNEL).

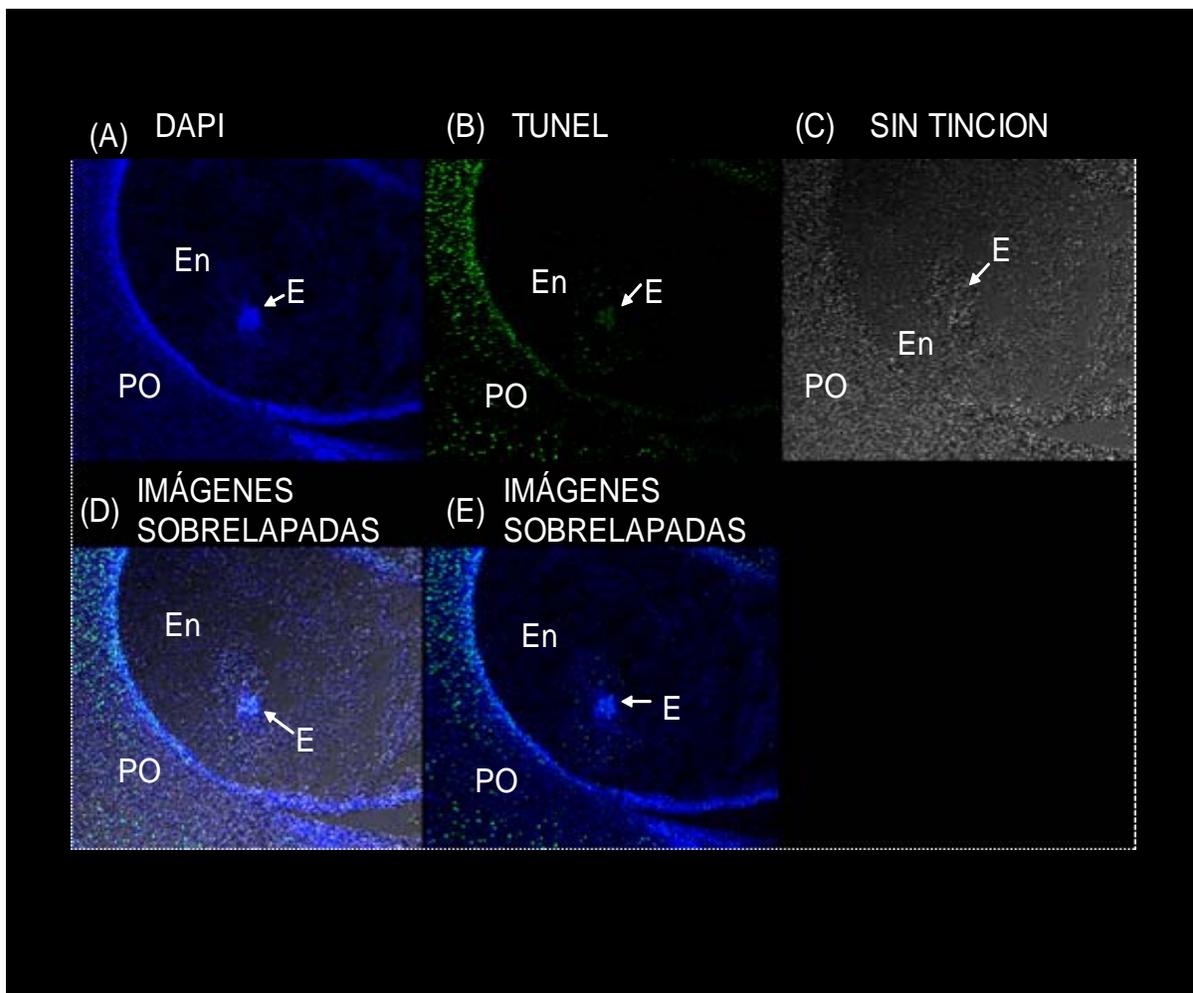


Fig. 11. Etapa 3, 10x, cortes transversales, se observa en estos cortes las siguientes estructuras; pared del ovario (Po), endospermos (En) y embrión (E).  
**A.** Tinción de DAPI, se tiñen los núcleos del tejido en azul, en las siguientes estructuras; pared del ovario, endospermo y el embrión.  
**B.** Tinción de TUNEL, se tiñen los sitios donde hubo fragmentación de DNA de color verde en las siguientes estructuras; pared del ovario, endospermo y embrión.  
**C.** Imagen sin ninguna tinción.  
**D.** Superposición de las imágenes A, B y C.  
**E.** Superposición de las imágenes A y B (DAPI y TUNEL).

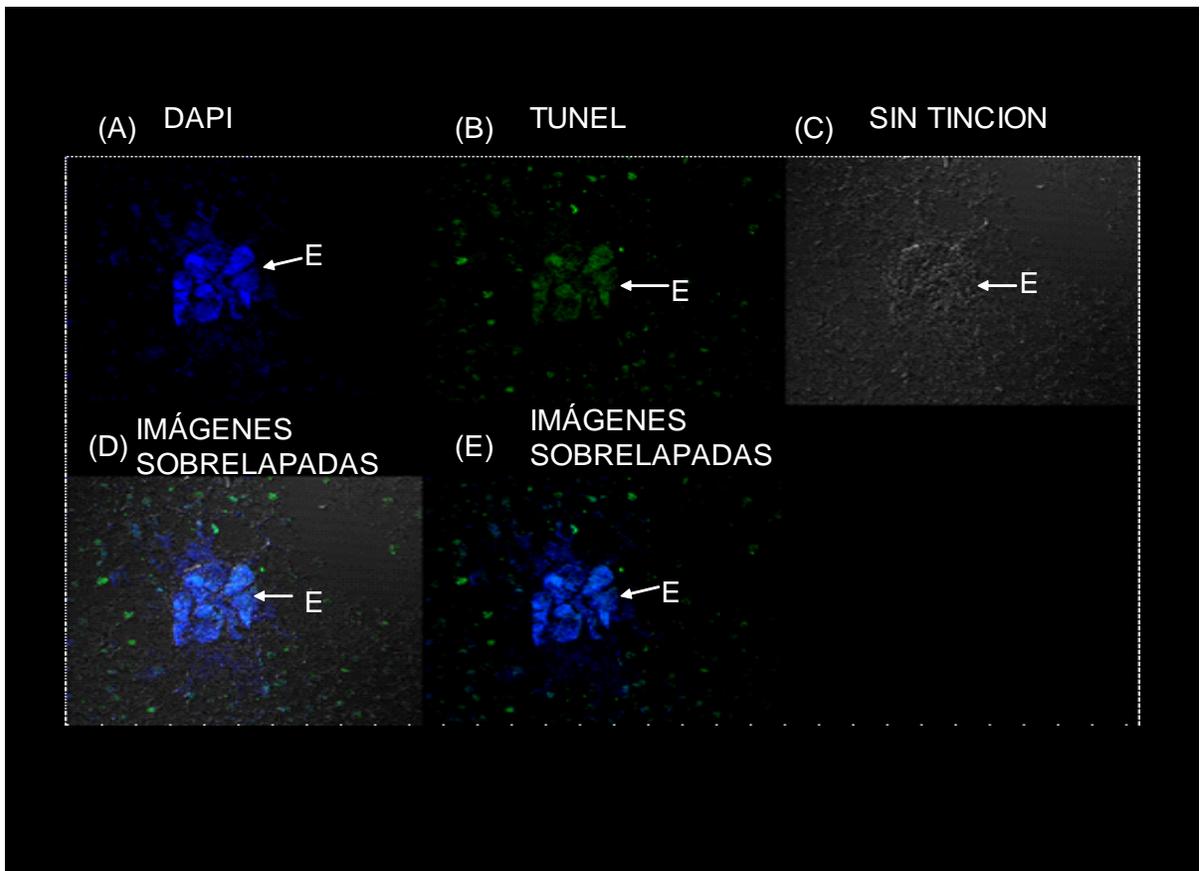


Fig.12. Etapa 3, 20x, corte transversal, se observa el embrión en una de sus primeras etapas de desarrollo.

- A.** Tinción de DAPI, se tiñen los núcleos del tejido en azul, en el embrión.
- B.** Tinción de TUNEL, no hubo fragmentación de DNA por lo que no hay tinción de núcleos en color verde en el embrión.
- C.** Imagen sin ninguna tinción.
- D.** Superposición de las imágenes A, B y C.
- E.** Superposición de las imágenes A y B (DAPI y TUNEL).

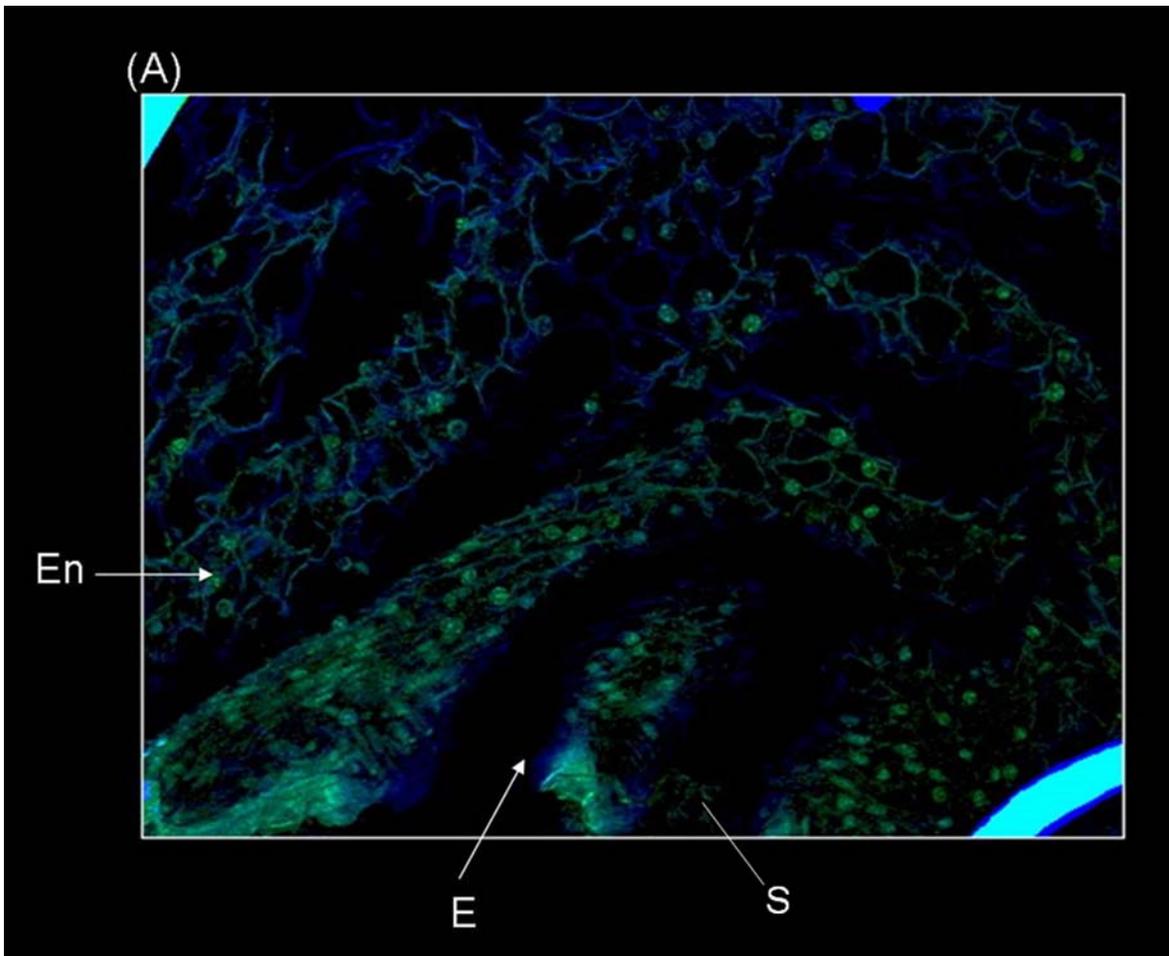


Fig.13. Etapa 5, 20x, corte transversal, se observa el endospermo (En), el embrión (E) en etapa de transición y el suspensor (S)

**A.** Superposición de las imágenes A y B (DAPI y TUNEL). Tinción de DAPI, se tiñen los núcleos del tejido en azul, en el embrión y en el endospermo. Tinción de TUNEL, se tiñen los sitios donde hubo fragmentación de DNA de color verde en las siguientes estructuras; endospermo y embrión.

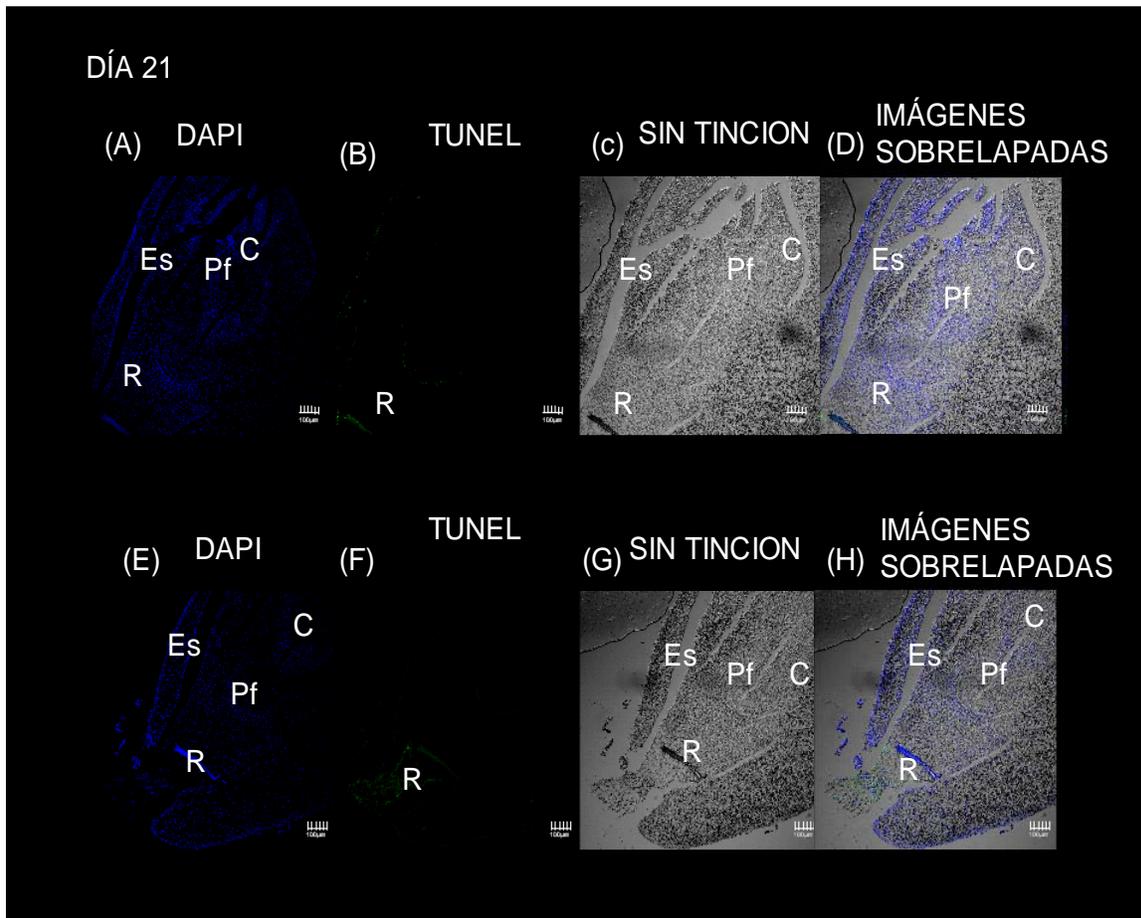


Fig. 14. Etapa 21, 10x A, B, C Y D, Etapa 21, 20x E, F, G y H, cortes longitudinales, se observan las siguientes estructuras; observamos el coleoptilo( C ), el escutelo ( Es), los primordios foliares ( PF) y la radícula( R)

**A.** Tinción de DAPI, se tiñen los núcleos del tejido en azul, en las siguientes zonas coleoptilo, el escutelo, los primordios foliares y la raíz

**B.** Tinción de TUNEL, la fragmentación de DNA se observa únicamente en la raíz.

**C.** Imagen sin ninguna tinción.

**D.** Superposición de las imágenes A, B y C.

**E.** Tinción de DAPI, se tiñen los núcleos del tejido en azul, en las siguientes zonas coleoptilo, el escutelo, los primordios foliares y la raíz

**F.** Tinción de TUNEL, la fragmentación de DNA se observa únicamente en la raíz.

**G** Imagen sin ninguna tinción.

**H.** Superposición de las imágenes F, G y H.

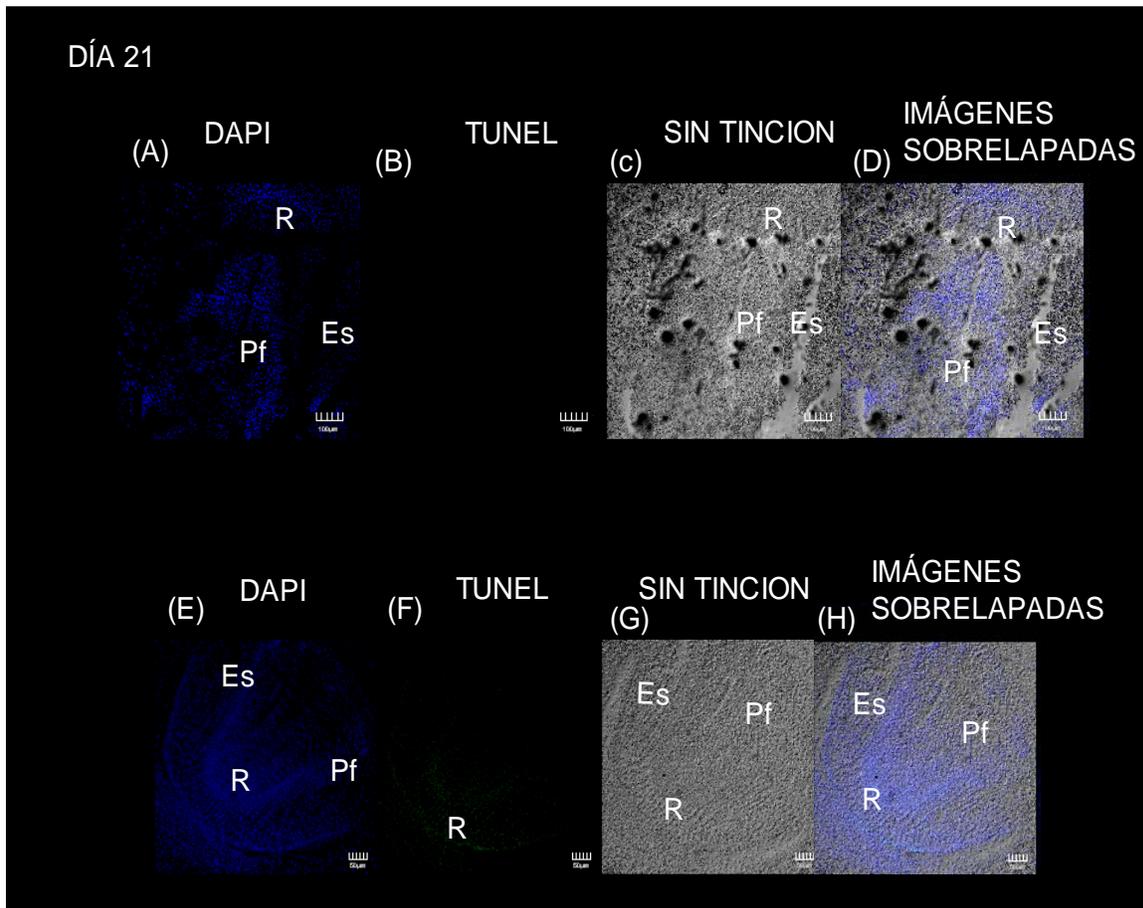


Fig. 15. Etapa 21, 20x, corte longitudinal se pueden observar las siguientes estructuras; escutelo (Es), primordio foliar (Pf) y radícula (R).

**A.** Tinción de DAPI, se tiñen los núcleos del tejido en azul, en las siguientes zonas coleoptilo, el escutelo, los primordios foliares y la raíz

**B.** Tinción de TUNEL, no se observa fragmentación de DNA en ninguna de las estructuras.

**C.** Imagen sin ninguna tinción, donde se pueden observar; la raíz, escutelo y los primordios foliares.

**D.** Superposición de las imágenes A, B y C.

**E.** Tinción de DAPI, se tiñen los núcleos del tejido en azul, en las siguientes zonas coleoptilo, el escutelo, los primordios foliares y la raíz

**F.** Tinción de TUNEL, la fragmentación de DNA se observa únicamente en la raíz.

**G.** Imagen sin ninguna tinción donde se pueden observar; la raíz, escutelo y los primordios foliares.

**H.** Superposición de las imágenes E, F y G

## 9 DISCUSIÓN

Este trabajo se inició bajo el supuesto de que en los frutos de la población BAP® ocurre el fenómeno de poliembrionía, como el propio nombre de la línea lo indica: Braquítico de Alta Poliembrionía y dado que el número de plúmulas por fruto sembrado varía de 2 a 6, se supuso que al haber más de un embrión, éstos debían estar bajo una situación de competencia, sobre todo si competían embriones cigóticos con adventicios y por lo tanto debería darse la muerte celular programada como un proceso natural de eliminación de embriones. A partir de las muestras embriológicas de esta investigación, las cuales constan de más de 100 frutos analizados, lo que se observa es la presencia de un único embrión a lo largo de todo el desarrollo. En las etapas avanzadas, se pueden observar diferentes plúmulas (siendo en este caso la mayoría correspondientes a dos brotes) compartiendo la misma radícula. Los resultados de este trabajo refuerzan un estudio previo, realizado por Pérez (2009), quien estudiando el desarrollo embrionario del maíz BAP®, y el origen de los mismos, obtenidos de los mismos lugares y al mismo tiempo que los utilizados en este trabajo, determinó que las semillas analizadas no son poliembriónicas, concluyendo que el fenómeno puede ser posible de algún modo, en el estricto sentido de la palabra. Nuestros resultados muestran que no se eliminan embriones ni plúmulas, ya que en cada una de las etapas de desarrollo que se muestrearon se observa la presencia de un único embrión y en etapas avanzadas del desarrollo se visualizan varias plúmulas y ninguna degenera.

Sin embargo, se sabe de otros casos en maíz de la misma población, donde se han observado sistemas radiculares que funcionan separados, estructuras embrionarias en las cuales han sido reportados coleoptilos independientes para cada una de las plúmulas y embriones completamente aislados (Dr. José Espinoza Velázquez, Instituto Mexicano del Maíz “Dr. Mario E. Castro Gil” de la UAAAN, en Saltillo, Coahuila. Comunicación personal), quien ha observado semillas que germinan en tres plántulas en los que dos son fenotípicamente iguales, y casos con cuatro plántulas con dos pares iguales en fenotipo entre cada 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 una proporción de un 10% a 15%); y finalmente casos de plantas con dos brotes fenotípicamente diferentes (menos del 5% de los casos).

Al descartar en este trabajo la suposición de poliembrionía en la población BAP®, se analizó la presencia de la MCP en los frutos de maíz, en particular en el desarrollo del embrión. Es aceptado que en la morfogénesis de las plantas se presenta la eliminación de cierto tipo de células en regiones específicas, lo que favorece la correcta formación de los órganos o estructuras. Se eliminan aquellas células que se presentan en exceso o que sólo se necesitan en cierta etapa (Giuliani *et al.*, 2002). Estudios realizados por Filonava; *et al.* (2002), han confirmado que en el caso de la ocurrencia de poliembrionía, la MCP es un mecanismo de eliminación de al menos uno de los embriones en desarrollo. El estudio consistió en descifrar el enigma que existía alrededor de la planta que presentaba poliembrionía monocigótica y es que sólo un embrión sobrevivía,

mientras que los otros eran eliminados en las primeras etapas. Ellos demostraron que la MCP era el mecanismo responsable de la eliminación de los embriones, *Pinus sylvestri*. (Pinaceae).

La MCP a pesar de que ocurre durante todas las etapas del desarrollo del embrión, no causa la aborción de ninguna de las plúmulas.

Con los resultados correspondientes a las primeras etapas de desarrollo, se pudo observar que la fragmentación del DNA se presenta en la nucela, que es un tejido que alimenta al embrión en desarrollo. La degeneración de la nucela en las plantas con flores, es un proceso que ocurre durante la ontogenia del óvulo, aunque existen algunas variaciones temporales y en el patrón espacial de la degeneración (Dominguez y Cejudo, 1998). Las células nucelares mueren inmediatamente después de la fecundación para el suministro de nutrientes al embrión y empieza el endospermo joven a presentar expansión.

En el desarrollo del embrión del maíz de la población BAP® la nucela empieza a degenerar cuando el endospermo comienza a desarrollarse, después de la doble fecundación, como ocurre en el trigo *Triticum aestivum* ( Linnestad *et al.*, 1998)

La MCP de la nucela gradualmente deja una cavidad dentro del óvulo que es llenada por el endospermo. La muerte celular en la nucela se inicia en una zona de células, próximas a la cara de la expansión del endospermo y se sugiere la participación de una señal de muerte, procedente del endospermo.

Cuando se analizó la prueba de TUNEL *in situ*, los resultados resultan positivos, indicando la fragmentación del ADN, y por lo tanto que la MCP esta teniendo lugar. La fragmentación del DNA nuclear es considerada una de las características típicas de la MCP (Domínguez *et al.*,1998; Linnestad *et al.*,1998)

En las etapas de desarrollo 2, 3, 4 y 5, donde se puede observar la presencia de un proembrión o de un embrión bien diferenciado, también se puede distinguir al suspensor, que se encuentra siempre debajo del embrión y de forma alargada. En recientes estudios, se ha encontrado que el suspensor tiene una clara función metabólica activa, es esencial para el transporte de nutrientes hacia el embrión y es una fuente importante de reguladores de crecimiento durante las primeras etapas de desarrollo (Boshkov, 2005). El suspensor es otra de las regiones donde se observa la presencia de fragmentación de DNA y éste, junto con la nucela, son las únicas zonas en las que ocurre teniendo como consecuencia la eliminación por completo de la estructura (Yeung y Meinke, 1993).

La fragmentación del DNA en el suspensor, se presenta desde la aparición del mismo, pero es más notable en las etapas intermedias 5 y 6. La completa degeneración del suspensor se da cuando el embrión está completamente maduro, lo cual es completamente normal en el proceso de la embriogénesis, su eliminación es entendible, pues se da cuando ha cumplido con su función, la cual es la de abastecer de nutrientes. El suspensor acompaña al embrión hasta que

este alcanza una etapa madura. También se sabe que el suspensor estimula el crecimiento del propio embrión (Yeung y Meinke, 1993).

En las etapas tardías del desarrollo, cuando el proceso morfogénico ha culminado, la presencia de DNA fragmentado es muy poco, excepto en pequeños sitios que corresponden al escutelo, como la capa de células que está rodeando a la raíz. Estos resultados, comparados con el estudio hecho por Guliani (2002) son positivos. Ellos demostraron la fragmentación del DNA en el escutelo, raíz y coleoptilo.

El escutelo es utilizado en la germinación de la semilla como una fuente de alimento para el desarrollo de los órganos del embrión; mientras que el coleoptilo cubre y protege a los primordios foliares del embrión (Schlinder *et al.*, 1995).

## 10 CONCLUSIONES

- En los frutos analizados, se encontró la formación de un solo embrión con múltiples plúmulas a lo largo del desarrollo de las semillas del maíz BAP.
- Se ha detectado la muerte celular programada en diferentes estructuras a lo largo del desarrollo embrionario en las semillas de maíz BAP®. Sin embargo, los resultados no muestran que este proceso forme parte de un mecanismo de eliminación de embriones.
- La muerte celular programada se localiza durante las primeras etapas principalmente en la nucela y parte de los tegumentos y en las etapas intermedias, principalmente en el suspensor y en las etapas tardías en el escutelo y la raíz embrionaria.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arends, M. S. Morris R. G.** 1990. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Sm. J. Pathol.* **136**: 593-608, 1990.
- Bortolini, R.** 1989. El maíz. Mundi-prensa.
- Bozhkov P, Suarez M.** 2008. Cysteine protease mclI-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *PNAS* 102 (40) 14463–14468.
- Buckner B, Janick Buckner D, Gray J, Johal GS.** 1998. Cell-death mechanisms in maize. *Trends Plant Sci.* **3**: 218-223
- Castro Gil, M.** 1973. Erect Leaved, Super Dwarf Corn for High Productivity. Boletín especial de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 28 pp.
- Castro, G. M.** 1979. Estudio sobre herencia y valor nutritivo de semillas con doble embrión. Avances de investigación en maíz, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México. pp.24-25.
- Castro Gil, M y Colaboradores.** 1978. Informe de Avances de Investigación en el Mejoramiento Genético del Maíz. Boletín Técnico UAAAN No. 1. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. pp. 42-43.
- Dellaporta, S.L. and A. Calderon-Urrea.** 1993. Sex determination in flowering plants. *The Plant Cell* **5**: 1241-1251.
- Dietrich RA, Richberg MH, Schmidt R, Dean C, Dangl JL.** 1997 A novel zinc finger protein is encoded by the Arabidopsis LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* **88**: 685-694.
- Dominguez F, Cejudo F.** 1998. Germination related genes encoding proteolytic enzymes are expressed in the nucellus of developing wheat grains. *The plant journal* **15**: 569-575
- Elinos-Báez C, Maldonado V.** 2003. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica de México* Vol **139** (5).
- Espinosa-O G.** Breve recopilación de anatomía de semillas. Colegio de Postgraduados.
- Espinoza VJ, Vega C, Navarro E.** 1998. Poliembriónia, una característica con potencial para incrementar el rendimiento y la calidad del grano y su aplicación en maíz. *Ciencia cierta* **19**.

- Filanova L, Von AS, Daniel G, Bozhkov PV.** 2002. Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed. *Cell Death and Differentiation* 9:1057-1062.
- Giuliani C, Consonni G, Gavazzi G.** 2002. Programmed cell death during embryogenesis in maize. *Annals of Botany Company.*
- Goreysca W, Gonj J, Darzynkiewicz Z.** 1993. Detection of DNA strand break in individual apoptotic cells by in the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay. *Cancer Research* 53: 1945-1951
- Greenberg J.** 1996. Programmed cell death: A way of life for plants. *PNAS.* Vol. 93, pp. 12094-12097.
- Judd, W. S., Campbell, C. S. Kellogg, E. A. Stevens, P.F. Donoghue, M. J.** 2002. *Poacea Plant systematics: a phylogenetic approach*, Sinauer Assoc, 287-292
- Kiesselbach, T.A.** 1980. The structure and reproduction of corn. Reprint of: Research Bulletin No. 161. 1949. Agricultural Experiment Station, Lincoln, Nebraska. University of Nebraska Press. p. 93.
- Lamb C.** 1997. Evidence for Programmed Cell Death during Leaf Senescence in Plants. *Plant Cell Physiol*; 39: 922-927
- Lam E, del Pozo O.** 2000 Caspase-like involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol. Biol.* 44: 417-428.
- Linnestad C, Doan D, Brown R, Lemmon B, Meyer D, Jung R.** 1998. Nucellin a barley homolog of the dicot vacuolar-processing protease, is localized in nucellar cell calls. *Plant Physiology* 118: 1169-1180
- Lockshin R, Zakeri Z.** 1998. *When cells die.* Wiley-Liss. Canada.
- López C, Márquez, G.** 2005. *Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas.* Facultad de Ciencias, UNAM, 2005.
- Morgan, D.T. JR.; Rappleye, R.O.** 1951. Polyembryony in maize and lily, following X-irradiation of the pollen. *J. Hered.* 42:91-93.
- Magnard, JL, Heckel T, Massonneau A.** 2004. Morphogenesis of maize Embryos Requires ZmPRLPM35-1 Encoding a Plastid Ribosomal Protein. *Plant Physiology* 134
- Pérez BP.** 2009. Origen de los brotes múltiples en la población de maíz UAAAN-IMM-BAP.

- Perez DY, Galindo CI. 2007** La muerte celular en plantas: es semejante a la apoptosis en animales?. *Interciencia* 32: 812-819
- Potten C.** 2004. *Apoptosis The life and death of cells.* Cambridge University.
- Rodríguez HS, Castro GM.** 1978. Estudio sobre herencia de semillas con dos embriones. *Avances de investigación en maíz, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México.* p.19.
- Rogers H.** 2006. Programmed Cell Death in Floral Organs: How and Why do Flowers Die. *Annals of Botany* 97: 309–315,
- Sanmartín M, Jaroszewski L, Natasha V.** 2005. Caspases. Regulating Death Since the Origin of Life. *Plant Physiology*, March 2005, Vol. 137, pp. 841–847,
- Schindler T, Bergfeld R, Schopfer P.** 1995. Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth. *Plant Journal* 7: 25–36.
- Shull, G. H.** 1909. A pure line method of corn breeding. *Am. Breeders Assoc. Rep.* 5:51-59.
- Stryer L.** 2003. *Bioquímica 5ª Edición.* Editorial Reverté.
- Studzinski G.** 1999. *Apoptosis a practical approach.* Oxford University Press. Gran Bretaña.
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM.** 2000. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell* 6: 961-967.
- Vernourd.** 2005. Maize embryogenesis. *Madyca* 50:469-483
- Young TE, Gallie DR.** 2000. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Mol. Biol.* 44: 283-301.
- Yeung E, Meinke D.** 1993. Embryogenesis in angiosperms: Development of suspensor. *The plant cell* 5 (1371-1381)