

**RELACIÓN ENTRE POLIEMBRIONÍA, APOMIXIS Y XENIA EN
MAÍCES POLIEMBRIÓNICOS**

MARSELINO CELESTINO AVENDAÑO SANCHEZ

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN FITOMEJORAMIENTO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

RELACIÓN ENTRE POLIEMBRIONÍA, APOMIXIS Y XENIA EN MAÍCES
POLIEMBRIÓNICOS

TESIS

POR

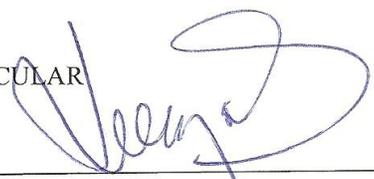
MARSELINO CELESTINO AVENDAÑO SANCHEZ

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como
requisito parcial, para obtener el grado de

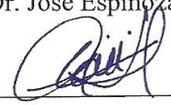
MAESTRO EN CIENCIAS EN FITOMEJORAMIENTO

COMITÉ PARTICULAR

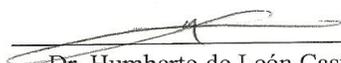
Asesor Principal:


Dr. José Espinoza Velázquez

Asesor:


Dr. Raúl Rodríguez Herrera

Asesor:


Dr. Humberto de León Castillo


Dr. Fernando Ruíz Zárate

Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Junio de 2012

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a Dios por darme la vida y guiarme en el camino del bien, así como, el conocimiento y la inteligencia para alcanzar una de mis metas más importantes, también por estar conmigo en todo momento y ayudarme en cada paso de mi vida y por cuidar de mis familiares y amigos.

A mi tan querida “**Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**”, por haberme preparado en el ámbito profesional, y darme la oportunidad de crecer como persona.

Al Dr. José Espinoza Velázquez por su valiosa asesoría, conocimientos y comprensión brindada para la realización de esta investigación, también por su confianza y apoyo que me brindo durante la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Raúl Rodríguez Herrera, por toda su disponibilidad, conocimiento y confianza brindada durante los trabajos de laboratorio.

A la institución encargada de darme los apoyos económicos en mi estancia en el postgrado, gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**).

A todos mis profesores que contribuyeron en mi formación profesional y aportaron sus conocimientos en todo momento.

A mis compañeros de generación y todos los que conforman el postgrado de la Maestría en Ciencias en Fitomejoramiento.

A los chicos y chicas del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, por haberme apoyado y brindado su amistad.

Gracias “Alma Mater”

DEDICATORIA

A mis padres:

Soledad Sánchez Santiago y **Fidel Avendaño Santiago** por haberme brindado incondicionalmente todo su apoyo necesario en mi formación y desarrollo profesional, que con mucho sacrificio hicieron posible que mi sueño y la de ellos se hiciera realidad el de convertirme en un profesionalista y hacer de mí un hombre de bien, gracias por su apoyo y confianza pero sobre todo por el amor y cariño depositados en mí a lo largo de mi vida.

A mi esposa e hijo:

Quiero dedicar este trabajo a mi esposa **Juana Elena Tapia López** y especialmente a mi hijo **Alan Edgardo Avendaño Tapia** que son mi mayor motivación para seguir adelante en esta vida. Gracias por apoyarme en los momentos difíciles y darme el amor y la felicidad que todo ser humano necesita para seguir en este mundo lleno de esperanza.

A mis queridos abuelitos:

Susana Santiago Silva y **Benito Avendaño Hernández**. Quienes han sido el ejemplo para mí y me han brindado sus buenos consejos sobre la vida.

A mis hermanos:

Alejandra, Carmen, Santiago, Fernando, Jaime, Salvador y Cesar Antonio. Por su gran amistad, apoyo y comprensión haciendo posible la culminación de mis estudios. Así como también por el gran amor que nos ha unido y que ha sido el pilar en la unión de nuestra familia.

A mis queridos sobrinos:

Iván, Olga, Elsa, Antonio, Laura, Carlos, Jesús, Alex, Marisol, Ángel y Mayra, ojala y sea un ejemplo para ellos y le sirva de estímulo para su formación profesional.

A mis cuñadas:

Francisca, Maribel y Reyna por su apoyo moral que me brindaron cuando lo necesitaba y darme palabras de aliento para seguir adelante.

Y a todos mis familiares

Primos, primas, tíos, tías; que confiaron en mí y me aconsejaron para andar por el camino del bien y hoy más que nunca me siento orgullosamente feliz de tener una familia como ustedes.

Al mi asesor de tesis el Dr. José Espinoza Velázquez y su esposa, doña Rosario, por su confianza y apoyo que incondicionalmente me brindaron. Que ya son parte de la familia.

A mis amigos de la generación:

A mis amigos de generación, Abel y Reyna. A todos ellos gracias por su valiosa amistad, pero sobre todo el apoyo que me brindaron en los momentos difíciles, gracias por ser mis amigos y pasar conmigo esos momentos que nunca olvidare.

A mis amigos de prepa:

Andrés Patricio (Cholo), Benito (Malo), Avelardo (Avestruz), Oscar (Acordeón), Humberto (Primo) Vicente (Huesero), Fausto, Mary, Marga, Feli, Ulises (abuelo) y Luchi. Siempre los recordare por ser parte de mi vida y por su gran amistad que me brindaron.

COMPENDIO

RELACIÓN ENTRE POLIEMBRIONÍA, APOMIXIS Y XENIA EN MAÍCES POLIEMBRIÓNICOS

POR

MARSELINO CELESTINO AVENDAÑO SANCHEZ

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
FITOMEJORAMIENTO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. JUNIO DEL 2012

DR. JOSÉ ESPINOZA VELÁZQUEZ----ASESOR---

Palabras clave: *Zea mays* L., poliembrionía en maíz, secuenciación de ADN, PCR, comparación de secuencias.

La poliembrionía (PE) en maíz es una variante mutante natural que implica modificación en su genoma, lo cual influye en su morfología de semilla-planta, y por lo tanto puede influir en la formación y desarrollo de dos o más plantas por semilla. El Instituto Mexicano del Maíz “Dr. Mario E. Castro Gil” de la Universidad autónoma Agraria Antonio Narro” (IMM-UAAAN) ha generado dos poblaciones de alta frecuencia PE (55 a 65 %) denominadas IMM-UAAAN-BAP (enana, de alta PE) e IMM-UAAAN- NAP (porte normal, de alta PE).

Actualmente, con base en estudios de análisis genético realizados en estas dos poblaciones se propone un modelo de herencia simple, por la vía de interacción génica epistática doble recesiva del tipo 15:1 en segregación F₂, y de 12:4 en cruza de prueba. Además, el carácter presenta penetrancia incompleta, expresándose generalmente hasta en un 50 % de los casos. El

origen exacto de la PE en maíz no es del todo conocido pero en base al historial poliembriónico y triploide de estas poblaciones y los trabajos preliminares sobre conducta reproductiva atípica en maíz, se puede plantear que las poblaciones de maíz PE, pudieran poseer capacidades de reproducción asexual por semilla, en alguna modalidad de apomixis.

Los objetivos de este estudio fueron: 1) determinar la relación entre apomixis y la poliembriónía en maíces IMM-UAAAN por medio de la secuenciación de una parte ADN genómico de plantas madre PE y sus progenies, y 2) estimar el efecto del grano de polen (xenia) sobre la poliembriónía mediante una serie de cruzamientos que involucra la condición PE, germoplasma exótico a la PE, y parentesco entre individuos.

El material genético utilizado incluyó germoplasma de las poblaciones IMM-UAAAN-BAP e IMM-UAAAN-NAP, así como de la línea S₆, AN-LCR-401-3. El establecimiento y manejo de los grupos se llevó a cabo en el ciclo P-V/2010 bajo condiciones de campo en Buenavista, Coah. Para el estudio de apomixis se obtuvieron 20 líneas S₁ y 20 familias de polinización libre (PLs). Para el estudio de Xenia se obtuvieron ocho cruzas, cuatro donde la hembra fue PE, y otras cuatro donde la madre fue No-PE; los progenitores machos fueron cuatro fuentes de polen, identificados como sigue: PERE (♂ PE, genéticamente emparentado a las hembras), ♂ PENORE (♂ PE, No-emparentado), ♂ NOPERE (♂ No-PE, emparentado) y ♂ NOPENORE (♂ línea S₆, No-PE y no emparentado con las hembras). Los experimentos se llevaron a cabo en dos fases: 1) la de campo e invernadero (en S₁, PLs y Cruzas, así como la evaluación de plántulas); y 2) la de laboratorio para el manejo de ADN. En (1) se evaluaron las progenies de todo tipo a través de las variables germinación (GER), poliembriónía (PE) y anomalías (DEF) en plántulas de 14 días de edad. En (2) se utilizó tejido foliar de madres e hijas para la extracción de ADN, así como la amplificación y secuenciación del mismo.

La extracción y análisis de ADN se llevaron a cabo por el método CTAB, realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias

Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila (UA de C) en Saltillo, Coahuila, México. El ADN obtenido fue amplificado mediante PCR utilizando los “primers” específicos para plantas (ITS) C26A y N18L. El amplificado se mandó a secuenciar a la empresa “MacroGenUSA” en Rockville, MD. El análisis y manipulación de secuencias se realizó con ayuda del programa BioEdit 7.1.3.

Se realizaron comparaciones de secuencias dentro de cada familia, planta madre- plantas hijas, así como, entre las hijas (familias de polinización libre PLs: PL2, PL4, PL5. Familias S₁: S3, S5 y S7).

Los resultados obtenidos en la evaluación de las progenies en invernadero mostraron una GER promedio por arriba del 90 %, condición favorable para líneas S₁ y progenies PLs. La PE se ubicó en el intervalo de 55 a 68 % . En líneas S₁, algunos casos alcanzaron una PE de 100 %, lo cual es poco frecuente material endogámico, observado en casos previos. Para las progenies provenientes de polinización libre, el promedio de PE estuvo en el rango de 55 a 62% lo cual está en el espectro de las poblaciones PE de origen, aunque es inusual teniendo polinizadores de todo tipo. Para el estudio de la fuente de polen (xenia) la PE fue siempre superior a 50 %, excepción hecha del cuarto tipo de apareamientos, sea ♀ PE x ♂ NOPE o ♀ NOPE x ♂NOPE, donde las progenies fueron 100 % normal, o sea No-PE. En este esquema de cruzamiento, se valida el tipo de herencia de la PE, en donde al cruzar una planta PE con otra genéticamente diferente (no PE), las progenies en la F₁ no expresan la poliembrionía, pero sí en la F₂ con una frecuencia esperada de 6.25 %. Además, presenta el fenómeno de penetrancia incompleta que puede llegar hasta un 50 %.

Es importante señalar que en el análisis de progenie de cruzas del tipo NOPE X NOPE (tercer esquema, apareamiento entre plantas individuales, pero nacidas dentro de la misma familia PE), aunque fueron cruzas entre plantas individuales, en todos los casos se presentó progenie con 52 % de plantas PE. Esto pudiera significar que las plantas progenitoras, aunque no manifestaron

fenotípicamente la PE, son de las plantas que aún portando los genes para poliembrionía no la manifiestan, ya que es obstruida por el fenómeno de penetrancia incompleta.

Los resultados en cuanto a la comparación de secuencias de ADN indicaron que dentro de cada familia del grupo PLs se presentó una similaridad de 70 a 90 %. En estos casos, no se tuvo control de polinizadores, y por lo tanto, el apareamiento fue aleatorio, pudiendo participar en el proceso polen de fuentes diversas, ya sea PE o No-PE y en menor grado, hasta autofecundación. Esta condición impacta fuertemente las diferencias de ADN en madres e hijas, aunado a la recombinación genética de la madre en la formación de gametos.

Las comparaciones dentro de las familias S3, S5 y S7, del grupo S₁, presentaron resultados específicos, acordes a lo esperado en casos de plantas emparentadas. Del conjunto de las 18 comparaciones posibles (una madre, tres plantas hijas, combinaciones de 4 tomadas de 2 en 2; tres madres distintas), las familia S3 y S7 presentaron cada una un caso de similaridad de 100 %, es decir secuencia idéntica de nucleótidos entre madre e hija. Estos casos fueron los resultados de las comparaciones S3 vs. S3P22 y S7 vs S7P22.

La identidad entre madres-hijas puede ser explicado de dos maneras: en cada familia, las plántulas hijas se originaron de una sola semilla, esta condición pudiera resultar de diversos fenómenos que alteran la formación normal del embrión, una de ellas es que una de las dos plántulas se originó de manera normal, por la vía de la doble fecundación (embrión 2n y endospermo3n) por eso es diferente a la madre, mientras que la segunda hija se originó de manera atípica en el saco embrionario, a partir de una célula germinal no-reducida, de dotación 2n, idéntica a la madre, y por lo tanto de probable origen apomíctico, o, en su defecto, podría provenir de una célula de la estructura somática que rodea al saco embrionario, como la nucela, y por lo tanto resultaría como un caso de poliembrionía adventicia.

Sin duda, los resultados sobre la similaridad resultante en la comparación de secuencias de ADN entre los genotipos señalados son muy interesantes, pero parece necesario que se haga más investigación sobre este fenómeno para precisar la probable relación entre poliembrionía y apomixis en maíz.

COMPENDIUM

POLYEMBRYONY, APOMIXIS AND XENIA RELATIONSHIP IN POLYEMBRYONIC MAIZE

By

MARSELINO CELESTINO AVENDAÑO SANCHEZ

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
FITOMEJORAMIENTO

(Master in Science Degree in Plant Breeding)

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MEXICO. JUNIO DEL 2012

DR. JOSE ESPINOZA VELAZQUEZ----ADVISOR---

Key words: *Zea mays* L., Polyembryony in maize, sequencing DNA, PCR, sequencing comparissons.

Polyembryony (PE) in maize is a natural mutant variant which implies genome modification which in turn leads to changes in the origin and development of two or more seedlings per seed. The Instituto Mexicano del Maíz “Dr. Mario Castro Gil”, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro” (IMM-UAAAN) have developed two maize populations with high PE frequency (55 to 65 %) named as IMM-UAAAN-BAP (dwarf and high PE) and IMM-UAAAN-NAP (normal height, high PE).

Nowadays, based on inheritance studies about PE in these two populations it was proposed a two loci simple model that include epistatic genetic interaction duplicated recessives of the 15:1 segregating type in F_2 and 12:4 in a test cross

proportion. Besides, the trait is accompanied of a 50 % incomplete penetrance. The exact origin of this maize PE is not clear at all, but based on its polyembryonic and occasional polyploidy phenotypes in those populations, as well as the atypical reproduction behavior, it is feasible to postulate that these PE populations could be capable to reproduce asexually by seed, in some kind of apomixis.

The objectives in this work were: 1) to determine any relation among polyembryony and apomixis in the IMM-UAAAN maize populations determining genomic DNA sequencing from PE mothers and their daughters plants; and 2) to determine the effect if any of the pollen grain in polyembryony based on the evaluation of a series of crosses among PE plants, exotic Non-PE plants and genetically related individuals in crossings.

The genetic materials used were germplasm of the IMM-UAAAN-BAP and IMM-UAAAN-NAP populations and the inbred (S₆) line AN-LCR-401-3. The field plots were established in Buenavista, Saltillo, Coah. During the Spring-Sumer /2010 cycle. For Apomixis, 20 S₁ lines and 20 OP half sib families were derived from the BAP population. For the xenia study, there were generated eight cross types, four when the female parents were the PE type plants, and the other four when they were Non-PE females, half of the mothers plants were derived from BAP and the other half from NAP populations. The male parents were four different sources of pollen, identified as follows: PERE (♂ PE, genetically related to females), PENORE (♂ PE, Non related), NOPERE (♂ No-PE, related) and NOPENORE (♂ line S₆, No-PE and non related to all females). The experiments were performed in two stapes: 1) The one under field and greenhouse conditions (for S₁, OP and Crosses derivation, and the seedlings evaluations), and 2) the lab work for the DNA studies. In (1) there were evaluated all progenies through the response variables, proportions of germination (GER), polyembryony (PE) and seedlings abnormalities (DEF) at 14 d of age. In (2) leaf tissue from mothers and daughters was used for DNA extraction, amplification and sequencing.

The DNA extraction and analysis were done by the CTAB method, in the “laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila (UA de C) en Saltillo, Coahuila, Mexico”. The extracted and appropriate DNA was amplified by the PCR method using plant specific primers (ITS) C26A and N18L. The sequencing was done by the “MacrogenUSA” enterprise, based on Rockville, MD, USA. The BioEdit 7.1.3 program was used for analysis and manipulations of the sequences.

There were realized sequence comparisons within each family, mother plant – daughters plants, and between sisters, twins or individual born plants (OP families: PLs: PL2, PL4, PL5. S₁ families: S3, S5 y S7).

Data for progenies evaluation under greenhouse conditions resulted in an average above 90 % for GER, which is well accepted for S₁ and OP polyembryonic progenies. PE average frequencies were in the 55 to 68 % interval. In S₁ lines, some got to 100 % frequency which is unusual for inbred PE materials previously observed. In the open pollinated progenies, the PE interval was 55 to 62 % which is in the range of the PE populations, but is also unusual given the contribution of all kind of pollinators. For the xenia study, the PE frequency was above 50 % for all crossings but exception with the PE or Non-PE females crossed to NOPEORE (the S₆ line) where all progenies were 100 % normal, which means Non-PE progenies. The results for the last scheme of crossing lead to a ratification for the Mendelian inheritance of this PE, in which a cross between a PE plant to other Non-PE, genetically different, the F₁ progeny will not show the polyembryonic phenotype, however, it could reappear in the F₂ progenies in an expected proportion of 6.25 % or a 50 % of that because of the effect of incomplete penetrance for this trait.

It is important to notice that the progeny for the cross type NOPE x NOPERE (the third cross type, mating between individual plants, born as such from a PE family) showed an unexpected 52 % of polyembryony. This situation could be explained under the consideration that an important proportion of the individual parents were in fact genetically constituted for PE but because of incomplete

penetrance they did not express the trait. When they mate, chances are for their progenies to get the PE genes and to express it phenotypically. The results observed in this work could be a validation of the incomplete penetrance associated to the PE trait.

The DNA sequences comparisons results showed that for the PLs group, the similarity of base to base within each family was in the interval of 70 to 90 %. In all those cases there were no pollination control, so the process was randomly and different pollen source were participating, PE, Non-PE and Selfing included. This situations could be the reason why the mother – daughters DNA differences, besides the genetic recombination in mothers when forming gametes.

Comparisons in the S₁ families group showed specific results according to the homology generated by the genetically related plants. From the 18 possible comparisons (one mother, three daughter plants, combinations of 4 taken 2 by 2; three different mothers), families S3 y S7 presented each a case of 100 % similarity. That's to say identical sequence between mother and daughter. This cases were the comparisons among S3 vs. S3P22 and S7 vs. S7P22.

The identity among mothers and daughters found in this work could be explained in two ways, as follows: in each family, the twin plants were growth from a solely seed. This condition may be a result of diverse phenomena that affect the normal embryo development; one of those is that one out of two seedlings was derived by the normal double fertilization sexual mechanisms (embryo 2n, endosperm 3n) so that genetically not identical to the mother plant. Meanwhile, the second twin plant was derived as an atypical manner in the embryo sac, from an unreduced germinal cell, with 2n chromosome number, identical to the mother plant, and that for it is a case of probably apomixis origin, or it could be originated from a cell belonging to the somatic tissue surrounding the embryo sac, as the nucela, and originated as the adventitious polyembryony.

Undoubtedly, the similarity found through out the sequence comparisons among the proper genotypes are quite interesting, however more studies are required to precise the probable relationship between apomixis and polyembryony in maize.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
Justificación.....	4
Objetivos	4
Hipótesis.....	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
Poliembrionía.....	6
Apomixis.....	12
Xenia.....	17
Secuenciación.....	18
Alineamiento de secuencias.....	19
Polimorfismo de ADN.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
Material genético	21
Manejo de la reproducción	21
Evaluación en invernadero	22
Extracción y Visualización del ADN.....	24
Cuantificación del ADN	27
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	27
Secuenciación.....	28
Alineamiento de secuencias.....	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
Evaluación en invernadero	31
Análisis de secuencias de DNA	35
Familia PL 2.....	35
Familia PL 4.....	37
Familia PL5.....	38
Familia S3	39

Familia S5	41
Familia S7	42
V. CONCLUSIONES	46
RESUMEN	47
VI. LITERATURA CITADA	50
VII. ANEXOS	56

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Germoplasma utilizado en el estudio de xenia.	21
Cuadro 2. Esquema de cruzamiento de diferentes genotipos PE y NOPE.	22
Cuadro 3. Etiquetado de muestras de madre e hijos para extracción de ADN para estudio de apomixis.	23
Cuadro 4. Etiquetas de muestras de las cruzas y progenies F1 en el estudio de Xenia.	24
Cuadro 5. Composición del coctel para PCR en una reacción.	28
Cuadro 6. Muestras de ADN secuenciados.	29
Cuadro 7. Comparación de secuencias de los progenitores y progenies.	30
Cuadro 8. Porcentaje promedio de las variables observadas en las 20 familias s1 en el estudio de apomixis.	32
Cuadro 9. Porcentajes promedio de las variables observadas en las 20 familias de polinización libre (PLs).	32
Cuadro 10. Porcentajes promedio para los diferentes tipos de cruzamiento aplicado en Xenia, donde la madre fue de naturaleza PE.	34
Cuadro 11. Porcentajes promedio en las diferentes cruzas aplicado en el estudio de Xenia con progenitor es de naturaleza NOPE.	34
Cuadro 12. Comparación de secuencias en la familia PL2.	35
Cuadro 13. Comparación de secuencias nucleotídicas en la familia PL4.	37
Cuadro 14. Comparación de secuencias nucleotídicas de la familia PI5.	39
Cuadro 15. Comparación de secuencias nucleotídicas de la familia S3.	40
Cuadro 16. Comparación de secuencias de nucleotídicas en la familia S5.	42
Cuadro 17. Comparación de secuencias nucleotídicas en la familia S7.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Progenie individual y doble de una línea S1.	25
Figura 2. Visualización de ADN extraído por el método de CTAB de plantas de maíz PE.	26
Figura 3. Amplificación mediante PCR de regiones ITS de maíz PE. Carril 1) Marcador de peso molecular (100 pb), carril 2) muestra 5, carril 3) muestra 6, carril 4) muestra 7, carril 5) muestra 8, carril 6) muestra 9, carril 7) muestra 10 de S5-10 P1, carriles 8-16) muestra 1-10 de S1-10 de p2-1.	28
Figura 4. Porcentajes de los sitios monomórficos y polimórficos en secuencias de DNA en familia PL2.	36
Figura 5. Sitios monomórficos y polimórficos en comparación de secuencias de ADN para la familia PL4.	38
Figura 6. Porcentajes de sitios invariables y polimórficos de comparación de secuencias de ADN para la familia pl5.	39
Figura 7. Similaridad en porcentajes de los monomórficos y polimórficos en comparación de secuencias de DNA para la familia S3.	41
Figura 8. Similaridad en porcentajes de secuencias en comparación de ADN para la familia S5.	42
Figura 9. Porcentajes de similaridad en la comparación en secuencias de ADN de la familia S7.	44

I. INTRODUCCIÓN

La diversidad genética del maíz es amplia, la cual confiere a la especie atributos importantes que la hacen fácilmente un modelo de estudio en la investigación científica, y un cultivo con gran capacidad productiva en términos agrícolas e industriales, bien adaptado en muchas regiones del mundo. En el contexto de la diversidad del maíz, una variante notable, aunque rara, es la poliembrionía (PE) que se refiere a la producción de dos o más plántulas por semilla, emergiendo simultáneamente desde el momento de la germinación. Como un mutante natural la PE aparece esporádicamente con frecuencia sumamente baja, sin embargo algunas versiones de ella presentan características de alto potencial en aplicaciones agronómicas. El fenómeno ha sido investigado desde los primeros años del Siglo XX (Randon, 1936 y Skovested, 1939), en los años treinta y cincuenta (Morgan y Rappleye, 1951), en los años setenta (Kermicle, 1969, 1971; Pesev *et al*, 1976; Castro, 1979) señalándose en todo caso la emisión de dos plántulas o más por semilla germinada.

En México, el Instituto Mexicano del Maíz “Dr. Mario E. Castro Gil” (IMM) de la UAAAN ha generado dos poblaciones PE que en la actualidad presentan frecuencias de 55 a 65 % del mutante, denominadas en forma breve como: BAP (enana de alta poliembrionía) y NAP (porte normal de alta poliembrionía). Al inicio de los trabajos en este tema los investigadores de entonces propusieron que esta PE se heredaba de manera cuantitativa (heredabilidad de 0.65; Castro, 1979; Espinoza *et al.*, 1998); sin embargo, los resultados de estudios posteriores en estas poblaciones han permitido proponer y validar un modelo de herencia cualitativa, controlada por dos loci en interacción génica epistática recesiva duplicada del tipo 15:1 en segregación F_2 y de 12:4 en cruza de prueba (Rebolloza *et al.*, 2011). La poliembrionía presenta además el fenómeno

de penetrancia incompleta (PI), por lo que el carácter se expresa generalmente en el 30 a 70 % de los casos.

Existen otras fuentes de PE en maíz donde la manifestación del carácter puede originarse por genes de efectos mayores (naturaleza monogénica). Uno de estos casos es el gen denominado *ig* (indeterminate gametophyte) el cual en condición homocigótica recesiva genera semillas con embrión monoploide en 3% de los casos y poliembrionía en 6% (Hallauer y Miranda, 1988). Otro caso de herencia simple lo reporta Pulu (2000) señalando que la PE se debe a un gen en condición homocigótica recesiva. El reporte de Pesev *et al.* (1976) permite suponer que la PE que ellos trabajaron es de naturaleza cuantitativa, ya que parten de la aparición del fenómeno en una población de maíz de donde seleccionaron los casos de semillas de dos o tres embriones y a partir de este grupo selecto derivaron líneas endogámicas, aunque la frecuencia PE en ellas no superó el 26 %, a pesar de la homocigosis que genera el proceso de autofecundaciones sucesivas.

La PE que contiene en las poblaciones del IMM-UAAAN se observó por primera vez en una población denominada SSE, base de los maíces Súper-enanos de la Narro. Originalmente, la condición de plantas gemelas se presentó en frecuencias de 1 a 2 % (Castro, 1979) y aunque se desconoce el origen exacto de esta poliembrionía, Espinoza *et al.* (2005), reportaron que en base al historial poliembriónico y poliploide de estas poblaciones y los trabajos preliminares sobre conducta reproductiva atípica en maíz, se puede plantear que las poblaciones de maíz BAP y NAP pudieran contener la capacidad de manifestar reproducción asexual por semilla, en alguna modalidad de apomixis.

A pesar de la atención que se ha puesto sobre el factor que induce y afecta la frecuencia de poliembrionía en diferentes especies, sus mecanismos y causas no son aún del todo claros. Webber (1940) señaló que muchos casos en la formación de células adventicias en angiosperma se refieren a la apomixis y que es muy probable que la PE y la apomixis puedan estar interconectadas.

Varios estudios han discutido la evolución de la apomixis y embriones adventicios sobre el tema de su similaridad, en lo que se refiere a la propagación asexual (Stebbins, 1941; Khoklov, 1976; Kaur *et al.*, 1978). Dado que falta una distinción clara entre PE, apomixis y embriones adventicios, todo lo anterior se asume por tener semejanzas en la reproducción asexual. Sin embargo, se distingue a la PE de los otros dos procesos sobre la base de su requerimiento de reproducción asexual y la composición genética de sus progenies.

La introducción de la característica apomixis a maíz se ha intentado a través de retrocruzas convencionales usando como fuente del fenómeno a especies del género *Tripsacum* de donde pueden generarse semillas viables de la hibridación intergenérica, las cuales fueron producidas de manera apomíctica cuando fueron polinizadas utilizando maíz común (Leblanc *et al.*, 1996). De aquí se desprende que la fuente de polen (efecto de Xenia) tiene influencia en el desarrollo de embriones apomícticos.

Aunque en México se han desarrollado poblaciones de maíces poliembriónicos (Espinoza *et al.*, 1998), se desconoce a plenitud el origen de la poliembriónía de estos grupos, así como la probable relación de ella con apomixis. Ahora, con la utilización de tecnologías generadas en la biología molecular es posible estudiar poblaciones de organismos y seleccionar aquellos que presentan rasgos de interés en la manifestación de los genomas.

Por otra parte, existen varias técnicas para identificar polimorfismos dentro de una familia de plantas, dentro de ellas se encuentran la amplificación y secuenciación de una parte del genoma utilizando iniciadores específicos. Los polimorfismos genéticos pueden utilizarse como marcadores para ayudar a establecer ciertos patrones biológicos además de establecer parentescos entre individuos. También se pueden determinar el flujo genético dentro de una misma especie y identificar poblaciones únicas e importantes (Checa-Caratachea, 2007).

En este trabajo se presenta un estudio en dos partes, la primera se propone determinar el efecto de Xenia, a partir de plantas hembra polinizadas con polen de plantas emparentadas y no emparentadas y con y sin poliembriónía para determinar el efecto de la fuente del polen sobre la poliembriónía en maíz. La segunda parte se refiere a la obtención y manipulación de ADN para secuenciar parte del genoma de maíz PE de plantas madres y progenies líneas S_1 y progenies polinizadas libremente con el propósito de determinar la relación entre la apomixis y la poliembriónía así como medir la diversidad genética entre las familias poliembriónicas.

Justificación

La PE en las poblaciones experimentales de maíz generadas en el IMM de la UAAAN presenta características deseables como alta calidad proteica y mayor cantidad de grasa cruda en el grano que la encontrada en maíz común. Estas cualidades son de alto valor nutrimental y pueden ser incluidas en el diseño de nuevas variedades especializadas. Además, su capacidad de semilla prolífica produce una mayor cantidad de materia seca por semilla de siembra. También se plantea como de gran utilidad llegar a conocer el detalle genético de este fenómeno para comprender la naturaleza biológica de la población. Un acercamiento en el estudio molecular permitirá conocer un poco más del origen de dos o más embriones por grano, y ver si la PE que se estudia está asociada con la xenia y la apomixis.

Objetivos

Determinar la relación entre apomixis y la poliembriónía en maíces IMM-UAAAN por medio de la secuenciación de una parte ADN genómico de plantas madre y su progenie poliembriónica (PE).

Estimar el efecto del grano de polen (xenia) sobre la poliembrionía mediante una serie de cruzamientos que involucra la condición PE, germoplasma exótico a la PE y parentesco entre individuos.

Hipótesis

La base genética de la poliembrionía en maíz IMM-UAAAN pudiera estar asociada con los fenómenos de apomixis y xenia.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Poliembrionía

La característica PE la presentan algunas especies de angiospermas y gimnospermas (Martínez y Gradziel, 2003). Entre ellas se encuentran la familia Poaceae (también Gramineae) a la cual pertenece el maíz (*Zea mays* L.). Una definición práctica de este fenómeno vegetal puede ser planteado como: la emergencia simultánea de dos o más plántulas a la germinación de una sola semilla y su posterior desarrollo completo hasta la fructificación. Los embriones adicionales que resultan de la diferenciación y desarrollo de varios tejidos materno y cigótico están asociados al saco embrionario. 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 ovulo y los eventos que pueden ocurrir en ambos tipos.

La poliembrionía puede surgir en angiospermas de cuatro diferentes 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 del mismo ovulo derivado de la misma célula madre de la megaspora o de células de la nucela, y 4) por la activación de una célula somática o esporofítica del ovulo para formar un embrión (Bhojwani y Bhatnagar, 1974).

La poliembrionía por cleavage genera 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).

Las células de las sinérgidas son más comunes dentro del saco embrionario para formar embriones, las cuales 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. Por otra parte, en el proceso pueden también involucrarse varios tubos polínicos que fecunden a la ovocélula, las sinérgidas y a los núcleos polares y lograrse el desarrollo normal del endospermo (Bhojwani y Bhatnagar, 1974). Los embriones antipodales ocurren más raramente; algunos autores cuestionan la posibilidad de formar embriones a partir de células antípodas (Johri and Ambegaorkar, 1984).

Los embriones que se forman de células esporofíticas ($2n$) se conocen como adventicios, y se generan a partir de células de la nucela y de tegumentos. En la poliembrionía nucelar, las células generalmente contienen un citoplasma denso y almidonoso, se dividen activamente y se convierten en masas embrionarias dirigiendo su camino hacia el saco embrionario, la activación de la célula puede ser autónoma o estimulada por la entrada del tubo polínico al saco o incluso por la polinización. Los géneros de especie vegetales angiospermas que se distinguen por tener poliembrionía nucelar son *Citrus* y *Mangifera* (Bhojwani y Bhatnagar, 1974).

El fenómeno PE en maíz se ha investigado por un poco más de 100 años, a juzgar por los informes publicados en diferentes años (Schrenk, 1894; Kempton, 1913; Weatherwax, 1921; Kiesselbach, 1926). En los años treinta (Siglo XX) se informó del hallazgo de plantas dobles provenientes de semillas individuales, las cuales se denominaron como plantas gemelas (twins) (según Randon, 1936; y Skovested, 1939, citados por Pésev *et al.*, 1976).

Análisis histológico dirigido a distinguir los tipos principales de PE en maíz investigado por Erdelska (1996) se pudo establecer que el fenómeno se produce de acuerdo al origen de los embriones, su localización en el grano (cariópside), diferencia en su estructura (tejidos comunes) y el tipo de germinación. De acuerdo con este autor, la PE se origina de tres maneras: 1) embriones gemelos de sacos multi-embrionarios que comúnmente están ubicados en lados opuestos, o a distancia en el grano, los cuales carecen de

tejidos comunes y germinan independientemente; 2) casos de gemelos o tripletes que provienen de células huevo individuales del saco embrionario o de células con capacidades multi-huevo que están estrechamente adheridas, pero separados por capas epidérmicas, con un endospermo en común; las plúmulas y radículas son independientes; y 3) el caso de los poliembriones originados por multiplicación de la célula huevo (cleavage) de manera espontánea o después de alguna inducción, los cuales comparten un suspensor común, parte del escutelo y capas superficiales de radícula; por ello, los embriones germinan con plúmulas separadas pero un solo complejo radicular.

Algunos autores como Erdelska y Vidovencova (1992) consideran dos tipos de poliembrionía en maíz de la línea VIR17, una es llamada suspensorial que al igual que la cigótica que describen Lakshmanan y Ambegaokar (1984) surgen embriones de manera espontánea en células del suspensor del embrión cigótico.

En cuanto al control genético, la poliembrionía (PE) en maíz ha sido reportada como un fenómeno de herencia simple y recesiva (Morgan y Rappleye, 1951; Kermicle, 1971; Pilu, 2000; Evans, 2007), pero también como de herencia cuantitativa (Pesev *et al.*, 1976; Castro, 1979; Espinoza *et al.*, 1998). De acuerdo con estos autores, la manifestación del carácter puede originarse por genes de efectos mayores (naturaleza monogénica) o poligenes (naturaleza cuantitativa). En el primer tipo destaca el denominado gen *ig*, el cual en condición homocigótica recesiva genera semillas con embrión monoploide en 3% de los casos y poliembrionía en 6% (Hallauer y Miranda, 1988), o por un gen de herencia recesiva, no identificado, como lo señala Pilu (2000). Sin embargo, Pesev *et al.* (1976), Rodríguez y Castro, 1978; y Castro, 1979, citados por Espinoza *et al.*, (1998) consideran que la herencia del carácter PE es cuantitativa; los últimos autores señalan que la PE con la cual trabajaron presentó una heredabilidad de 65%, calculada por el método de regresión progenie-progenitor medio.

La publicación de Pesev *et al.* (1976) informa de la ocurrencia de la PE en dos poblaciones de maíz, con una frecuencia inicial de 3.1%, observadas en el Instituto Yugoslavo del Maíz en los años 1963-1964. A partir de estas poblaciones se desarrolló un programa de selección para el carácter y la formación de líneas endogámicas; los resultados en 10 años de trabajo sirvió para generar 12 líneas endogámicas, cuya frecuencia PE varió de 2.1% a 25.3%, señalando la superioridad de estas semillas en contenidos de proteína y grasa cruda, así como por ciento de lisina, al compararlos con el maíz común.

Investigadores del Instituto Mexicano de Maíz “Dr. Mario E. Castro Gil” (IMM) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en Saltillo, México han generado grupos de maíz que concentran frecuencias altas del carácter mutante PE. Los trabajos en este tema se iniciaron en 1973 cuando se detectara cierto número de plantas “gemelas” en una población denominada Selección Súper Enana (SSE), la cual se integraba por plantas enanas de maíz. El porcentaje inicial de poliembrionía en ella fue de 1.5%; esta proporción de plantas gemelas fue aislada y manejada para cruzamientos intra-grupo, incrementando el número de familias participantes, las cuales fueron reproducidas en generaciones subsecuentes bajo esquemas de selección recurrente y llegar a formar la población de plantas gemelas. Al cuarto ciclo de selección se alcanzó una proporción de 33.3 % plantas gemelas (Castro, 1979). El proceso se continuó por varios ciclos y para el año 1991 se determinó que la población concentraba el fenómeno en 47%; en ese tiempo también se planteó la posibilidad de que la población habría alcanzado un techo o meseta, ya que no respondía a la selección para aumentar la frecuencia del carácter. A partir de esa fecha, se decidió separar a la población inicial en dos, generando las poblaciones denominadas “Gemelas Enanas” (PGE) y “Gemelas de altura normal” (PGN), y a las cuales se les continuó manejando a través de selección recurrente (Espinoza *et al.*, 1998).

Las dos poblaciones PGE y PGN del IMM-UAAAN se siguieron manejando reproductivamente por selección recurrente aunque con muy baja respuesta, tal

que para 1996 las proporciones de casos gemelares no alcanzaron el 50 %. A partir de 1997 se practicaron algunos ajustes en los procedimientos; se calificó a las familias en condición de plántulas de 14 días en lugar de 21 días (en charolas de germinación, bajo invernadero). La presión de selección se intensificó, pasando de una retención del 50 % al de sólo 20 %. Las familias identificadas como selectas en invernadero no fueron ya trasplantadas; en su lugar, se volvió al archivo de semilla remanente y se tomó una muestra de 60 semillas de cada una. Estas familias formaron las muestras de cada población a sembrar en campo, en dos repeticiones, de manera directa y hacerlas crecer como los progenitores de la siguiente generación. A partir de 1997 y desde entonces, este ha sido el esquema de manejo de las dos poblaciones (*Dr. José Espinoza Velázquez, enero, 2012, comunicación personal*). Los resultados de esta estrategia permitieron mejorar la separación real del enanismo y del porte normal de plantas; la respuesta a la selección mejoró rompiendo con la meseta de 47 % y llegando en la actualidad a una frecuencia de 65 a 68 % en las dos poblaciones; se ubicó mejor el fenómeno gemelar y se documentó de manera inequívoca que en las dos poblaciones se presentaban caso de dos, tres y hasta siete plántulas por semilla, germinadas de manera simultánea por lo que las poblaciones dejaron de nombrarse como “gemelas” cambiándolo por las denominaciones de: BAP, enana de alta poliembrionía; NAP, porte normal, alta poliembrionía.

En el periodo de 1996 a 2006, las poblaciones BAP y NAP, y sus derivadas por selección reversa, denominadas como: BBP (enana, baja PE) y NBP (porte normal, baja PE) se encuentran en una nueva meseta y su respuesta a la selección es mínima. Las derivadas BBP y NBP donde se selecciona en contra de la PE, respondieron de manera notable en los primeros cuatro ciclos, pasando de 60 % a promedios de 3 ó 4 % de PE. Las poblaciones base BAP y NAP, a quienes se sigue manejando para selección a favor de la PE, presentan frecuencia promedio que oscilan entre 60 y 70 %. Esta reiterada cancelación de la respuesta a la selección requirió de un replanteamiento en cuanto al mecanismo de herencia de la poliembrionía en estas poblaciones. En este

propósito, Rebolloza *et al.* (2011) trabajaron con las dos poblaciones (BAP y NAP) con el objetivo de conocer el tipo de herencia de la poliembrionía observada en ellas. Los resultados de sus estudios permitieron proponer un patrón de herencia mendeliano por la acción de dos loci, con interacción epistática del tipo recesividad duplicada 15:1 en segregación F₂, con una penetrancia incompleta del orden de 20 y hasta 50 %, esto en función de la procedencia del germoplasma exótico con que se cruce la PE.

Por otra parte, estudios embriológicos en especímenes de la población IMM-UAAAN-BAP llevaron a la conclusión que los fenotipos de plántulas múltiples observados podrían ser el producto de mutaciones que no afectan en el número de embriones, pero si en el 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 pro-embriónicas haciéndolas formar varios ejes embrionarios adheridas por ciertas estructuras (Pérez, 2009).

Gonzales *et al.* (2011) en un estudio sobre cantidad y calidad nutrimental de los granos PE, derivados de cruzamientos entre la población IMM-UAAAN-BAP (PE) y la Población Tuxpeño HO (alto aceite, AA) de CIMMyT, señalaron que los contenidos de grasa cruda y lisina pueden ser incrementados manejando diversas dosis de germoplasma señalado. Las combinaciones óptimas de germoplasma PE:AA para calidad nutrimental en grano fueron las combinaciones de 50:50 (Lis = 2.7 % y GC = 6.9 %), valores superiores al de maíz normal. La poliembrionía presente en BAP induce el valor más alto para lisina (4 %), mientras que la población AA influye para el valor más alto en grasa cruda (8.3 %).

El origen exacto de esta poliembrionía en maíz no está plenamente establecido. Espinoza *et al.* (2005), reportaron que en base al historial poliembriónico y poliploide de estas población y los trabajos preliminar sobre conducta reproductiva atípica en maíz, se puede plantear que las poblaciones de maíz PE del IMM-UAAAN, denominadas brevemente como BAP (braquítica

de alta poliembrionía) y NAP (normal de alta poliembrionía), pudieran poseer capacidades de reproducción asexual por semilla, en alguna modalidad de apomixis. La poliembrionía es un fenómeno raramente visible en el maíz; sin embargo, esta característica le confiere grandes beneficios debido a que se generan plantas con mayor productividad, competitividad y calidad nutritiva.

Apomixis

La presencia de este fenómeno en las plantas se refiere a la formación de semilla sin la participación de la fecundación, es decir es equivalente a la reproducción asexual a través de semilla. Es un método de reproducción en el que el embrión (semilla) se desarrolla sin la unión de la célula huevo con las células espermática. Esto es un proceso de reproducción que pasa por alto la meiosis masculina y la singamia que produce embriones genéticamente idéntico a la madre. Su terminología basada estrictamente sobre el proceso de desarrollo es extremadamente compleja y pueden ser imprácticos, especialmente para taxas que no han sido suficientemente estudiadas (Savidan, 2000).

La característica de un embrión apomíctico son que se derivan de células de tejido del ovulo materno y por lo tanto tiene los mismos genes que la madre de la que proviene y es capaz de generar progenies que serán clones a la planta madre (Koltunow, 1993).

La apomixis se desvía de la reproducción sexual en varios aspectos: modificación u omisión completa de la meiosis, formación de la megaspora no reducido, desarrollo del embrión partenogénicamente, desarrollo del endospermo autónomo o pseudogamo (Hanna, 1991; Sybenga, 1992; Willemse and Naumova, 1992; Koltunow *et al.*, 1995; Ramulu *et al.*, 1998).

La apomixis es un modo de reproducción asexual en el cual un óvulo se convierte en una semilla sin involucrar la meiosis y fertilización, por lo tanto, el embrión se forma de manera autónoma, sin la fecundación de la célula huevo.

Los procesos apomícticos han sido divididos en tres mecanismos: diplosporia, aposporia y embrionía adventicia. La diplosporia y aposporia resultan en la formación de una estructura mega-gametofítica sin la reducción meiótica, por lo que son comúnmente referidos como procesos apomícticos gametofíticos. En contraste, el embrión adventicio se inicia tarde en el desarrollo del óvulo y son iniciados directamente de las células individuales en los tejidos del ovulo que son externos al mega-gametofito, por lo cual, ha sido descrito como apomixis esporofítica (Kindiger *et al.*, 1997).

La apomixis está ampliamente distribuida entre las plantas superiores. Más de 300 especies que representa a 35 familias son apomícticas. Comúnmente está distribuida en géneros de las familias como: Gramineae, Compositae, Rosaceae, y Rutaceae (Bashaw, 1980; Hanna y Bashaw, 1987). El fenómeno es muy frecuente en cereales, entre ellos, el maíz, trigo y mijo perla que tienen parientes silvestres apomícticos. Por lo general, la apomixis es más prevalente en especies poliploides. Por ejemplo, *Tripsacum dactyloides* un pariente silvestre del maíz que es poliploide. La apomixis, ha sido reportado también en *Elymus rectisetus*, un pariente silvestre del trigo poliploide.

Generalmente, la desviación de los procesos de la reproducción sexual hacia la reproducción asexual, es especial en más de un aspecto (Nogler, 1984; Asker and Jerling, 1992). En general la apomixis se clasifica en dos tipos: (1) apomixis gametofítica y (2) esporofítica, embriones adventicios.

En la apomixis gametofita, el saco embrionario se produce de células iniciales no reducidas. La célula huevo se desarrolla partenogénicamente, dando lugar a embriones y plantas idéntica a la madre. La apomixis gametofítica puede ser obligada (predominantemente apomixis) o con algún grado combinado con la sexualidad (facultativa). Está fuertemente conectado con la poliploidía y raramente con organismos diploides. La apomixis gametofítica se divide en dos categorías: diplosporia y aposporia.

En la diplosporia, el saco embrionario no se reduce y están formados por células de la megaspora madre sin la ocurrencia de la meiosis. El embrión se desarrolla partenogénicamente de la célula huevo no reducido y el desarrollo del endospermo es autónomo (sin fertilización) del núcleo polar no reducido. Entonces, la polinización en la diplosporia no es necesaria. Koltunow (1993) clasifico a la diplosporia en dos categorías: diplosporia meiótica y mitótica.

En aposporia, el saco embrionario no reducido surge de células somáticas dentro del ovulo. Las células somáticas del ovulo donde se desarrolla el saco embrionario pertenecen a la nucela. Varias células de la nucela puede iniciar el desarrollo de aposporias pero comúnmente solo uno de ellos dan origen a un saco embrionario maduro. La aposporia inicia después de la diferenciación del MMC (célula madre de la megaspora). La megaspora se degenera y el saco embrionario de la aposporia ocupa la posición cercana del extremo micropilar del ovulo. El embrión se desarrolla partenogénicamente del huevo no reducido, pero se requiere de la polinización para el desarrollo del endospermo. La aposporia comúnmente está presente en gran número en la familia de los pastos (géneros: *Pennisetum*, *Cenchrus*, *Poa*).

El embrión adventicio se desarrolla en las células del tejido externo del saco embrionario sexual. Los embriones adventicios surgen de células individuales de dos diferentes tejidos somáticos, como son el nucelar e integumento (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984). Los embriones adventicios son puramente esporofíticos. Esto usualmente ocurre en presencia de la reproducción sexual normal y resultan en casos de poliembrionía. Se inicia después del desarrollo del ovulo y comúnmente se produce en óvulos maduros. Los embriones inician directamente de células individuales y no están rodeado por la estructura mega-gametofítica o saco embrionario. En contraste con la reproducción sexual, aposporios y diplosporios, en el que la célula que se desarrolla dentro del embrión es parte de una estructura megagametofítica conjunta (Koltunow, 1993). La embriónía adventicia comúnmente se produce en especies diploides. Las formas más comunes se encuentran en cítricos y mango.

La genética de las especies apomícticas ha sido poco estudiada. La información de la mayoría de las cruces entre individuos apomícticos y sexuales no han arrojado una información concluyente. Algunas de las dificultades son debido a la naturaleza compleja poliploide de las especies apomíctica. Powers (1945) investigó la herencia de la apomixis en *Parthenium argentatum* y postuló que dos genes son el responsables del modo de reproducción apomíctica. Mientras que el estudio apomíctico de Nogler (1984) demostró que la apomixis gametofítica (aposporia y diplosporia) implica la herencia monogénica. Savidan (2000) declaro que la apomixis es controlada por varios genes de carácter dominante.

Con el objeto de determinar la genética de la apomixis, Savidan (1981) utilizó la estructura del saco embrionario para discernir entre plantas apomícticas y sexuales, y la comparó con el comportamiento de la descendencia en ocho generaciones de cruzamiento en *Panicum maximun*; el autor reportó que la correlación entre las observaciones embriológicas y el comportamiento reproductivo es total y que la apomixis en esta especie está controlada por un par de genes, por la que lo definió como de herencia simple. De acuerdo a ésta y otras investigaciones posteriores se puede establecer que *Panicum maximun* (pasto guinea), un importante cultivo forrajero en la mayoría de los países tropicales, es una especie de apomixis apospórica y parece segregarse como un alelo dominante (Savidan *et al.*, 2001; Ebina *et al.*, 2005).

En algunos casos, las plantas apomícticas son heterocigóticas, y por lo tanto, con potencial capaz para la reproducción sexual, pero la presencia de un factor dominante de apomixis interfiere con estos procesos (Grossniklaus *et al.*, 2001). Las poblaciones apomícticas heterogéneas están conformado por la presencia de apomixis facultativa y la aparición de un nuevo progenie como resultado del apareamiento de los apomícticos (Hörandl and Greilhuber, 2002). La polinización y varios arreglos de cromosomas en poliploides también son factores importantes para que se inicie la apomixis (Roche *et al.*, 2001).

Los sistemas genéticos que controlan la apomixis varían en y entre géneros y especies vegetales. El control genético simple de la apomixis es deseable cuando se pretende llevar a cabo mejoramiento, debido a que simultáneamente se puede seleccionar para un alto nivel de apomixis y controlar las características indeseables de las plantas silvestre (Bashaw y Hanna, 1990).

A pesar de que ningún otro cultivo básico es apomítico, la reproducción asexual se da en los parientes silvestres de maíz (*Tripsacum*) y el mijo (*Pennisetum*). El *Tripsacum* es diplospórico y *Pennisetum* es apospórico. La apomixis gametofítica es un fenómeno controlado genéticamente que se hereda de forma Mendeliana simple. Curiosamente, el segmento de ADN que controla la apomixis se caracteriza por la supresión de la recombinación (Conner *et al.*, 2008; Grimanelli *et al.*, 2001).

La introducción de la característica apomixis a maíz se ha intentado a través de retrocruzas convencionales usando como fuente del fenómeno a especies del género *Tripsacum* de donde pueden generarse semillas viables de la hibridación intergenérica, las cuales fueron producidas de manera apomítica cuando fueron polinizadas utilizando maíz común (Leblanc *et al.*, 1996). De aquí se desprende que la fuente de polen (efecto de Xenia) tiene influencia en el desarrollo de embriones apomíticos.

Como se señaló anteriormente, la apomixis y la reproducción sexual siguen las mismas vías fundamentales en la inducción floral para la maduración hasta la formación de la semilla. Ellos difieren principalmente en la ruta por la cual una sola célula nucelar en el ovulo da origen a un embrión (Asker and Jerling, 1992). Parecido al enfoque mutacional, la ingeniería genética enfoca su prospección sobre la noción de que sólo un pequeño número de genes (y posiblemente un solo gen) puede determinar la ruta que se toma hacia el fenómeno (Gustine and Sherwood, 1992; Ozias-Akins *et al.*, 1993).

El cambio de la reproducción sexual al fenómeno de apomixis se da probablemente a la poliploidización y/o hibridación que induce una desregulación de las vías de su desarrollo (Grimanelli *et al.*, 2001). La principal ventaja de la apomixis sobre la reproducción sexual es la posibilidad de seleccionar individuos de plantas con características superiores y propagarlos clonalmente a través de semilla.

Xenia

El fenómeno se refiere a la situación donde el genotipo del polen influye el desarrollo del embrión o de tejido materno (como el endospermo) del fruto de forma tal que produce un efecto fenotípicamente demostrable sobre la semilla (King y Stanfield, 1990). Notablemente, el efecto de los genes del polen sobre el desarrollo del fruto o la semilla. En las plantas, este proceso ocurre cuando el polen poliniza y fertiliza exitosamente otra planta. La dispersión del polen puede representar una proporción significativa del flujo de genes en plantas que por mucho tiempo ha sido de interés para la agricultura, y esta acción significa un potencial de contaminación dentro de un sistema de producción (Levin y Kerster, 1974).

La influencia de xenia en la producción del grano de maíz se revela por la proporción del genoma del grano de polen en las dos estructuras resultantes de la doble fertilización, el embrión recibe 50% de aquél mientras que el endospermo recibe sólo el 33%. Se ha reportado un incremento de 2.6% en la producción de granos debido a xenia por esta contribución (Weingarther, 2002).

En el maíz se han realizado diversos experimentos para mostrar un defecto del origen y naturaleza del polen en el desarrollo del grano. Esto se ha expresado en la diferencia de peso entre los granos de autofecundación y los de fertilización cruzada, donde el peso del grano de fertilización cruzada aumentó 10.1% (Kiesselbach, 1926). Desde el punto de vista genético, la ventaja de fertilización cruzada o efecto xenia puede ser interpretada en

términos de complementación entre los genes del macho y de la hembra por algunos sistemas enzimáticos en términos de heterosis (Bulant *et al.*, 2000).

En el caso del maíz QPM (alta calidad proteica por el gen opaco-2), el efecto de xenia que produce el polen de maíz normal sobre plantas hembras reduce el contenido de aminoácidos esenciales en los granos; en el caso de lisina es de hasta en un 30% por lo cual los granos de maíz que provienen de plantas QPM llegan a tener una calidad proteica similar a la del maíz normal (Chasaigne *et al.* 2002).

Secuenciación

El genoma es el material genético almacenado en cada una de las células de un organismo. El término “secuencia” designa la composición de nucleótidos de una fracción de ADN o la de aminoácidos de una proteína. Esa fracción de ADN puede corresponder a un gen, un genoma, o a una parte de ellos. En términos comunes, “secuenciar” es determinar la estructura de una secuencia de ADN, es decir, el tipo y orden de sus nucleótidos.

La secuenciación de ADN se inició en la década de los años setenta del siglo XX; los métodos iniciales, aunque innovadores e importantes, fueron demasiado costosos, lentos y de poca eficiencia. Los dos métodos basales fueron los de Sanger y Coulson (1975) y el de Maxam y Gilbert (1977). El primero es conocido como el método “más y menos” o de “síntesis con iniciador” (*primed synthesis*) y donde el ADN es sintetizado *in vitro* de forma tal que es radiactivamente marcado y la reacción termina específicamente en una posición correspondiente a una base determinada. El segundo, es conocido como el “método químico” donde cadenas simples de ADN, marcadas con el isótopo radiactivo ^{32}P , se someten a varios procesos de rompimiento (cleavage) que selectivamente hace rompimientos en un lado de una base particular; los fragmentos son separados de acuerdo a tamaño por electroforesis en acrilamida e identificados por autoradiografía (King y Stanfield,

1990). Una versión resumida de las técnicas de secuenciación las presenta Adams (2008).

Alineamiento de secuencias

En los estudios detallados de moléculas o fracciones de moléculas de ADN, un alineamiento es la identificación de correspondencias. Alinear dos secuencias es poner una junto a la otra de forma que se resalten las diferencias y similitudes, pero sin cambiar el orden de los residuos. Existen varias maneras de hacer esto, aunque unas se prestan más a análisis que otras. Si se quiere saber cuál de las dos secuencias es más larga, se requiere simplemente alinear el primer residuo de la primera cadena con el primer residuo de la segunda y así sucesivamente para todos los residuos.

Un alineamiento por si mismo puede aportar información sobre las secuencias estudiadas. Datos como la homología y similitud aportan información valiosa para el investigador. La similitud es la medición del parecido y diferencia, independiente del origen de ese parecido. La homología significa, que las secuencias y los organismos en que están presentes descienden de un ancestro común. Por lo tanto, dos secuencias son homologas o no, y no hay una graduación intermedia (Claverie y Notredame, 2003).

Polimorfismo de ADN

Los polimorfismos de ADN son cambios en los nucleótidos como consecuencias de mutaciones (cambios en la estructura o secuencias de ADN de los genes) que han ocurrido durante la evolución, y que no han sido eliminadas por la selección natural porque no constituye ninguna desventaja por su portador (Castaño, 2000).

Un polimorfismo es considerado como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior a 1 %. Hay varios tipos de polimorfismo

(inserciones, deleciones, cambios en el número de secuencias repetidas) pero las más frecuentes son los polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) (Checa-Caratachea, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético

Material genético en el estudio de Apomixis. De una población de maíz PE denominada BAP (Braquítica de Alta Poliembrionía) se hizo una selección de 35 familias de medios hermanos (FMH) para formar un compuesto balanceado representado por 20 semillas por familia, con un total de 700 semillas. Este compuesto se sembró en el ciclo P-V, 2010.

Material en el estudio de Xenia. Se utilizaron cuatro familias de medios hermanos, de naturaleza PE, y una línea de alta endogamia (S_6) representante del maíz común, completamente ajena a las poblaciones poliembriónicas. De las cuatro familias PE, dos pertenecen a la población BAP y las otras dos a la población NAP. Cada material fue representado por una muestra aleatoria de 50 semillas. Los cinco genotipos se sembraron en el ciclo P-V, 2010.

Cuadro 1. Germoplasma utilizado en el estudio de xenia.

Germoplasma	Condición o característica	Origen, ciclo, año y lugar
D-364 BAP 09-S-F 5-3	Familia derivada de la población BAP-2008	UA-2009, Buenavista, Coahuila
D-372 BAP 09-S-F 18-1	Familia derivada de la población BAP-2008	UA-2009, Buenavista, Coahuila
C-243 NAP 09-S-F 4-1	Familia derivada de la población NAP-2008	UA-2009, Buenavista, Coahuila
C-247 NAP 09-S-F 9-1	Familia derivada de la población NAP-2008	UA-2009, Buenavista, Coahuila
AN-LCR-401-3	Línea endogámica, del IMM-UAAAN-2008	UA-2009, Buenavista, Coahuila

Manejo de la reproducción

El establecimiento y manejo de los grupos se llevó a cabo en el ciclo P-V/2010 bajo condiciones de campo en Buenavista, Saltillo, Coah. [25° 21' LN, 101° 02' LO, 1756 msnm].

Para el estudio de apomixis se siguieron dos estrategias en el manejo reproductivo; 1) dentro de la población BAP se realizaron 50 autofecundaciones con el fin de seleccionar las mejores mazorcas y obtener un total de 20 progenies S₁. 2) de igual forma, dentro de la misma población se obtuvo 20 familias de polinización libre (PL's).

En el estudio de xenia. Las 50 semillas de cualquiera de los cinco materiales se sembraron, semilla por golpe, en dos surcos de 5 m de longitud, la separación entre surcos fue de 80 cm. Dentro de cada familia PE se tomaron como hembras a las plantas dobles (PE) y a las que germinaron como plantas individuales (No-PE); como progenitor masculino se tomaron cuatro fuentes de polen, los cuales se denominaron como: PERE (plantas poliembriónicas genéticamente relacionadas), PENORE (poliembriónicas No-relacionadas), NOPERE (No-poliembriónicas relacionadas) y NOPENORE (No-poliembriónicas No-relacionadas). En cada combinación de cruzamiento se tomaron tres plantas y sus respectivas mazorcas. El plan de cruzamientos aparece en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Esquema de cruzamiento de diferentes genotipos PE y NOPE.

Progenitores	♂PERE	♂PENORE	♂NOPERE	♂NOPENORE
♀PE	PE PERE	PE PENORE	PE NOPERE	PE NOPENORE
♀NO PE	NOPE PERE	NOPE PENORE	NOPE NOPERE	NOPE NOPENORE

PE = Poliembriónico; NOPE = No-Poliembriónico ; PERE = Poliembriónico Relacionado (pariente); PENORE = Poliembriónico No-Relacionado; NOPERE = No-Poliembriónico Relacionado; NOPENORE = No-Poliembriónico No-Relacionado.

Evaluación en invernadero

Las progenies de todos los cruzamientos, tanto para el estudio de apomixis como de xenia fueron evaluadas en invernadero con la finalidad de caracterizarlas de acuerdo a germinación (GER), anomalías (ANOR) y frecuencia de la poliembriónia (PE). Cada familia fue representada por 20

semillas, con dos repeticiones, sembradas en charolas de germinación de 200 cavidades (dimensiones de la charola: 34 x 65 x 6.5 cm). La calificación de plántulas se llevó a cabo a los 15 días de la siembra. El diseño experimental utilizado fue uno completamente al azar con dos repeticiones.

Con la finalidad de extracción y análisis de ADN se tomaron muestras de lámina foliar en las plantas madres y sus progenies, tanto de las S_1 como de PLs. Debido a que el carácter poliembriónico es un fenómeno que puede producir uno (cuando no se expresa la PE), dos, tres o más plantas por semilla, las muestras de las plántulas de cada grano se tomaron por separados y etiquetado de forma individual. Las muestras fueron colocadas en bolsas de cierre hermético y almacenadas en congelación a -50° C para su posterior análisis de laboratorio. La identificación de las muestras se describe en los Cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Etiquetado de muestras de madre e hijos para extracción de ADN para estudio de apomixis.

Planta Madre	Progenies PLs			Planta Madre	Progenies S_1		
	Planta individual	Planta 1 de dos por semilla	Planta 2 de dos por semilla		Planta individual	Planta 1 de dos por semilla	Planta 2 de dos por semilla
1	P1	P2-1	P2-2	1	P1	P2-1	P2-2
2	P1	P2-1	P2-2	2	P1	P2-1	P2-2
3	P1	P2-1	P2-2	3	P1	P2-1	P2-2
4	P1	P2-1	P2-2	4	P1	P2-1	P2-2
5	P1	P2-1	P2-2	5	P1	P2-1	P2-2
6	P1	P2-1	P2-2	6	P1	P2-1	P2-2
7	P1	P2-1	P2-2	7	P1	P2-1	P2-2
8	P1	P2-1	P2-2	8	P1	P2-1	P2-2
9	P1	P2-1	P2-2	9	P1	P2-1	P2-2
10	P1	P2-1	P2-2	10	P1	P2-1	P2-2
11	P1	P2-1	P2-2	11	P1	P2-1	P2-2
12	P1	P2-1	P2-2	12	P1	P2-1	P2-2
13	P1	P2-1	P2-2	13	P1	P2-1	P2-2
14	P1	P2-1	P2-2	14	P1	P2-1	P2-2
15	P1	P2-1	P2-2	15	P1	P2-1	P2-2
16	P1	P2-1	P2-2	16	P1	P2-1	P2-2
17	P1	P2-1	P2-2	17	P1	P2-1	P2-2
18	P1	P2-1	P2-2	18	P1	P2-1	P2-2
19	P1	P2-1	P2-2	19	P1	P2-1	P2-2
20	P1	P2-1	P2-2	20	P1	P2-1	P2-2

Cuadro 4. Etiquetas de muestras de las cruzas y progenies F1 en el estudio de Xenia.

ID	Cruzamiento	Planta individual	Progenies	
			Planta 1 de dos por semilla	Planta 2 de dos por semilla
1	PE X PERE	P1	P2-1	P2-2
2	PE X PERE	P1	P2-1	P2-2
3	PE X PERE	P1	P2-1	P2-2
4	PE X PENORE	P1	P2-1	P2-2
5	PE X PENORE	P1	P2-1	P2-2
6	PE X PENORE	P1	P2-1	P2-2
7	PE X NOPERE	P1	P2-1	P2-2
8	PE X NOPERE	P1	P2-1	P2-2
9	PE X NOPERE	P1	P2-1	P2-2
10	PE X NOPENORE	P1	P2-1	P2-2
11	PE X NOPENORE	P1	P2-1	P2-2
12	PE X NOPENORE	P1	P2-1	P2-2
13	NOPE X PERE	P1	P2-1	P2-2
14	NOPE X PERE	P1	P2-1	P2-2
15	NOPE X PERE	P1	P2-1	P2-2
16	NOPE X PENORE	P1	P2-1	P2-2
17	NOPE X PENORE	P1	P2-1	P2-2
18	NOPE X PENORE	P1	P2-1	P2-2
19	NOPE X NOPERE	P1	P2-1	P2-2
20	NOPE X NOPERE	P1	P2-1	P2-2
21	NOPE X NOPERE	P1	P2-1	P2-2
22	NOPE X NOPENORE	P1	P2-1	P2-2
23	NOPE X NOPENORE	P1	P2-1	P2-2
24	NOPE X NOPENORE	P1	P2-1	P2-2

Extracción y Visualización del ADN

Los trabajos para la extracción del ADN se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Investigación en Alimentos (DIA) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila (UA de C) en Saltillo, Coahuila, México.

El material genético para la extracción de ADN se obtuvo de hojas de plantas adultas de maíz poliembriónicas (PE) en las plantas maternas (para apomixis) y de los dos progenitores para Xenia. Luego, se sembraron las

semillas progenies de los dos grupos de estudio para su evaluación fenotípica en condición de plántula; de las plántulas para el estudio de apomixis (S_1 y PLs) también se obtuvieron muestras de tejido foliar para extracción de ADN.



Figura 1. Progenie individual y doble de una línea S_1 .

La extracción de DNA se realizó de acuerdo con las recomendaciones del método bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) descrito por Ausubel *et al.* (1992), con algunas modificaciones que se describirán más adelante. Se pesaron aproximadamente 0.1g (100 mg) del material vegetal y se colocaron en nitrógeno líquido por un periodo de 20 minutos. Posteriormente, las muestras fueron maceradas a polvo fino con un mortero previamente esterilizado y congelado. El tejido macerado fue transferido a un tubo de 1.5 ml previamente esterilizado y etiquetado, al que se le agregó 1 ml de buffer de extracción CTAB mas 20 μ l de albúmina sérica bovina al 20%, en seguida se mezcló ligeramente en vortex y se llevó a baño maría a 55° C por 20 minutos. Luego se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos. El líquido sobrenadante se obtuvo con una micropipeta (aproximadamente 600 μ l) y se transfirió a un tubo de 1.5 ml, al cual se le agregó el mismo volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló por inversiones suaves durante 1-2 minutos y se pasó a la ultracentrífuga por 10 minutos a 12,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un tubo estéril de 1.5 ml mas 50 μ l de acetato de amonio 7.5 molar mas 800 μ l de etanol frío al 96%, se mezcló por inversiones suaves y se colocó en un congelador por 60 minutos. Posteriormente se centrifugo a 12, 000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. En seguida se lavó la pastilla dos veces

con etanol al 70% y finalmente se resuspendió el ADN con 80 μ l de NaOH 8 Mm, inmediatamente se pasó a un congelador con temperatura de -20°C .

La visualización del ADN, se llevó a cabo por bandeado electroforético, procediendo como sigue: en un vaso de precipitado estéril con capacidad de 125 ml se disolvió 0.5 de agarosa en 50 ml de buffer SB (borato de sodio) y se calentó la mezcla hasta disolverse por completo. A la mezcla se le agregaron 10 μ l de bromuro de etidio con una puntilla estéril. Inmediatamente después se vertió en la porta-gel preparado (el cual contiene un peine), el gel se deja solidificar de 15 a 20 minutos para después remover el peine. Posteriormente se colocaron las muestras de ADN (5 μ l + 3 μ l del colorante) en los orificios del gel, enseguida se colocó en la cámara de electroforesis a 90 volts. El gel corre por 30 minutos y por último se transporta al trasluminador. Se tomó la lectura cuidando mantener el menor tiempo posible el transluminador encendido. Se debe observar una banda intensa en la parte superior de cada muestra (Figura 2).

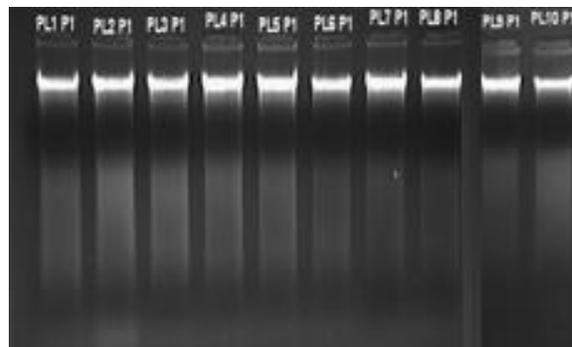


Figura 2. Visualización de ADN extraído por el método de CTAB de plantas de maíz PE.

Cuantificación del ADN

Para la cuantificación del ADN se realizó con el equipo Epoch™ Sistema Espectrofotómetro Micro-Volúmenes, el cual combina las técnicas entre el Espectrofotómetro para Microplacas Epoch™ de BioTek y la nueva placa Micro-VolúmenesTake3™. Este equipo permite obtener rápidamente coeficientes de 260/280, en muestras de 2 µL de ADN para verificar la calidad y pureza del material.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Después de obtener ADN de buena calidad, se realiza la limpieza del área de trabajo con hipoclorito de sodio y alcohol al 70 %. En seguida, se sacaron las muestras y reactivos del congelador, se colocaron en baño de hielo por 8 minutos para que se descongelen gradualmente y se someten a un pequeño vortex. Posteriormente se elabora el coctel (cuadro 5) en el recipiente con hielo. Se depositan 23 µl del coctel a cada tubo de 0.5 ml, y luego se les adiciona 2 µl de cada muestra de ADN. En seguida, los tubos se colocan en un termociclador Px2 Thermal cycler, por 35 ciclos fueron con los tiempos y temperatura correspondientes en cada fase, como sigue: desnaturalización 95 ° C por 5 minutos y 94° C por 1 minuto; alineamiento a 50.3 ° C por 1 minuto; síntesis de ADN a 72 ° C por 1 minuto y 72° C por 5 minuto en la síntesis de ADN final. La reacción dura aproximadamente 3 horas. Una vez concluido los ciclos, se sacan los tubos y se coloca en una gradilla con hielo. En seguida, se prepara el gel de agarosa al 1.5 % utilizando un marcador específico de referencia para ver el tamaño del segmento amplificado (figura 3).

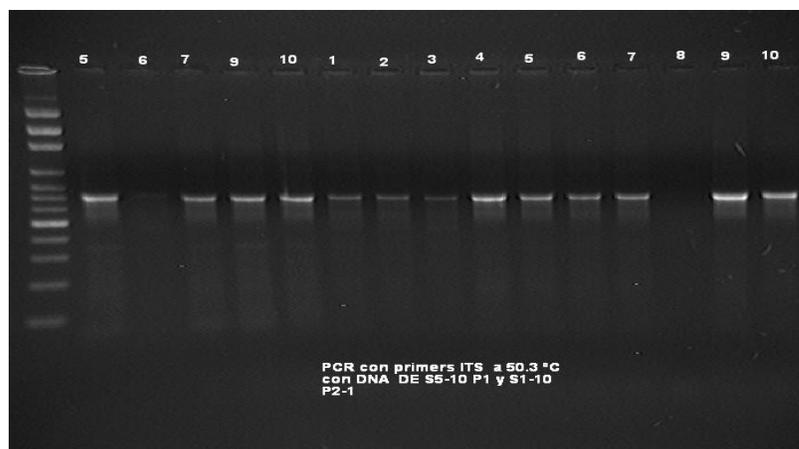


Figura 3. Amplificación mediante PCR de regiones ITS de maíz PE. Carril 1) Marcador de peso molecular (100 pb), carril 2) muestra 5, carril 3) muestra 6, carril 4) muestra 7, carril 5) muestra 8, carril 6) muestra 9, carril 7) muestra 10 de S5-10 P1, carriles 8-16) muestra 1-10 de S1-10 de p2-1.

Cuadro 5. Composición del coctel para PCR en una reacción.

Componente	Cantidad (μ l)
Agua DDE	14.5
Buffer 10X + MgCl	3.5
DNTPs	0.5
Primer derecho	2.0
Primer izquierdo	2.0
Taq-polimerasa	0.5

Secuenciación

El amplificado de ADN obtenido de la PCR se mandó secuenciar a la empresa MacroGenUSA Corp, 9700 Great Seneca Hwy. Rockville, MD 2085. De todas las amplificaciones realizadas sólo se mandó a secuenciar las muestras (Cuadro 6) que tuvieron mejor calidad en la visualización del ADN.

Cuadro 6. Muestras de ADN secuenciados.

Madre y Progenies PLs				Madre y Progenies S ₁			
Planta Madre	Planta			Planta Madre	Planta		
	individu al	Planta 1 de dos	Planta 2 de dos		individu al	Planta 1 de dos	Planta 2 de dos
PL2	P1	P2-1	P2-2	S3	P1	P2-1	P2-2
PL4	P1	P2-1	P2-2	S5	P1	P2-1	P2-2
PL5	P1	P2-1	P2-2	S7	P1	P2-1	P2-2

Los iniciadores (primers) utilizados fueron de los ITS (Internal Transcribed Spacer) que se encuentra repetidamente entre los genes del RNA ribosomal de la subunidad mayor y menor del ADN nuclear. El ITS contiene dos regiones espaciadoras separadas por el gen 5.8S rRNA. Estas regiones pueden ser amplificadas mediante el uso de pares de primers o iniciadores. En este caso se utilizó un par de primers que son C26A (5'GTTTCTTTTCCTCCGCT-3') y N18L.

Alineamiento de secuencias

Las secuencias obtenidas de las diferentes muestras de ADN de los grupos se analizarán con el programa Bioedit 7.1.3 para estandarizar el tamaño de las secuencias obtenidas, posteriormente se someterán a un alineamiento utilizando el programa MAFFT versión 6, Programa de Alineamiento Múltiple para Secuencias Nucleotídicas o Aminoacídicas, con el propósito de encontrar similitudes entre las secuencias nucleotídicas. Los alineamientos se realizarán comparando dos secuencias entre la madre y sus hijos tanto individual como poliembriónico (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de secuencias de los progenitores y progenies.

Familia PL2	Comparaciones de los grupos PLs		Familia S3	Comparaciones de los grupos S ₁	
	Familia PL4	Familia PL5		Familia S5	Familia S7
PL2 vs PL2P1	PL4 vs PL4P1	PL5 vs PL5P1	S3 vs S3P1	S5 vs S5P1	S7 vs S7P1
PL2 vs PL2P21	PL4 vs PL4P21	PL5 vs PL5P21	S3 vs S3P21	S5 vs S5P21	S7 vs S7P21
PL2 vs PL2P22	PL4 vs PL4P22	PL5 vs PL5P22	S3 vs S3P22	S5 vs S5P22	S7 vs S7P22
PL2P1 vs PL2P21	PL4P1 vs PL4P21	PL5P1 vs PL5P21	S3P1 vs S3P21	S5P1 vs S5P21	S7P1 vs S7P21
PL2P1 vs PL2P22	PL4P1 vs PL4P22	PL5P1 vs PL5P22	S3P1 vs S3P22	S5P1 vs S5P22	S7P1 vs S7P22
PL2P21 vs PL2P22	PL4P21 vs PL4P22	PL5P21 vs PL5P22	S3P21 vs S3P22	S5P21 vs S5P22	S7P21 vs S7P22

Búsqueda de polimorfismo

Para el análisis de polimorfismo de las diferentes comparaciones de secuencias nucleotídicas se utilizó el programa DnsSP DNA sequence polymorphism versión 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación en invernadero

Las características promedio de las variables Germinación, Poliembriónía y Anormalidades para las familias S_1 y las F_1 de PLs (progenies generadas por polinización libre) desarrolladas para el estudio de apomixis aparecen en los Cuadro 8 y 9 respectivamente. En los dos grupos, la germinación fue igual o superior a 90 %, condición muy deseable en materiales derivados de una población poliembriónica y más aun en líneas poliembriónicas S_1 , donde el proceso de endogamia en alógamas como el maíz, generalmente influye para deprimir la expresión fenotípica.

La expresión promedio para PE se ubicó en el intervalo de 55 a 68 %, la cual es acorde a las proporciones esperadas en estas poblaciones poliembriónicas del IMM-UAAAN (Espinoza *et al.*, 1998; Espinoza y Vega, 2000). De hecho, la PE en algunas S_1 se ubicó en el extremo superior del intervalo, lo cual es poco usual en casos previos de la misma condición endogámica (Rebolloza *et al.*, 2011). El proceso de uniformidad genética que se involucra en autofecundaciones sucesivas conduce a poner en homocigosis a los genes que influyen en la poliembriónía, pero también a los genes que la obstruyen, los cuales causan la penetrancia incompleta del carácter. En este sentido, las familias S_1 presentan una expresión variable y errática de la PE y en muchos casos el monto es inusualmente bajo. La condición errática del fenómeno endogámico logra también montos PE inesperadamente altos. Como puede apreciarse en los Cuadros 1 y 2, los extremos observados fueron más amplios en las S_1 que en las PLs; éstas se ajustaron más a los valores típicos de la población de origen UA-IMM-BAP.

Cuadro 8. Porcentaje promedio de las variables observadas en las 20 familias s1 en el estudio de apomixis.

Repetición	GER (%)	PE (%)	ANOR (%)	PE mínima	PE máxima
I	92 ± 7	63 ± 19	12 ± 8	26	88
II	93 ± 7	68 ± 21	9 ± 7	23	100

Cuadro 9. Porcentajes promedio de las variables observadas en las 20 familias de polinización libre (PLs).

Repetición	GER (%)	PE (%)	ANOR (%)	PE mínima	PE máxima
I	92 ± 8	55 ± 13	10 ± 6	35	72
II	90 ± 7	61 ± 15	8 ± 5	30	82

El diseño de apareamientos aplicado para el estudio de Xenia fue agrupado tomando en cuenta la naturaleza poliembriónica del progenitor femenino. El primero se presenta en el Cuadro 10 donde la fuente materna es PE y sus polinizadores son de su tipo o del tipo No-PE, con la cualidad adicional de estar o no emparentados. La condición inversa, donde la madre es No-PE y polinizada por los mismos tipos que en el caso anterior, se presenta en el Cuadro 11.

Como puede apreciarse, la germinación fue superior a 80 %. Es notable que la mayoría de los casos de porcentajes bajos ocurriera en las progenies de padres genéticamente relacionados (emparentados), mientras que aquellos donde los progenitores fueron no-emparentados generalmente presentaron mayor germinación. Sin embargo, hay que considerar que casos como estos pueden generarse por efectos de muestreo, dado el tamaño finito de las muestras.

Con respecto a los resultados para la PE debe señalarse que el diseño de apareamientos en los tres primeros genotipos enlistados en los Cuadros 10 y

11, sean con madre PE o No-PE, los individuos pertenecen a las familias utilizadas en el estudio, las cuales son parte de la misma población UA-IMM-UAAAN y por lo tanto tienen de origen cierto grado de parentesco genético; aún más, las plantas consideradas como NOPERE (no poliembriónico emparentado) de hecho pertenecen a la misma familia de las PE pero que germinaron y se desarrollaron como plantas individuales. En el caso de la condición NOPENORE (es decir, No-PE y no emparentada) el polinizador fue la línea de alta endogamia (S_6) que corresponde a la línea de la Narro, denominada AN-LCR-401-3, de grano blanco, semi-cristalino, y buena aptitud combinatoria. Como puede apreciarse, la PE fue siempre superior a 50 % con excepción del último tipo de apareamiento, sea PE x NOPENORE o NOPE x NOPENORE, donde la progenie fue cero PE, es decir 100 % de fenotipo normal. Este resultado es consistente con lo señalado por Rebolloza *et al.*, 2011; y González *et al.*, 2011, para un cruzamiento entre germoplasma genéticamente distantes, donde uno es de naturaleza PE y el otro es del tipo maíz normal, No-PE. La F1 de estos casos es siempre de fenotipo normal, *i. e.* una planta por semilla, denotando la naturaleza recesiva de la poliembriónía en estas poblaciones de maíz.

La poliembriónía detectada en los dos grupos de apareamiento, primeros tres tipos genotípicos señalados en los Cuadros 10 y 11, permite señalar dos temas relevantes, 1) que en esta fuente de materiales es irrelevante la naturaleza de la madre, ya que cualquiera de ellas sea PE o NO-PE da origen a progenies que presentan un grado alto de poliembriónía, y 2) que no puede deslindarse la influencia del polen para regir la presencia o ausencia del carácter ya que todo parece indicar que el carácter se rige por la dotación de genes en el embrión y no por la del endospermo. El análisis de ADN en este tema pudiera ofrecer más evidencias al respecto, por lo que queda esta asignatura pendiente.

Es notable que la cruce entre el polinizador representado por la línea AN-LCR-401-3, de alta endogamia, sean plantas hembras PE o NO-PE (cuarto tipo

de apareamiento en los dos grupos, Cuadros 10 y 11) impidiera por completo la manifestación de la poliembrionía. Esta condición es típica de homocigosis recesiva, sea en casos de herencia simple o en casos de interacción génica epistática del tipo recesiva duplicada, como es la que se postuló (Rebolloza *et al.*, 2011) para el tipo de PE utilizado en este trabajo.

Cuadro 10. Porcentajes promedio para los diferentes tipos de cruzamiento aplicado en Xenia, donde la madre fue de naturaleza PE.

Tipo de cruzamiento	GERM (%)	PE (%)	ANOR (%)
PE x PERE	96 ± 6	70 ± 7	16 ± 14
PE x PENORE	87 ± 4	68 ± 1	24 ± 5
PE x NOPERE	80 ± 16	58 ± 18	20 ± 14
PE x NOPENORE	95 ± 5	0	9 ± 4

PE = Poliembriónico; NOPE = No-Poliembriónico; PERE = Poliembriónico Relacionado (pariente); PENORE = Poliembriónico No-Relacionado; NOPERE = No-Poliembriónico Relacionado; NOPENORE = No-Poliembriónico No-Relacionado.

En lo que se refiere a la cruce entre NOPE x NOPERE (Cuadro 11), en donde se cruzaron plantas individuales entre y dentro de las familias poliembriónicas, aunque en la expresión fenotípica no expresaron la condición de poliembrionía, al cruzarse entre ellas, se observó que en sus progenies expresan la poliembrionía en un 52 %.

Cuadro 11. Porcentajes promedio en las diferentes cruzas aplicado en el estudio de Xenia con progenitor es de naturaleza NOPE.

Tipo de cruzamiento	GER (%)	PE (%)	ANOR (%)
NOPE x PERE	84 ± 3	53 ± 19	26 ± 10
NOPE x PENORE	82 ± 8	55 ± 7	20 ± 8
NOPE x NOPERE	91 ± 4	52 ± 5	18 ± 10
NOPE x NOPENORE	91 ± 4	0	5 ± 7

PE = Poliembriónico; NOPE = No-Poliembriónico; PERE = Poliembriónico Relacionado (pariente); PENORE = Poliembriónico No-Relacionado; NOPERE = No-Poliembriónico Relacionado; NOPENORE = No-Poliembriónico No-Relacionado.

Con base en estos resultados, la experimentación desarrollada bajo condiciones de invernadero arrojaron datos relevantes y de interés pero no son determinantes para decidir sobre la presencia del fenómeno de apomixis o la influencia de la doble fecundación en maíz en la manifestación de la poliembrionía. Como se estableció antes, la segunda parte consiste en el análisis de ADN por la vía de secuenciación.

Análisis de secuencias de DNA

Para que los resultados esperados sean efectivos, la extracción de ADN debe de ser de tal calidad que en su manipulación posterior proporcione resultados claros y fidedignos. De acuerdo a la ejecución correcta de los procesos de extracción, visualización y cuantificación del ADN, los buenos resultados indicarían que puede seguirse con los análisis bioinformáticos. A continuación se presenta los datos imputables a cada una de las familias cuyo ADN fue secuenciado.

Familia PL 2

Las comparaciones de las secuencias dentro de la familia 2 de polinización libre, mostraron una alta similaridad madre e hijos (Cuadro 12). El porcentaje de sitios invariables (monomórficos) tuvieron un rango que va de 78 % hasta 90 %, por lo tanto el porcentaje de sitios variables (polimórficos) tiene un rango de 10 a 22 %. De acuerdo a este análisis, las secuencias tanto de la madre como la de los hijos son similares pero no son idénticos. Esto se puede atribuir a que los sitios polimórficos están dados por la complementariedad de los genes aportados por la variada fuente de polinizadores. Y además por que la madre PE no es genéticamente homogénea, por lo que, también puede ser fuente de variabilidad.

Cuadro 12. Comparación de secuencias en la familia PL2.

Comparaciones	Parámetros					Comparaciones	Porcentajes				
	# Sitios	S inv	S	Pi	G+C		S inv	S	Pi	G+C	
PI2 vs pl2p1	272	211	61	0.22	0.69	PI2 vs pl2p1	78	22	22	69	
PI2 vs pl2p21	261	227	34	0.13	0.68	PI2 vs pl2p21	87	13	13	68	
PI2 vs pl2p22	261	227	34	0.13	0.69	PI2 vs pl2p22	87	13	13	69	
PI2p1 vs pl2p21	290	252	38	0.13	0.66	PI2p1 vs pl2p21	87	13	13	66	
PI2p1 vs pl2p22	293	263	30	0.10	0.69	PI2p1 vs pl2p22	90	10	10	69	
PI2p21 vs pl2p22	297	267	30	0.10	0.67	PI2p21 vs pl2p22	90	10	10	67	

#sitios=Numero de sitios; S inv = Sitios invariable (monomorfismos); S = Sitios polimórficos; Pi = Diversidad nucleotídica; G+C = Proporción del contenido de guanina mas citosina.

Las comparaciones que tuvieron mayor similitud son la detectada entre las hermanas, hijas de la misma madre, PI2p1 vs pl2p22 que provienen de granos distintos pero de la misma mazorca, y PI2p21 vs pl2p22 (hermanos PE provenientes de la misma semilla) con el 90 % de similitud. Este caso particular puede establecerse que los cuatro genotipos (madre y tres hijas) son de alto parecido genético pero ningún par entre ellas es idéntico, aún entre las dos hermanas PE generadas por la misma semilla, lo cual se refuerza por el hecho de que la hermana individual presenta una similitud diferente con la otra hermana PE como puede observarse en el caso de la comparación de PI2p1 vs. pl2p21, que tienen 87 % de semejanza, y por lo tanto, más sitios polimórficos. Los resultados sugieren que el origen genético de cada una de las hijas es diferente. El promedio general de sitios monomórficos para la familia es de 86 % con desviación estándar de 4.5.

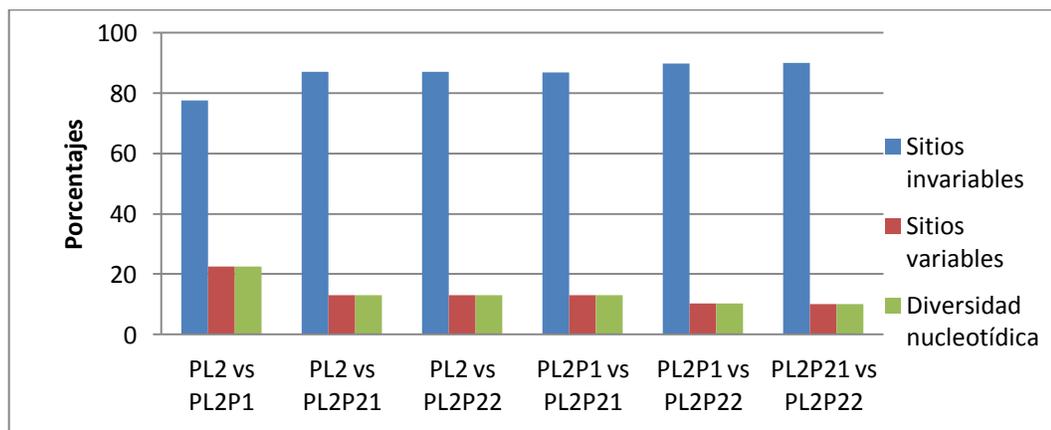


Figura 4. Porcentajes de los sitios monomórficos y polimórficos en secuencias de DNA en familia PL2.

Familia PL 4

El análisis de polimorfismo realizadas en comparación de las secuencias de la planta madre con su progenie presentó resultados diferentes (Cuadro 13). Los porcentajes de similaridad entre cada comparación van desde 76 a 92 %. Es ilustrativo observar que las plantas hermanas PE, provenientes de la misma semilla, presentan el parecido más alto pero que no las sitúa en condición de idénticas, sugiriendo que los embriones contemporáneos que les dan origen tienen una base genética distinta. Por otra parte, las comparaciones que se establecen entre la madre y sus tres hijas resultaron con las proporciones de menor monto. De cualquier modo, el parecido genético a la luz de la similaridad detectada es el que pudiera corresponder a la relación genética entre padre-progenie.

Cuadro 13. Comparación de secuencias nucleotídicas en la familia PL4.

Comparación	Parámetro					Comparación	Porcentajes				
	# sitios	S inv	S	Pi	G+C		S inv	S	Pi	G+C	
PL4 vs PL4P1	282	213	69	0.24	0.64	PL4 vs PL4P1	76	24	24	64	
PL4 vs PL4P21	285	215	70	0.25	0.64	PL4 vs PL4P21	75	25	25	64	
PL4 vs PL4P22	288	219	69	0.24	0.64	PL4 vs PL4P22	76	24	24	64	
PL4P1 vs PL4P21	287	248	39	0.14	0.66	PL4P1 vs PL4P21	86	14	14	66	
PL4P1 vs PL4P22	293	251	42	0.14	0.65	PL4P1 vs PL4P22	86	14	14	65	
PL4P21 vs PL4P22	299	274	25	0.08	0.66	PL4P21 vs PL4P22	92	8	8	66	

sitios = número de sitios; S inv = Sitios invariable (monomorfismos); S = Sitios polimórficos; Pi = Diversidad nucleotídicas; G+C = Proporción del contenido de guanina mas citosina.

En la Figura 5, se muestra cómo las secuencias nucleotídicas de las hijas poliembriónicas se parecen más entre ellas. El promedio general para todas las comparaciones fue de 82 % y su desviación estándar fue de 7.0.

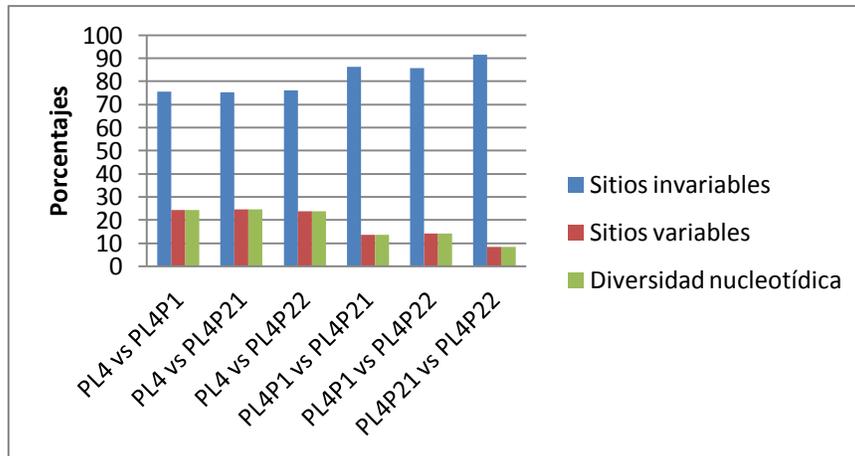


Figura 5. Sitios monomórficos y polimórficos en comparación de secuencias de ADN para la familia PL4.

Familia PL5

Los sitios invariables o monomórficos encontradas en las secuencias nucleotídicas en comparación dentro de esta familia varía desde 86 % a 90 % (Cuadro 14). Como en los dos análisis anteriores, la similitud detectada entre madre e hijas, como entre hermanas, es superior a 74 %, pero hasta ahora ninguna comparación ha alcanzado el nivel de 100 % que representaría la condición de idénticas del par observado.

Dado el manejo reproductivo del grupo de PLs no existió un control de los polinizadores, por lo que la procedencia del padre fue desconocida, pudiendo participar en el proceso de fecundación polen de fuentes diversas, fueran tipo PE o No-PE, esta condición debe significar que la proporción de similitud entre los ADNs de la madre e hijas se ajusten a la dotación que por la vía de gameto femenino otorgó la madre a cada una de ellas. Por otra parte, la relación entre la planta hija del tipo individual con las hermanas PE debe ser tal que refleje la diferencia del polen fecundante, por lo tanto se esperaría similitud variable. Finalmente, la similitud entre hermanas PE debe situarse en el origen del embrión que les da origen, los cuales pueden ser idénticos (100 % de similitud), generados por algunas de las formas de poliembriónia, o en

el extremo de los casos, de origen muy diferente, sea de célula gamética o somática (similaridad menor < 100%). La media general para esta familia en lo que se refiere a los sitios invariables fueron de 86 % y una desviación estándar de 2.

Cuadro 14. Comparación de secuencias nucleotídicas de la familia PI5.

Comparación	Parámetros					Comparación	Porcentajes			
	# Sitios	S inv	S	Pi	G+C		S inv	S	Pi	G+C
PL5 vs PL5P1	295	253	42	0.1424	0.685	PL5 vs PL5P1	86	14	14	69
PL5 vs PL5P21	299	260	39	0.1304	0.687	PL5 vs PL5P21	87	13	13	69
PL5 vs PL5P22	288	248	40	0.1389	0.649	PL5 vs PL5P22	86	14	14	65
PL5P1 vs PL5P21	296	265	31	0.1047	0.691	PL5P1 vs PL5P21	90	10	10	69
PL5P1 vs PL5P22	293	240	53	0.1809	0.66	PL5P1 vs PL5P22	82	18	18	66
PL5P21 vs PL5P22	294	254	40	0.1361	0.67	PL5P21 vs PL5P22	86	14	14	67

sitios= numero de sitios; S inv = Sitios invariable (monomorfismos); S = Sitios polimórficos; Pi = Diversidad nucleotídicas; G+C = Proporción del contenido de guanina y citocina.

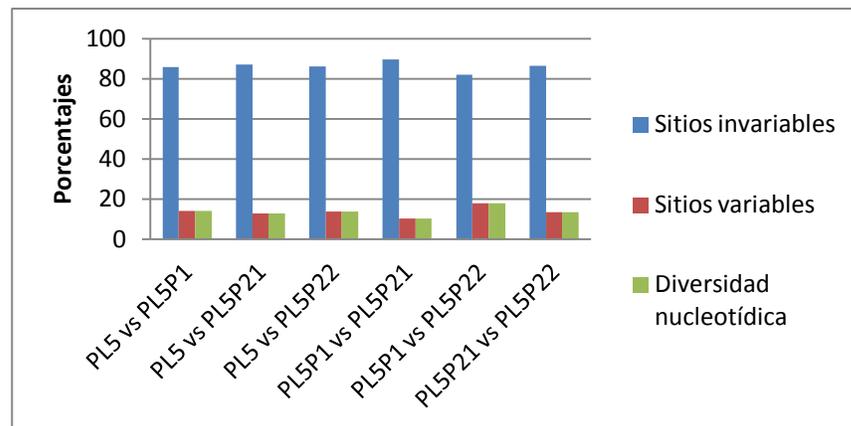


Figura 6. Porcentajes de sitios invariables y polimórficos de comparación de secuencias de ADN para la familia pl5.

Familia S3

Los análisis polimórficos para este grupo muestran resultados acordes a las expectativas del parecido fenotípico que comúnmente se obtienen en el manejo agronómico de las poblaciones de maíz poliembriónico. En esta familia, los sitios invariables van de 62 % a 100 % de similaridad (Cuadro 15). De la comparación entre la secuencia de la madre y sus tres hijas, la que correspondió a una de las plántulas PE (S3 vs. S3P22) es la que presentó 100

% de similitud. Esta relación de igualdad uno a uno en las secuencias nucleotídicas pudiera explicarse de dos formas posibles: 1) la plántula hija poliembriónica 2 se originó de una célula somática, probablemente de la nucela, que se desarrolló como embrión adventicio diploide, de la misma naturaleza genotípica que el tejido somático de la madre; embrión que se proyectó al interior del saco embrionario para tomar lugar como un caso de embrionía múltiple; y 2) de las dos plántulas hermanas PE, la poliembriónica 1 se originó por la vía de la doble fecundación (embrión 2n y endospermo3n) mientras que la hija poliembriónica 2 se originó de manera atípica en el saco embrionario, a partir de una célula germinal no-reducida, de dotación 2n, idéntica a la madre, y por lo tanto de probable origen apomítico.

Cuadro 15. Comparación de secuencias nucleotídicas de la familia S3.

Comparación	Parámetros					Comparación	Porcentajes				
	# sitios	S inv	S	Pi	G+C		S inv	S	Pi	G+C	
S3 vs S3P1	292	262	30	0.103	0.651	S3 vs S3P1	90	10	10	65	
S3 vs S3P21	291	182	109	0.375	0.675	S3 vs S3P21	63	37	37	68	
S3 vs S3P22	291	290	1	0.003	0.689	S3 vs S3P22	100	0	0	69	
S3P1 vs S3P21	292	192	100	0.342	0.637	S3P1 vs S3P21	66	34	34	64	
S3P1 vs S3P22	286	253	33	0.115	0.659	S3P1 vs S3P22	88	12	12	66	
S3P21 vs S3P22	290	180	110	0.379	0.671	S3P21 vs S3P22	62	38	38	67	

sitios= número de sitios; S inv = Sitios invariable (monomorfismos); S = Sitios polimórficos; Pi = Diversidad nucleotídicas; G+C = Proporción del contenido de guanina y citosina.

Los sitios invariantes del resto de las comparaciones entre madre e hijas, y entre hermanas son muy ilustrativos y consistentes. Madre e hija No-PE presentaron la similaridad más alta después de la comparación de iguales, pero la comparación madre-hija poliembriónica 1 presentó el valor más bajo (62 %) detectado en estos casos hasta ahora. La compulsa entre hermanas es muy consistente con los resultados en el grupo; si S3 vs. S3P22 fue al 100 % y S3 vs. S3P1 fue 90 %, S3 P1 vs. S3P22 debería ser similar al anterior, como así lo fue. En la misma lógica se sitúa la comparación entre las hermanas PE, 1 y 2,

que de acuerdo a la transitividad de los resultados comparativos, deberían presentar la similaridad más baja, como así se reportó (Cuadro 15).

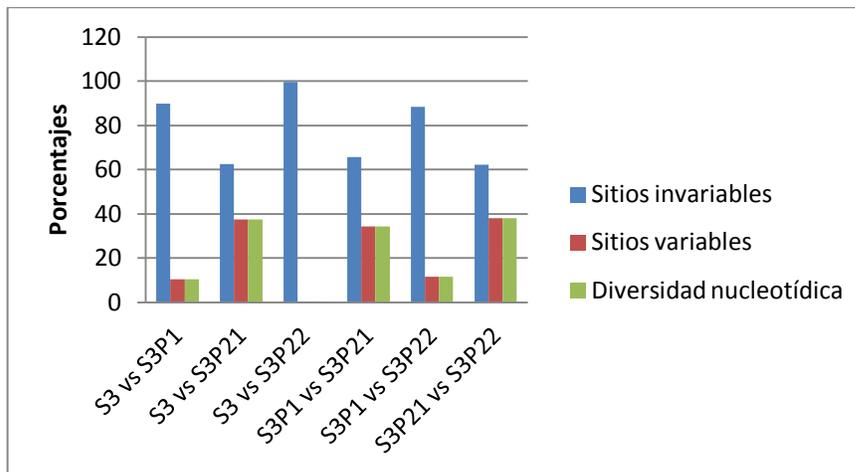


Figura 7. Similaridad en porcentajes de los monomórficos y polimórficos en comparación de secuencias de DNA para la familia S3.

Familia S5

Las secuencias de ADN comparadas en esta familia nos permiten cuantificar el grado de sitios monomórficos en cada comparación. El porcentaje de sitios invariables están el intervalo de 85 % a 91%, por consiguiente, no se detecta casos de secuencias idénticas entre las seis comparaciones posibles (Cuadro 16). Las secuencias se consideran idénticas cuando todos los nucleótidos lo sean al 100 %. En todas las comparaciones, ninguna resultaron idénticas por lo que se atribuye que la diversidad nucleotídica está dada por la herencia proveniente del progenitor masculino. Las hijas poliembriónicas resultaron más diferentes con 15 % de sitios polimórficos, mientras que, el comportamiento de las secuencias del hijo 1 (planta individual dentro de la familia) con el hijo poliembriónico 1 (S5P1 vs S5 P21), obtuvieron la similitud mayor con el 91 %. Es muy notable que el intervalo de similaridad en este grupo sea más reducido y de valores más altos que el caso de su similar S3.

Cuadro 16. Comparación de secuencias de nucleotídicas en la familia S5.

Comparación	Parámetros					Comparación	Porcentajes				
	No sitios	S inv	S	Pi	G+C		S inv	S	Pi	G+C	
S5 vs S5P1	295	267	28	0.09492	0.636	S5 vs S5P1	90.5	9.5	9.5	63.6	
S5 vs S5P21	296	261	35	0.11824	0.635	S5 vs S5P21	88.2	11.8	11.8	63.5	
S5 vs S5P22	299	257	42	0.14047	0.656	S5 vs S5P22	86.0	14.0	14.0	65.6	
S5P1 vs S5P21	289	263	26	0.08997	0.637	S5P1 vs S5P21	91.0	9.0	9.0	63.7	
S5P1 vs S5P22	296	265	31	0.10473	0.654	S5P1 vs S5P22	89.5	10.5	10.5	65.4	
S5P21 vs S5P22	293	248	45	0.15358	0.659	S5P21 vs S5P22	84.6	15.4	15.4	65.9	

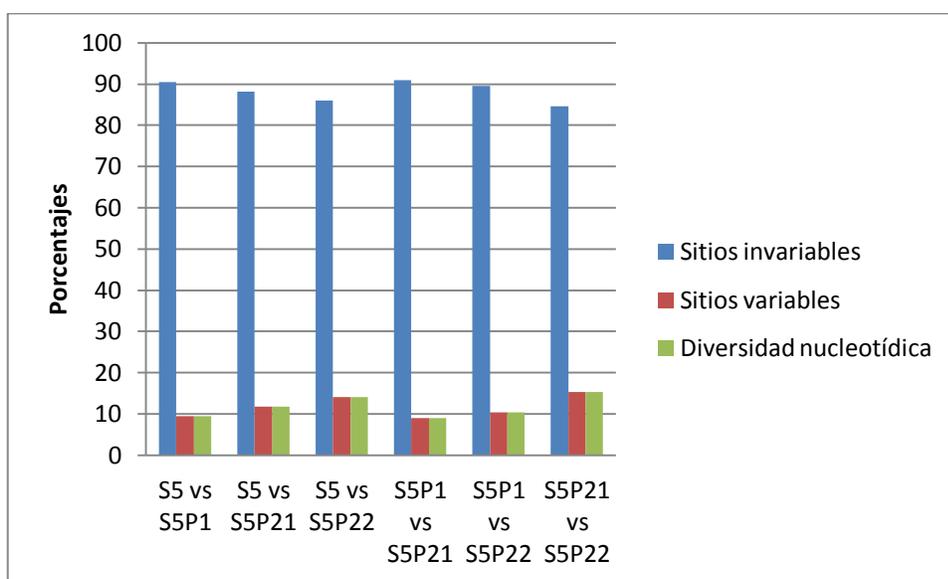


Figura 8. Similaridad en porcentajes de secuencias en comparación de ADN para la familia S5.

Familia S7

La serie de comparaciones en esta familia presentó otro caso de similitud idéntica entre la madre y una de sus hijas PE, concretamente entre S7 vs. S7P22. Otra vez, se pudo documentar una relación muy distinta entre la madre y las dos hijas PE (plántulas provenientes de una sola semilla), con una se presentó identidad completa, y con la otra sólo una semejanza de baja proporción. De este modo, las dos plantas PE parten de una base genética

emparentada pero de diferente origen, tal vez de uno de los dos posibles mecanismos enunciados en el caso de la Familia anterior.

En esta, como en el caso de S3, la consistencia en la proporción de semejanza es muy relevante *i. e.* cuando la comparación se analiza en tres elementos genotípicos, si uno de ellos, como madre, difiere en su similaridad con dos hijas (alta con una y baja con la otra) la comparación entre las hijas debe resultar baja, como es el caso en ésta y las otras familias autofecundadas. El intervalo de similaridad en esta familia es de 72 % a 100 %, más parecido al de la Familia S3, donde se presentó el otro caso de parecido al 100 %, que al de la Familia S5 donde se presentó sólo parecido genético, en el intervalo de 84 % a 91 % en el concierto de las seis comparaciones posibles (Cuadro 17).

Cuadro 17. Comparación de secuencias nucleotídicas en la familia S7.

Comparación	Parámetros					Comparación	Porcentajes				
	# sitios	S inv	S	Pi	G+C		S inv	S	Pi	G+C	
S7 vs S7P1	291	239	52	0.17869	0.679	S7 vs S7P1	82.1	17.9	17.9	67.9	
S7 vs S7P21	289	207	82	0.28374	0.668	S7 vs S7P21	71.6	28.4	28.4	66.8	
S7 vs S7P22	298	298	0	0	0.691	S7 vs S7P22	100.0	0.0	0.0	69.1	
S7P1 vs S7P21	293	255	38	0.12969	0.648	S7P1 vs S7P21	87.0	13.0	13.0	64.8	
S7P1 vs S7P22	296	242	54	0.18243	0.676	S7P1 vs S7P22	81.8	18.2	18.2	67.6	
S7P21 vs S7P22	288	208	80	0.27778	0.688	S7P21 vs S7P22	72.2	27.8	27.8	68.8	

sitios= numero de sitios; S inv = Sitios invariable (monomorfismos); S = Sitios polimórficos; Pi = Diversidad nucleotídicas; G+C = Proporción del contenido de guanina y citosina.

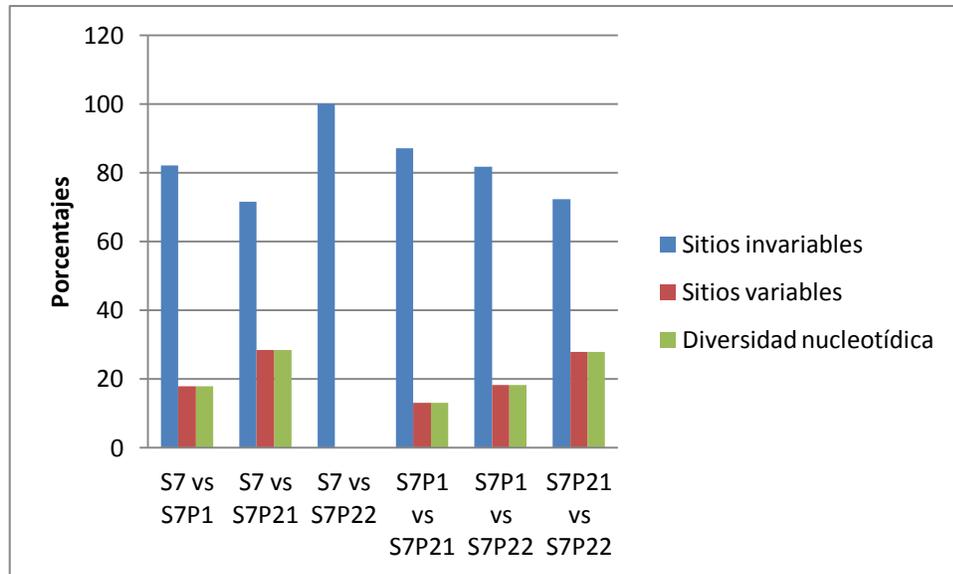


Figura 9. Porcentajes de similaridad en la comparación en secuencias de ADN de la familia S7.

La manifestación de la poliembriónía en las poblaciones de maíz, putativas de estas familias bajo estudio, es del orden de 55 a 65 % (Espinoza *et al.*, 1998; Espinoza y Vega, 2000), condición que se valida por los resultados experimentales en este trabajo (ver Cuadros 8 y 9).

La selección recurrente practicada en el manejo reproductivo en esas poblaciones ha permitido concentrar una alta frecuencia de los alelos recesivos que determinan la manifestación de la poliembriónía, de acuerdo al modelo de herencia propuesto por Rebolloza *et al.* (2011). Sin embargo, la catalogación de la frecuencia de PE en una familia determinada, en una generación dada, es solamente fenotípica, ya que clasificar los casos de semillas que germinan simultáneamente de dos y hasta siete plántulas, es sólo por observación visual cuidadosa y experimentada. Adicionalmente a la manifestación de la PE, una proporción menor, aunque notable, de casos de plántulas múltiples presentan también radículas múltiples (Espinoza *et al.*, 2012). Cualesquiera que fuera el significado en la modificación del sistema radical seminal, los genes de la poliembriónía parecieran tener efecto pleiotrópico.

La propuesta de Erldeska (1996) sobre el origen de semillas poliembriónicas en maíz incluye la PE por cleavage, originados por la división de la célula huevo de manera espontánea o después de alguna inducción, los cuales comparten un suspensor común, parte del escutelo y capas superficiales de radícula; por ello, los embriones germinan con plúmulas separadas pero un solo complejo radicular, este tipo de origen se ha observado fenotípicamente en mayor cantidad en las poblaciones BAP y NAP. El otro tipo de origen son los casos de gemelos o tripletes que provienen de células huevo individuales del saco embrionario o de células con capacidades multi-huevo que están estrechamente adheridas, pero separados por capas epidérmicas, con un endospermo en común; las plúmulas y radículas son independientes, en poca proporción este tipo de surgimiento de plántulas se puede ver en las poblaciones poliembriónicas en estudio. También la PE puede originarse por embriones gemelos de sacos multi-embriónicos que comúnmente están ubicados en lados opuestos, o a distancia en el grano, los cuales carecen de tejidos comunes y germinan independientemente, es poco común encontrar este tipo de origen en las poblaciones poliembriónicas bajo investigación pero las hay, con proporciones muy bajas.

V. CONCLUSIONES

La similitud de 100 % en secuencias de ADN encontradas en comparaciones de dos casos de madre-hija PE pudiera atribuirse a una probable relación entre la poliembrionía y apomixis. Esta aseveración se apoya en el hecho de que dos plántulas de la misma semilla pueden ser morfológicamente diferentes o idénticas, lo que a su vez está influido por heterogeneidad de la semilla. La combinación de procesos en la reproducción en estos maíces poliembriónicos hace posible la obtención de progenies PE genéticamente heterogéneas.

El probable efecto de la fuente de polen (xenia) sobre la poliembrionía en maíz influye en el aumento o disminución de la misma, ya que depende de la base genética del progenitor masculino, ya sea que proviene de la misma familia PE o totalmente ajena a ella, para incrementar, disminuir o impedir la expresión de la PE. Además los genes del progenitor femenino también desempeñan un papel importante al complementarse durante la fecundación.

Al cruzar plantas poliembriónicas dentro y entre familias, la PE aumenta o se mantiene en el rango de poliembrionía de la población de origen. Mientras que al cruzar algunas familias PE con genotipos exóticos (No-PE), la F₁ resultante es fenotípicamente normal (cero PE). También, al cruzar plantas fenotípicamente individuales pero que provienen de familias poliembriónicas, al cruzarse plantas del mismo tipo, sus progenies pueden presentar proporciones PE mayor o igual a 50 %. Esto se explica si se postula que las plantas fenotípicamente individuales son genéticamente PE pero la expresión de ésta se impide por los mecanismos de penetrancia incompleta, que acompaña a la PE de las poblaciones de origen, IMM-UAAAN-BAP o NAP.

En la generación de líneas S₁ aumenta la uniformidad genética y esto conduce a poner en homocigosis a los genes que influyen en la poliembrionía, pero también a los genes que la obstruyen, por lo que las progenies S₁ pueden presentar frecuencias erráticas en el nivel de PE.

RESUMEN

La poliembrionía (PE) en maíz es una variante mutante natural que implica modificación en la estructuración y desarrollo del fruto-semilla de forma tal que pudiera producir dos o más embriones, misma que germinará en dos o más plántulas. Se plantea que la PE que se estudia en este trabajo podría tener una conexión con algún tipo de reproducción asexual por apomixis. Los objetivos del presente trabajo fueron: determinar la relación entre apomixis y la poliembrionía, por medio de secuenciación de una parte ADN genómico de plantas madre y su progenies PE, y estimar el efecto del grano de polen (xenia) sobre la poliembrionía mediante una serie de cruzamientos.

El material genético utilizado en este trabajo incluyó a las poblaciones de alta poliembrionía IMM-UAAAN-BAP (enana) e IMM-UAAAN-NAP (porte normal), y la línea de alta endogamia (S6) AN-LCR-401-3, desarrolladas por el Instituto Mexicano del Maíz “Dr. Mario E. Castro Gil” de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. A partir de una muestra amplia de BAP, durante el ciclo P-V/2010, se obtuvieron 20 líneas S_1 y 20 familias de medios hermanos, genotipos de polinización libre (PLs), como material de trabajo en el estudio de apomixis. Para el estudio de Xenia se obtuvieron ocho cruza diferentes que permitieron probar el efecto de polinizador en la manifestación de la poliembrionía cuando se utilizaron madres que fueran PE o No-PE.

Para los des experimentos, se tomaron en su oportunidad muestras de tejido foliar de plantas madre y sus progenies para la extracción de ADN, a aplicarlo en el análisis de parte de la secuencia del genoma. El ADN fue amplificado utilizando primers específicos (C26S y N18L) para las regiones genómicas ITS (Internal Transcribed Spacer). El material genético utilizado correspondió a tres familias PLs y a tres familias S_1 . Las secuencias obtenidas

de las diferentes muestras de ADN se alinearon y se compararon utilizando herramientas bio-informáticas tales como: Bioedit, Mafft y DnaSP.

Los resultados obtenidos en la evaluación de progenies en invernadero mostraron porcentajes de germinación por arriba del 90 %, condición favorable para líneas S₁ y progenies PLs. La PE se ubicó en el intervalo de 55 a 68 % en las líneas S₁, y en dos casos se obtuvo el 100 % de PE. Para las progenies provenientes de polinización libre, el promedio de PE fue de 55 a 61%. Para el estudio de la fuente de polen (xenia) la PE fue superior a 50 % excepto el último tipo de apareamiento, sea PE x NOPENORE o NOPE x NOPENORE, donde la progenie fue 100 % normal, es decir cero PE. En este esquema de cruzamiento se comprueba el tipo de herencia de la PE, en donde al cruzar una planta PE con otra genéticamente diferente (No-PE), las progenies en la F₁ no expresan la poliembrionía, pero ésta reaparece en la F₂ con una proporción esperada de 6.25 %, confirmando la naturaleza recesiva de esta PE.

En el análisis de estos esquemas de cruzamiento, se observó que las cruza del tipo ♀ NOPE x ♂ NOPERE (cruza entre plantas individuales, que pertenecen a familias PE) generaron de manera inesperada progenies con una poliembrionía promedio del orden de 52 %. Este fenómeno puede explicarse si se considera que la mayoría de estas plantas progenitoras, fenotípicamente individuales, son en realidad genotipos que contienen los genes para la PE, pero el mecanismo de penetrancia incompleta que está asociado a esta PE, impide a que estos genes se expresen. De hecho, estos resultados son acordes al modelo de herencia postulado para esta clase de poliembrionía.

Las comparaciones de las secuencias de ADN dentro de cada una de seis familias (tres PLs y tres S1) mostraron que los casos del grupo PLs se tuvo una proporción de similaridad de entre 70 y 90 % (familias PL2, PL4 y PL5). Al generar estas familias premeditadamente no se tuvo control de los polinizadores, por lo tanto el apareamiento fue aleatorio, pudiendo participar en el proceso de fecundación polen de fuentes diversas, ya sea PE o No-PE y hasta autofecundación en menor grado; esta condición debe significar que la

proporción de similitud entre el ADN de madres e hijas sea tal que refleje la heterogeneidad del material genético, aparte de la relación genética de madre-hijas.

En las comparaciones dentro de las familias S3, S5 y S7, arrojaron resultados de gran interés. Destaca que en las comparaciones de integrantes de las familias S3 y S7, la comparación nucleótido a nucleótido entre la secuencias de la madre y sus hijas (S3 vs S3P22 y S7 vs S7P22) presentaron similitud de 100 %. En cada caso, el origen de plantas gemelas PE germinadas de la misma semilla, puede plantearse de varias formas, explicadas como sigue: una de las dos plántulas (la poliembriónica 1) se originó por la vía normal de la doble fecundación (embrión $2n$, endospermo $3n$) y por lo tanto resultó diferente a la madre, mientras que la otra plántula (hija poliembriónica 2 con 100 % similitud con la madre) se originó de manera atípica en el saco embrionario, a partir de una célula germinal no-reducida, de dotación $2n$, idéntica a la madre, y por lo tanto de probable origen apomítico. El hecho de que las plantas gemelas no sean idénticas y presenten una proporción de similitud menor (entre 60 a 90 %, en estos casos) permite establecer que este tipo de poliembriónía puede originarse por varios mecanismos atípicos de la reproducción, incluida la apomixis. Otras formas probables de similitud parcial o total entre madres e hijas PE pudieran ser, que las hijas provengan de células huevo individuales del saco embrionario o de células con capacidades multi-huevo que están estrechamente adheridas, pero separados por capas epidérmicas, con un endospermo en común, donde plúmulas y radículas son independientes. Una forma adicional en esta fenomenología, es que algunas de las plántulas múltiples pudiera provenir de células somáticas como las de la nucela, generando así un tipo de poliembriónía adventicia, como ocurre en otras especies de plantas superiores.

Palabras clave: *Zea mays* L., poliembriónía, población BAP, apomixis, xenia.

VI. LITERATURA CITADA

- Adams, J. (2008) DNA sequencing technologies. *Nature Education* 1(1).
- Asker, S. E. and Jerling L. (1992) *Apomixis in Plants*. CRC Press. Boca Raton. Florida. 298 p.
- Ausubel, T.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl, 1992. *Short Protocols in Molecular Biology (A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology)*. Section II: electrophoretic separation of proteins. Second Edition. John Willey & Sons.
- Bashaw, E. C. (1980) Apomixis and its Application in Crop Improvement. Hybridization of Crop Plants. W.R. Fchr and H.H. Hadley. American Society of Agronomy, Wisconsin, USA. pp: 45-63.
- Bashaw, E. C. and W. Hanna W. (1990) Apomictic reproduction. In: G. P. Chapman (ed.) *Reproductive Versatility in the Grasses*. Cambridge University Press. pp:100-130.
- Bhojwani, S. and S. Bhatnagar (1974) *The embryology of angiosperms*. Vikas Publishing House PVT LTD. India. 355 pp.
- Bulant, C., A. Gallais, E. Matthys-Rochon, and J L Prioul (2000) Xenia effects in maize with normal endosperm: II. Kernel growth and enzyme activities during grain filling. *Crop Sci* 40: 182–189.
- Castaño, L. (2000). Uso de la biología molecular en endocrinología pediátrica. *An Esp Pediatr.* 52 (1): 23-25.
- Castro G., M. E. (1979) Estudio sobre herencias y valores nutritivos de semillas con doble embrión, *Avances de investigación en maíz*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista. Coah. Mex. pp. 24-25.

- Chassaingne, A. (2002). Desarrollo de maíces especiales. In: IX Curso sobre producción de maíz. Araure, Venezuela. pp. 358-368.
- Checa-Caratachea, (2007) Polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 20 (3); 213-221
- Claverie, J. M. and Notredame C. (2003) "Bioinformatics for dummies" Editorial; Wiley publishing, Inc. New York.382
- Conner, J. A., Goel S., Gunawan G., Cordonnier-Pratt M, Johnson VE, Liang C, Wang H, Pratt LH, Mullet JE, DeBarry J, Yang L, Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, and Tsuruta S (2005) Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). Grassland Sci 51:71–78
- Erdelska, O. (1996) Polyembryony in maize-histological analysis. Acta Soc. Bot. Pol. 65:123-125.
- Erdelska O, and Z Vidovencova (1992) Cleavage polyembryony in maize. Sex. Plant Reprod. 5:224-226.
- Espinoza J., M. C. Vega, E. Navarro, y G. Burciaga A (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: Valdez Reyna J. 2005. Resultados de proyectos de investigación 2004. 245-252 pp. Dirección de investigación, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Evans M., M. S. (2007) The indeterminate gametophyte 1 gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo sac and leaf development. The Plant Cell 19:46-62.

- González V., V. M., J. Espinoza V., R Mendoza V., H De León C, M A y Torres T (2011) Caracterización de germoplasma de maíz que combina alto contenido de aceite y poliembrionía. *Universidad y Ciencia*. 27(2): 1-11.
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E, and Grossniklaus U (2001) Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends Genet* 17:597–604
- Grossniklaus, U., Nogler, G.A., and van Dijk, P.J., (2001) How to Avoid Sex: The Genetic Control of Gametophytic Apomixis, *Plant Cell*. vol. 13, no. 7, pp. 1491–1498.
- Gustine, D. L. and R. T. Sherwood (1992) Physiology and genetics of apomixis in *Cenchrus*. in *Proceedings of Apomixis Workshop*. U.S. Department of Agriculture, Beltsville, MD, USA. 5- 7.
- Hallauer A. R. and F. O. Miranda (1988) *Quantitative Genetics in Maize Breeding*. Iowa State University Press. USA. 468 p.
- Hanna, H. W. (1 991) Apomixis in crop plants - cytogenetic basis and role in plant breeding. in *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. P.K. Gupta and T. Tsuchiya. Elsevier Science Publ. Co., Amsterdam, The Netherlands.229-242.
- Hanna, W. W. and E C Bashaw (1987) Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Sci*. 27: 1 136- I 139.
- Hörandl, E. and Greilhuber, J (2002) Diploid and Autotetraploid Sexuals and Their Relationships to Apomicts in the *Ranunculus cassubicus* Group: Insights from DNA Content and Isozyme Variation, *Plant Syst. Evol.*, vol. 234, nos. 1–4, pp. 85–100.
- Johri, B. M. and Ambegaokar K. B. (1984) *Embryology: Then and Now, Embryology of angiosperms*, Johri, B.M., Ed., Berlin: Springer. pp. 1–52.

- Kaur A., Ha C. O., Jong K., Sands V. E., Chan H. T., Soepadno. E. and Ashton P. S. (1978) Apomixis may be widespread among trees of the climax rain forest. *Nature (London)* 271:440-442
- Kermicle J L (1969) Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science* 166:1422-1424.
- Khoklov, S. S. (1976) Evolutionary genetic problems of apomixis in angiosperms. In *Apomixis and phtnt breeding* (ed.) S. S. Khoklov (New Delhi: Amerind).
- Kieselbach, T.A. (1926) False polyembryony in maize. *Am J Bot* 13:33-36
- Kindiger, B. and Sokolov V. A. (1997) Progress in the Development of Apomictic Maize. *Trends Agron.* 1: 76–94.
- King, R. C. and W. D. Stanfiels (1990) *A Dictionary of Genetics*. 4th Edition. Oxford University Press.
- Koltunow, A.M., Soltys K., Nito N. and McClure S. (1995) Anther, ovule, seed, and nucellar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Can J Bot* 73:1567–1582.
- Koltunow, M. (1993) Apomixis: Embryos Sacs and Embryos Formed without Meiosis or Fertilization in Ovules. *The Plant Cell*, 5:1425-1437.
- Lakshmanan, K. K. and Ambegaokar K B (1984) Polyembryony, *Embryology of Angiosperms*, Johri, B.M., Ed., Berlin:Springer. pp: 448–475.
- Leblanc O., Grimanelli D., Islam-Faridi N., Berthaud j. and Savidan Y., 1996, Reproductive Behavior in Maize-Tripsacum polyhaploid Plants: Implications for the Transfer of Apomixis Into Maize, *Journal of Heredity* 87:108-111.
- Levin, D.A. and H. W. Kerster.1974. Gene flow in seed plants. *Evolutionary biology* 7: 139-200.

- Librado, p., and Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* (25): 1451-1452.
- Martínez, G. P. and Gradziel TM (2003) Sexual polyembryony in almond. *Sex Plant Reprod* 16: 135-139.
- Morgan D., T. Jr. and R D Rappleye (1951) Polyembryony in maize and lily, following X-irradiation of the pollen. *J. Hered.* 42:91-93.
- Naumova, T. N. (1992) Apomixis in Angiosperms. *Nucellar and Integumentary Embryony*. London: Boca Ration Ann. Arbor. 141 pp.
- Nogler, G. A. (1984) Gametophytic Apomixis, *Embryology of Angiosperms*, Johri, B.M., Ed., Berlin: Springer. 475–518.
- Ozias-Akins P., Lubbers E. L., Hanna W. W., and McNay J. W. (1993) Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 85:632-638.
- Pérez, B. P. y G. Márquez. 2009. Origen del los Brotes Múltiples en la Población de Maíz IMM-UAAAN-BAP. Tesis de licenciatura UNAM, México, D.F. 76pp.
- Pesev N, R. Petrovic, LjZecevic, and M Milosevic (1976) Study of possibility in raising maize Inbred lines with two embryos. *Theoretical and Applied Genetics* 47: 197-201.
- Pilu, R. (2000) The twin trait maize. *Maize Gen. Coop. Newsl.* 74:51.
- Ramulu K. S., Dijkhuis R. Pereira A., Angenent G. C., van Lookeren Campagne M M, and Dons H (1998) EMS and transposon mutagenesis for the isolation of apomictic mutants in plants. In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (eds) *Somaclonal variation and induced mutation in crop improvement*. Kluwer, Dordrecht, Current plant science and biotechnology in agriculture.19: 379- 401

- Randolph, L. F. (1936) Developmental morphology of the caryopsis in maize. *J Agric Res* 53:881-916
- Rebolloza H. H., J. Espinoza V., D. Sámano G. y V M Zamora V. (2011) Herencia de la poliembrionía en dos poblaciones experimentales de maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* 34(1): 27-33.
- Roche, D., Hanna, W.W., and Ozias-Akins, P., Is Supernumerary Chromatin Involved in Gametophytic Apomixis of Polyploid Plants?, *Sex. Plant Reprod.*, 2001, vol. 13, pp. 343–349.
- Savidan, Y. (2000) Apomixis: Genetics and Breeding, *Plant Breed. Rev.*, 2000, no. 18, pp. 13–86.
- Savidan, Y. H. (1981) Genetics and utilization of apomixis for the improvement of Guineagrass (*Panicum maximum*). Proc. XIV. International Grassland Congress. Lexington KY, USA. 182-184.
- Savidan Y., Carman J. G. and Dresselhaus J G (2001) The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering. CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), Mexico, D.F.
- Stebbins, G. L. 1941 Apomixis in angiosperms. *Bot. Rev.* 8:507-542
- Sybenga J. (1992) Cytogenetics in plant breeding. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo (Monographs on theoretical and applied genetics, vol 17)
- Webber J. M. (1940) Polyembryony, *Bot. Rev.* vol. 6, no. 11, pp. 575–598.
- Weingartner U., O. Kaeser, M. Long and P. Stamp (2002) Combining Cytoplasmic Male Sterility and Xenia Increases Grain Yield of Maize Hybrids *Crop Science* 42:1848-1856.
- Willemse M., T. M. and Nanmova T. N. (1992) Apomictic genes and seed plant reproduction. *Apomixis Newsl* 5:19-32.

VII. ANEXOS

1. Comparación y alineamiento de secuencias de la familia PL2.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
PL2      -----atgg gcctt--agg gcgaatg-gc --ggcgcgcgcg
PL2P1    acagctcggc cgctcgcgatgg gtccttaggg ccgaatgtgc cggccgcgcgcg
PL2P21   -----ggt cgctcgcgatgg gtccttaggg ccgaatg-gc cggccgcgcgcg
PL2P22   -----cggc cgctcgcgatgg gtccttaggg ccgaatg-gc cggccgcgcgcg

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90          100
PL2      cctggacgct gcaccgagaa caacaacttg atgtc-ccca ccacgtgctg
PL2P1    ccgggacgct gcaccgagaa caactacttg atgtcgccca ccacgtgctg
PL2P21   ccgggacgct gcaccgagaa caacaacttg atgtcgccca ccacgtgctg
PL2P22   ccgggacgct gcaccgagaa caacaacttg atgtcgccca ccacgtgctg

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
PL2      cgcccggcgc ggttcgcgcg cagcccctgc ttcggccca ctcgcgcgtgc
PL2P1    cgcccggggc gtttcgcgcg cagcccctgc ttcggccca ctcgtcgtgc
PL2P21   cgcccggcgc ggttcgcgcg cagcccctgc ttcggccca ctcgcgcgtgc
PL2P22   cgcccggcgc ggttcgcgcg cagcccctgc ttcggccca ctcgcgcgtgc

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
PL2      ggcgcggggg gccagacgcc acgtccctcg cccctcgggg ggtggtggga
PL2P1    gggggggggg gcaagacgcc acgtccctcg ccccgggggg ggtggtggga
PL2P21   ggcgcggggg gccagacgcc acgtccctcg ccccgcgggg ggtggtggga
PL2P22   ggcgcggggg gccagacgcc acgtccctcg ccccgcgggg ggtggtggga

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
PL2      gtgtcttttg gtggggcgcc caccgcgata aaaccttccc ctttttgтта
PL2P1    gtgttttttg ggggggcccc cagggagaag tgccctcccc c-----
PL2P21   gtgtcttttg gcgggactcc caggcagaaa taacctcccc c-----
PL2P22   gtgtcttttg gcgtgacgcc caggcagacg tgccctccgc c-----

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260         270         280         290         300
PL2      ctggaagggt tttggaatcc tcaacccccg ccacgaaccg ggaagggta
PL2P1    --aagaggct t----- -----cg ggcgacactt
PL2P21   --aaaaggat t----- -----cc gggggagaat
PL2P22   --agaaggct t----- -----cg ggcgcaactt

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310         320         330         340
PL2      tcggaaaaaa gccccggttt tt----- -----
PL2P1    ggcttaaaaa actcga-tgg ttcggggttt tttgctatt- -----
PL2P21   gggataaaaa actcgaacca ttcnntttat taagcaattt tgcccc
PL2P22   gcgttcaaaa actcga-tgg ttcgcgggat tctgcaattc acacca

```

2. Comparación y alineamiento de secuencias en la familia PL4.

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                10         20         30         40         50
PL4          gctcggtcgc tcgatgggctc cttaggggccg aatggccggc cgcgcgccgg
PL4P1       -----gc tcgatgggctc cttaggggccg aatggccggc cgcgcgccgg
PL4P21     --tcggtcgc tcgatgggctc cttaggggccg aatggccggc cgcgcgccgg
PL4P22     --tcggtcgc tcgatgggctc cttaggggccg aatggccgac cgcgcgccgg

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                60         70         80         90        100
PL4          gacgctgcac cgagaacaac aacttgatgt cgcccaccta cgtgctgcbc
PL4P1       gacgctgcac cgagaacaac aacttgatgt cgcccacc-a cgtgctgcbc
PL4P21     gacgctgcac cgagaacaac aacttgatgt cgcccacc-a cgtgctgcbc
PL4P22     gacgctgcac cgagaacaac aacttgatgt cgcccacc-a cgtgctgcbc

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                110        120        130        140        150
PL4          ccggcgcgat tcgctcggcg cccctgcttc ggcccacctc gcc-tgcbg-
PL4P1       ccggcgcggt tcgccggcag cccctgcttc ggcacacctc gccgtgcbg-
PL4P21     ccggcgcggt tcgccggcag cccctgcttc ggcccacctc gccgtgcbg-
PL4P22     ccggcgcggt tcgccggcag cccctgcttc ggcccacctc gccgtgcbg-

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                160        170        180        190        200
PL4          cgtggaagcg ccagaaatca caaccctcgt cct-tgtggg tgttctggga
PL4P1       cgcggggg-g ccagacgccca cttccctcga cccgcggggg ggtgttggga
PL4P21     cgcggggg-g ccagacgccca cgtccctcgc cccgcggggg ggtgttggga
PL4P22     cgcggggg-g ccagacgccca cgtccctcgc cccgcggggg ggtgttggga

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                210        220        230        240        250
PL4          tggatttttg ggggaccacc cctgattgaa acactctatt tttctcaatg
PL4P1       gggatttttg ggctgtcgcc caggtaaaaa a----- gccctcaaaa
PL4P21     gtgtcttttg gcgtgacgcc caggaagaag t----- gccctcaacc
PL4P22     gtgtcttttg gcgtgacgcc caggaagaaa a----- gccctcctcc

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                260        270        280        290        300
PL4          taaagtttcc ggaacaccaa cccac-gcag caaagcggga agggctaccg
PL4P1       tgaaagacct gggggg--aa ttgga-gaac cacaccaaca ttgaggtttt
PL4P21     agaaggcttc ggggga--aa cttga-attc aaaaacatcg atggttcttg
PL4P22     agaaggcttc gggggc--aa cttgatactc caaaaaaaca ataatcgctg

      ....|....|  ....|....|  ..
                310        320
PL4          aaaa----- -----
PL4P1       aaacctaagt tgcccccaa gc
PL4P21     ggat-----t ctgcaattca ca
PL4P22     aaag-----t tttccgga a-

```

3. Comparación y alineamiento de secuencias en la familia PL5.

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                10         20         30         40         50
PL5          agctcgggtcg ctcgatgggt ccttagggcc gaatggccgg ccgcgcgccg
PL5P1       -----ggtcg ctcgatgggt ccttagggcc gaatggccgg ccgcgcgccg
PL5P21      -gctcgggtcg ctcgatgggt ccttagggcc gaatggccgg ccgcgcgccg
PL5P22      -----tcg  ctcgatgggt ccttagggcc gaatggccgg ccgcgcgccg

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                60         70         80         90        100
PL5          ggacgctgca ccgagaacaa caacttgatg tcgcccacca ggtgctgcgc
PL5P1       ggacgctgca ccgagaacaa caacttgatg tcgcccacca cgtgctgcgc
PL5P21      ggacgctgca ccgagaacaa caacttgatg tcgcccacca cgtgctgcgc
PL5P22      ggacgctgca ccgagaacaa caacttgatg tcgcccacca cgtgctgcgc

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                110        120        130        140        150
PL5          ccggcgcgct tcgccggcag cccctgcttc ggcccacctc gccgtgcggc
PL5P1       ccggcgcggt tcgccggcag cccctgcttc ggcccacctc gccgtgcggc
PL5P21      ccggcgcggt tcgccggcag cccctgcttc ggcccacctc gccgtgcggc
PL5P22      ccggcgcggt tcgccggcag cccctgcttc ggcccacctc gccgtgcggc

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                160        170        180        190        200
PL5          g-gggggggcc agacgccacg tccctcgccc cgc-gggggg  tgggtggggg
PL5P1       gcgggggggcc agacgccacg tccctcgccc cgcggggggg  tgttgggagt
PL5P21      gcgggggggcc agacgccacg tccctcgccc cgc-gggggg  tgggtgggaag
PL5P22      gcgggggggcc agacgccacg tccctcgccc cgc-gggcgg  ttgtgggaag

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                210        220        230        240        250
PL5          gttttttggg ggggcccggc gggagaagct ccccccgaca gaaggactcg
PL5P1       gtcttttggc gtgacgccca ggcagacgtg ccctccgcca gaaggcttcg
PL5P21      ggtttttggc ggggcccgca aggagaaggg cccccccca  aaagggttcc
PL5P22      ggtttttggc ggttccccca aggaaaaaga acctacaaaa aaaggattcc

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                260        270        280        290        300
PL5          gggcaaaatt tggttac--- --aaaaattg gtgggttcg  tttttgcacc
PL5P1       ggcgcaactt gcgttca--- --aaaactcg atggttcgcg ggattctgca
PL5P21      gggggaaatt gggttca--- --aaaacccc atgggtccgg ggaatttggc
PL5P22      gggggaaatt tgaataatcc cgaaaacat  tttgttttaa aacacatggt

      ....|....|
                310
PL5          atttaca---
PL5P1       attcacacca
PL5P21      atttaaa---
PL5P22      gcccaag--a

```

4. Comparación y alineamiento de secuencias en la familia S3.

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                10         20         30         40         50
S3          -----tcgct  cgatgggtcc  tt---agggc  cgaatggccg  gccgcgcgcc
S3P1       ctcggtcgct  cgatgggtcc  tt---agggc  cgaatggccg  gccgcgcgcc
S5P22     -tcggtcgct  cgatgggtcc  tt---agggc  cgaatggccg  gccgcgcgcc
S3P21     -----gtgct  cgccggggtc  cttacgcggc  cgaatggccc  ccccgaacct

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                60         70         80         90        100
S3          gggacgctgc  accgagaaca  ac-aacttga  tgtcgcccac  cacgtgctgc
S3P1       gggacgctgc  accgagaaca  ac-aacttga  tgtcgcccac  cacgtgctgc
S5P22     gggacgctgc  accgagaaca  ac-aacttga  tgtcgcccac  cacgtgctgc
S3P21     cgggcgggtgc  agggagaaca  acaaaaatag  tgtcgcca-   gaccgcctgc

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                110        120        130        140        150
S3          gcccggcg-c  ggttcgccgg  cagccccctgc  ttcggcccac  ctgcgccgtgc
S3P1       gcccggaa-a  ggttcgccgg  cagccccctgc  ttcggcccac  ctgcgccgtgc
S5P22     gcccggcg-c  ggttcgccgg  cagccccctgc  ttcggcccac  ctgcgccgtgc
S3P21     gccagggacc  gcttcgccag  ctgcgccgtgc  ttcggcccac  ctgcgccgtgc

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                160        170        180        190        200
S3          ggcgcggggg  gccagacgcc  acgtccctcg  ccccgcgggg  ggggtgttggg
S3P1       ggcgcggggg  gccagacgcc  acgtccctcg  ccccgcgggg  ggggtgttggg
S5P22     ggcgcggggg  gccagacgcc  acgtccctcg  ccccgcg-ggg  ggggtgttggg
S3P21     tcccgggccg  ggcagacgcc  tccccctaa  tcccgcgggc  tgttggggaa

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                210        220        230        240        250
S3          agtgtctttt  ggcgtgacgc  ccaggcagac  gtgccctccg  ccagaaggct
S3P1       agtgtctttt  ggcgtgacgc  ccaggaaaaa  aagccctcaa  aaagaaagct
S5P22     gatggctttt  ggcggggcgc  ccaggagaaa  agaacctccc  acaataggct
S3P21     ggattttttg  ggccttgctt  ccatgaagaa  cggacaaaa  tgcgaaacct

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                260        270        280        290        300
S3          tcgggcgcaa  cttgcgttca  aaaactcgat  ggttcgcggg  attctgcaat
S3P1       tcgggggaaa  tttgaaatca  aaaaaaanat  gggtnnttng  aactaaaaat
S5P22     tcggggggat  tttgggatca  aaaaccccat  ggttcagggg  attaagggat
S3P21     gggggggatt  ggagaatccc  gcgaaccaat  gagttttttg  acgcaagttt

      ....|.

S3          tcacac
S3P1       t-----
S5P22     tta---
S3P21     gc-----

```

5. Alineamiento de secuencias en la familia S5.

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                10         20         30         40         50
S5          a-----gctc  ggtcgctcga  tgggtcctta  gggccgaatg  -gccggccgc
S5P1       -----gctc  ggtcgctcga  tgggtcctta  gggccgaatg  -gccggccgc
S5P22      -----gctc  ggtcgctcga  tgggtcctta  gggccgaatg  -gccggccgc
S5P21      aagcagtctc  ggtcgctcga  tgggtcctta  gggccgaatg  tgccggccgc

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                60         70         80         90        100
S5          gcgccgggac  gctgcaccga  gaacaacaac  ttgatgtcgc  ccaccacgtg
S5P1       gcgccgggac  gctgcaccga  gaacaacaac  ttgatgtcgc  ccaccacgtg
S5P22      gcgccgggac  gctgcaccga  gaacaacaac  ttgatgtcgc  ccaccacgtg
S5P21      gcgccgggac  ggtgcaagga  gaacaacaac  ttgatgtcgc  ccaccacgtg

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                110        120        130        140        150
S5          ctgcgcccg  cgcggttcgc  cggcagcccc  tgcttcggcc  cacctcgccg
S5P1       ctgcgcccg  cgcggttcgc  cggcagcccc  tgcttcggcc  cacctcgccg
S5P22      ctgcgcccg  cgcggttcgc  cggcagcccc  tgcttcggcc  cacctcgccg
S5P21      ctgcgcccg  cgcggttcgc  cggcagcccc  tgcttcggcc  cacctcgccg

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                160        170        180        190        200
S5          tgcggcgcg  ggggccagac  gccacgtccc  tcgccccgcg  ggggggtgtg
S5P1       tgcggcgcg  ggggccagac  gccacgtccc  tcgccccgcg  ggggggtgtg
S5P22      tgcggcgcg  ggggccagac  gccacgtccc  tcgccccgcg  ggggggtgtg
S5P21      tgcggcgcg  ggggccagac  gccacgtccc  tcgccccgcg  ggggggtgtg

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                210        220        230        240        250
S5          ggaggggtt  ttgggggtgc  ccccaaggaa  aaaaaacccc  caaaaaaaag
S5P1       ggaaggggt  ttgggggtgc  ccccaaggaa  aaaaaacccc  ccacaaaaag
S5P22      gggatggct  ttggcggggc  gcccaaggag  aaagaacctc  ccacaatagg
S5P21      ggaaaggtt  ttggcggtgc  tcccatggaa  aaaaaaccta  caaaaaatag

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                260        270        280        290        300
S5          attcggggg  aaatttgaat  acaaaaacaa  accaaccccg  gaatgttaca
S5P1       cttccgggg  aaatttgaat  caaaaaaccc  aatgtttctg  tgaatcttca
S5P22      cttcggggg  attttgggat  caaaaaaccc  atggttcagg  ggattaaggg
S5P21      attcggggg  aaaattgaa-  ---aaacccc  gaaaaccatc  gagttttaaa

      ....|....|  .
                310
S5          ataaaa---- -
S5P1       atttaaaacc c
S5P22      atttaaa--- -
S5P21      acgc----- -

```

6. Comparación y alineamiento de secuencias familia S7.

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                10         20         30         40         50
S7          -ctcggtcgc tcgatgggtc cttagggccg aatggccggc cgcgcgccgg
S7P1       gctcggtcgc tcgatgggtc cttagggccg aatggccggc cgcgcgccgg
S7P21     ----cggtcgc tcgatgggtc ttaggg---g gaatggccggc cgcgcgccgg
S7P22     gctcggtcgc tcgatgggtc cttagggccg aatggccggc cgcgcgccgg

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                60         70         80         90        100
S7          gacgctgcac cgagaacaac aacttgatgt cgcccaccac gtgctgcgcc
S7P1       gacgctgcaa ggagaacaac aacttgatgt cgcccaccac gtgctgcgcc
S7P21     gacggtgcaa ggagaacaac aacttgatgt cgcccaggcg tgctgcgcc
S7P22     gacgctgcac cgagaacaac aacttgatgt cgcccaccac gtgctgcgcc

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                110        120        130        140        150
S7          cggcgcggtt cgccggcagc ccttgcttcg gcccacctcg ccgtgcggcg
S7P1       cggcgcggtt cgccggcagc ccttgcttcg gcccgctcg  ccgtgcggcg
S7P21     cggggcggtt cgccggcagc ccttgcttcg gcccgctcg  ccttgcggtt
S7P22     cggcgcggtt cgccggcagc ccttgcttcg gcccacctcg ccgtgcggcg

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                160        170        180        190        200
S7          cggggggcca gacgccacgt ccctcgcccc gcggggggtg ttgggagtgt
S7P1       cggggggccg gacgccacgt ccctctcccc ccggggggtg ttgggaaacg
S7P21     cggggggcca gacaccactt ccctctcccc gcggggcgcg ttgggagact
S7P22     cggggggcca gacgccacgt ccctcgcccc gcggggggtg ttgggagtgt

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                210        220        230        240        250
S7          cttttggcgt gacgcccagg caga-cgtgc cctccgccag aaggcttcgg
S7P1       cttttgtcgg gtctcccagc gagaaagaac ctaccaaaaa gggataccgg
S7P21     cttttgtcgg ctctcccacg gataaagaac ctaccaaaaa gggattccgg
S7P22     cttttggcgt gacgcccagg caga-cgtgc cctccgccag aaggcttcgg

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                260        270        280        290        300
S7          gcgcaacttg cgttcaaaaa ctcgatggtt cgcgggattc t-----gcaa
S7P1       ggggtgaattg cat-----aa tcccgcgaac cattcggttt ttgaacggat
S7P21     ggggtgaattg cat-----aa tcccgcgaac cattcggttt ttgaacccaa
S7P22     gcgcaacttg cgttcaaaaa ctcgatggtt cgcgggattc t-----gcaa

      .....|.....| .....|.....| .
                310        320
S7          ttcacaccac ggatcc---- -
S7P1       tttgcaccag aagc----- -
S7P21     gttgcgcccg aagccttttg g
S7P22     ttcacacccc ggatc----- -

```