

**Validación de concordancia entre los fenómenos reproductivos
poliembrionía, apomixis y efecto del polen en maíz**

ALONDRA JACQUELINE GUTIÉRREZ LÓPEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para

Obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

EN FITOMEJORAMIENTO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2014.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

Validación de concordancia entre los fenómenos reproductivos
poliembrionía, apomixis y efecto del polen en maíz

TESIS

ALONDRA JACQUELINE GUTIÉRREZ LÓPEZ

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y Aprobada como requisito
parcial para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN FITOMEJORAMIENTO

COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal:



Dr. José Espinoza Velázquez.

Asesor:



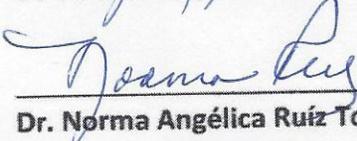
Dr. Raúl Rodríguez Herrera

Asesor:



Dr. Alfonso López Benítez

Asesor:



Dr. Norma Angélica Ruíz Torres



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Posgrado

Saltillo, Coahuila, México, Diciembre 2014

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por ser mi segunda casa.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado durante mis estudios de postgrado.

Al **Dr. José Espinoza Velázquez** por su temple, apoyo en todo momento y dirección en el proceso de mi formación profesional de maestría.

Al **Dr. Raúl Rodríguez Herrera** por su gran apoyo en las tareas de laboratorio así como en la formación y redacción de esta tesis.

Al **Dr. Alfonso López Benítez** y a la **Dra. Norma Angélica Ruíz Torres** por el apoyo durante la formación y redacción de esta tesis.

Al **Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés** por su asesoría en análisis estadísticos y moleculares presentes en esta tesis.

Con mucho aprecio, a mis profesores de maestría que contribuyeron a mi formación profesional y personal, en especial al **Dr. Reyes, Dr. Espinoza, Dr. González** y al **Dr. de León**, entre otros.

A compañeros y amigos de la maestría, **Nury, Diana, Inés, Pilar, Rosendo, Yonis, Agustín, José Luis, José Antonio y Odilón**, por su amistad y compañerismo.

A todas aquellas personas que de algún modo me ayudaron, y que sin querer omití.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis con todo mi corazón a la persona más especial que existe para mí, **MI MADRE YOLANDA**, por su sacrificio, cariño incondicional y el apoyo que siempre me ha brindado en todo momento. Este logro también es tuyo.

A mi padre **GUSTAVO** (†), por todas sus enseñanzas y que aunque al pesar del tiempo siempre está presente.

A mis hermanas **Oneyda, Adriana, Angélica y Guadalupe** por su apoyo, cariño y por estar siempre conmigo como mis mejores amigas.

A tooodos mis sobrin@s que son muchos, que los amo y quiero mucho en especial a mi **Alfredo**, que ya casi le quita el trono **Elie Yolanda**.

A **Miguel Ángel** por todo su cariño, amor, apoyo total y paciencia.

COMPENDIO

**Validación de concordancia entre los fenómenos reproductivos
poliembrionía, apomixis y efecto del polen en maíz**

POR

ALONDRA JACQUELINE GUTIÉRREZ LÓPEZ

MAESTRÍA EN CIENCIAS

FITOMEJORAMIENTO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. DICIEMBRE de 2014

DR. JOSÉ ESPINOZA VELÁZQUEZ –ASESOR PRINCIPAL--

Palabras clave: *Zea mays* L., marcadores moleculares, similaridad genética, variación genética.

El maíz (*Zea mays* L.) es una de las especies que cuenta con una gran diversidad genética, generada a partir de la mutación, selección, y recombinación, ligada a las necesidades de las poblaciones humanas en

crecimiento. Diversidad que resulta de gran interés y que han permitido la creación de variedades que reúnen características deseables en la producción de alimentos. Una de las características del maíz que puede ser utilizada para el diseño de nuevas variedades es la poliembrionía (PEm), dada su influencia en la calidad del grano, mayor contenido de ácidos grasos, triptófano y lisina, así como el potencial de rendimiento por la condición de generar plantas múltiples por semilla.

El propósito de este trabajo fue validar fenómenos ligados a la PEm, planteándose tres objetivos: 1) Identificar secuencias polimórficas y monomórficas de regiones hiper-variables del ADN, 2) Determinar homocigosis o heterocigosis a nivel ADN en plantas y 3) Determinación de polimorfismo en la expresión de la poliembrionía debido al efecto del polen.

El material de estudio para la identificación de secuencias polimórficas y monomórficas de las regiones hiper-variables (ITS e IGS) consistió en tres familias, dos de ellas con progenies nivel de endogamia S_1 , y la tercera con progenie originada por polinización abierta o libre (D-S₁-03, D-S₁-05 y D-PL-13) de la población UAAAN-IMM-BAP (en breve BAP o D), además se incluyó a muestras de ADN de dos familias (D-S₁-03* y D-S₁-07*) previamente analizadas por Avendaño (2012). Los genotipos utilizados para determinar homocigosis y heterocigosis, y variación genética mediante la utilización de marcadores moleculares de tipo microsatélites (SSR) fueron de las familias D-S₁-03, D-S₁-03*, D-S₁-07* y D-PL-13. Para la determinación de polimorfismo en

la expresión de la PEm por el efecto del polen se realizó mediante inter-microsatélites (ISSR), utilizando progenies de dieciséis cruzas directas y recíprocas de las poblaciones BAP y UAAAN-IMM-NAP (en breve NAP o C), y como materiales de referencia, prototipos del maíz común, No-PEm, la línea de alta endogamia denominada AN-Tep.3 y la población Tuxpeño-HOC.

El juego de comparaciones entre los integrantes de las familias PEm S₁ y PL mostraron en algunos casos, como en las familias D-S₁-07* y D-PL-13, una proporción de alta similitud en la región ITS con valores de hasta 100%, sin embargo, la discrepancia a esta similaridad se observa en los valores obtenidos en la región IGS con porcentajes menores o iguales a 81%, corroborando así que la utilización de regiones hipervariables ITS no es evidencia suficiente para avalar una condición genética idéntica entre la planta madre y una de las hijas PEm. En las familias D-S₁-03, D-S₁-03* y D-S₁-07*, el mayor porcentaje de similaridad fue para el par de plantas poliembriónicas hermanas, originadas de la misma semilla.

Los resultados de similaridad genotípica (homocigoto y heterocigoto) evidenciaron el aumento de los loci homocigotos en la progenie, plantas individuales y PEm. Los estimadores de variabilidad genética, el análisis de varianza molecular, el patrón de ordenamiento y agrupamiento de las familias muestran una estrecha relación entre los integrantes de las familias analizadas. Las familias que tuvieron una distancia más ordenada fueron D-S₁-03 y D-S₁-07*. Este análisis aporta evidencia para establecer que el tipo de reproducción

de las familias analizadas es sexual, y que solo existe una relación estrecha, pero no una condición genética idéntica entre la planta madre y una de las hijas, sean estas de tipo individual y/o PEm.

Los estimadores de variabilidad muestran poca variación entre las cruzas analizadas. El mayor polimorfismo se presentó cuando los dos progenitores de expresión fenotípica PEm provenían de diferente población, en concreto NAP como polinizador, y BAP como hembra. La menor variación fue cuando ambos progenitores PEm correspondían a la población BAP. Se determinaron cuatro tipos de fuentes de polen, denominados como: PE,RE, No-PE, PE,NoRE y No-PE,NoRE. Tres de los polinizadores (PE,NoRE, No-PE,NoRE y No-PE,RE) con valores intermedios-altos de polimorfismo presentaron progenies con distancias estrecha entre el par de plantas PEm (Parcelas 6, 26 y 34). Los valores de distancias genéticas estrechas 0.0 y 0.03 no indica necesariamente que el par de plantas PEm sean idénticas. Los dendrogramas y árboles de recorrido mínimo apoyan la relación estrecha de las plantas hermanas PEm.

Se determinó un locus de asociación, el 341 del ISSR1, correlacionado con la dirección de cruce sin importar la expresión fenotípica de los progenitores (*valor-p* 1.13E-06), y además el locus 363 ISSR 11 se asocia a la expresión fenotípica PE y No-PE cuando uno de los progenitores es PEm y el otro individual, proveniente de familia de naturaleza PEm (*valor-p* 7.89E-07).

El análisis de asociación de frecuencias de la PEm con respecto a la dirección de la cruce demostró que no existe relación alguna con la presencia de plantas PEm. La mayor frecuencia de plantas poliembriónicas se presenta cuando los dos progenitores proceden de diferente población poliembriónica, ambos de expresión fenotípica PEm, donde el polinizador pertenece a la población NAP, y la hembra BAP, similar al caso donde se presentó el polimorfismo más elevado. Se corroboró el fenómeno de la penetrancia incompleta cuando se cruzan dos plantas individuales, emparentadas o no, pero que provienen de familias de naturaleza poliembriónica. Se determinó que la frecuencia PEm en las progenies de estos casos, alcanza proporciones entre 57 y 70%.

COMPENDIUM

**Concordance validation among polyembryony, apomixis and pollen effect
reproductive phenomena in maize**

BY

ALONDRA JACQUELINE GUTIÉRREZ LÓPEZ

MASTER IN SCIENCE

in

PLANT BREEDING

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MEXICO. DECEMBER, 2014

Dr. José Espinoza Velázquez –Advisor--

Key words: *Zea mays* L., molecular markers, genetic similarity, genetic variation.

The maize (*Zea mays* L.) is one specie that counts on a great genetic diversity, fuelled by mutation, selection and genetic recombination, and it is consubstantial to requirements of the growing human population. Diversity that

have led to variety generation that fulfill desirable characteristics for food production. Polyembryony (PEm) is one maize trait that can be used to generate new varieties given its effects on grain nutritional quality: more content of fatty acids, tryptophan, and lysine, as well as its yield potential because of the multiple plants originated per seed.

The aim of this work was to validate the links of PEm to other phenomena, with three main objectives: 1) To identify polymorphic and monomorphic DNA sequences in hypervariable regions; 2) To determine homozygosity and heterozygosity at DNA level in plants; and 3) The polymorphisms determination in the PEm expression due to pollen effect.

The study material for the polymorphic and monomorphic sequences identification in hypervariable regions (ITS and IGS) were three families, two of them with progenies S_1 inbreeding level, and the third with progeny generated by open pollination (D-S₁-03, D-S₁-05 and D-PL-13) which were derived from the maize population named UAAAN-IMM-BAP (in short BAP or D). Beside those, DNA samples from two families (D-S₁-03* and D-S₁-07*) previously analyzed by Avendaño (2012) were also included. The study genotypes to determine homozygosity–heterozygosity and genetic variation by means of microsatellites (SSR) molecular markers were families D-S₁-03, D-S₁-03*, D-S₁-07* and D-PL-13. The polymorphism determination in the PEm expression due to pollen effect was worked out by means of inter-microsatellites (ISSP) using 16 progenies from either direct or reciprocal crossings between BAP and UAAAN-

IMM-NAP (in short NAP or C) genotypes, and the highly inbred line named AN-Tep.3 and the Tuxpeño-HOC population, both as a model representing the Non-PEm common maize type.

The comparison sets among the PEm S_1 and PL families presented in some cases, as in the families D- S_1 -07* and D-PL-13, one proportion of high similarity for the ITS region with values up to 100 %, however, the discrepancy to these similarity came out from the values observed at the IGS region, which were lesser or equal to 81 %, leading to the knowledge that using hypervariables ITS region is not whatsoever a sufficient evidence to declare an identical genetic condition between a mother plant and its PEm daughters. In families D- S_1 -03, D- S_1 -03* and D- S_1 -07*, the highest similarity percentage was observed in the pair comparison between the PEm sister plants, originated in the same seed.

The genotypic (homozygotes and heterozygotes) similarity results gave evidences for homozygous loci increase in the progeny, individual or PEm type plants. All estimates, for genetic variability, molecular analysis of variance, the order path, and family grouping showed a narrow relation among the analyzed family members. The families that had the most ordered distance were D- S_1 -03 and D- S_1 -07*. This analysis gave evidences to point out that family reproduction is sexually driven, and that there is a close relation but not a genetic identity between the mother plant and its daughters, no matter if nurtured as individual or PEm type plants.

The variability estimator showed little variation for the analyzed crosses. The biggest polymorphism was shown when both parents being phenotypically PEm came from different population, in short when male parent was NAP, and female was BAP. The lowest variation was shown when PEm parents belong to the BAP population. Four types of pollen source were used, named as: PE,RE, No-PE, PE,NoRE, and No-PE,NoRE. Three of the pollinators (PE,NoRE, No-PE,NoRE and No-PE) with middle to high polymorphism values given progenies with a narrow distances between the PEm pair plants (plots 6, 26, and 36). The narrowed genetic distances of 0.0 and 0.03 values not necessarily indicate that PEm pair plants were identical. The dendrograms and minimum path trees support the close relation between PEm sister plants.

It was determined that an associate locus, the 341 from ISSR1, is correlated to the cross direction, no matter the parents phenotypic expression (p value = $1.13 \text{ E-}06$), and the locus 363 from ISSR 11, is associated to PE and No-PE phenotypic expression whenever one parent is PEm and the other is of individual type, even though it came from a family of the PEm kind (p value = 7.89E^*07).

The analysis related to to association between PEm frequency and crossing direction showed that there is no relation what so ever about appearance of PEm plants. The highest frequency of polyembryonic plants is obtained when parents belong to a different population, both being PEm expression, where pollinator is from NAP population and female is from BAP,

which is similar to the case where it was shown the highest polymorphism. It was also corroborated the presence of the incomplete penetrance phenomena whenever two individual type plants are crossed, related or not, but both came from polyembryonic families. It was determined that progeny PEm frequency of this type of crossings can reach values among 57 to 70 %.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	xviii
ÍNDICE DE FIGURAS	xxii
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivos.....	4
Hipótesis.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
Naturaleza y Clasificación de la Poliembrionía.....	5
Poliembrionía en maíz.....	9
Apomixis.....	15
Técnicas moleculares.....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
Objetivo (1) Identificación de secuencias polimórficas y monomórficas de regiones hiper-variables.....	24
Material Genético.....	24
Siembra en invernadero.....	25
Selección de plántulas.....	26
Toma de la muestra.....	26
Extracción del ADN.....	27
Evaluación del ADN extraído.....	28
Electroforesis del ADN extraído.....	28
Amplificación las regiones hipervariables.....	29

Secuenciación.....	30
Edición de secuencias y alineamiento	31
Análisis molecular de las regiones hipervariables ITS e IGS	31
Análisis estadístico de la prueba de X^2 de bondad de ajuste.....	32
Objetivo (2) Determinación de homocigosis o heterocigosis.....	32
Material Genético	32
Amplificación de SSR's	33
Análisis estadísticos de datos moleculares SSR's	35
Objetivo (3) Determinación de polimorfismo en la expresión de la poliembrionía debido al efecto del polen	36
Material genético y manejo reproductivo.....	36
Siembra en invernadero	38
Toma de las muestras foliares	40
Amplificación de ISSR's por PCR	41
Análisis ISSR	42
Análisis de asociación de la prueba exacta de Fisher.....	43
Análisis de asociación de la prueba X^2 de la tabla de contingencia...	44
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
Objetivo 1: Identificación de secuencias polimórficas y monomórficas de regiones hiper-variables	45
Selección de plantas PEm	45
Extracción, pureza e integridad del ADN	46
Longitud de los fragmentos de las regiones hipervariables ITS e IGS.	47

Análisis molecular de las regiones hipervariables ITS e IGS	48
Comparación de secuencias nucleotídicas de familias S ₁	49
Comparación de secuencias nucleotídicas de la familias PL.....	56
Análisis agronómicos de familias PEs.....	59
Objetivo 2: Determinación de homocigosis o heterocigosis mediante marcadores moleculares SSR.....	62
Análisis molecular de los SSR	62
Estimadores de la variabilidad genética.....	66
Análisis de varianza molecular (AMOVA)	67
Objetivo 3: Determinación de polimorfismo en la expresión de la poliembrionía debido al efecto del polen	73
Análisis molecular de los ISSR	73
Variabilidad genética.....	74
PE,RE x No-PE,NoRE (Parcela: 26).....	83
PE,NoRE x No-PE,RE (Parcela: 6).....	84
No-PE,RE x PE,NoRE (Parcela: 34).....	85
Análisis de la Prueba Exacta de Fisher.....	86
Análisis de asociación de la prueba X ² tabla de contingencia.....	88
Frecuencia de la poliembrionía en los diferentes cruzamientos.....	90
V. CONCLUSIONES.....	95
VI. RESUMEN.....	97
VII. LITERATURA CITADA	103

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1. Genotipos utilizados para identificar las secuencias polimórficas y monomórficas.	25
Cuadro 3.2. Composición de la reacción para la región ITS.	30
Cuadro 3.3. Composición de la reacción para la región IGS.	30
Cuadro 3.4. Comparaciones de las secuencias de los integrantes de las familias.....	31
Cuadro 3.5. Genotipos utilizados para la determinación de homocigosis o heterocigosis mediante SSR.....	33
Cuadro 3.6. Lista de los diez marcadores de secuencias simples repetidas (SSR) con su posición genómica, temperatura de alineamiento y secuencia.....	34
Cuadro 3.7. Composición de la concentración final de la reacción para SSR. .	35
Cuadro 3.8 Genotipos de maíz poliembriónicos y exóticos.	37
Cuadro 3.9. Esquema de cruzamiento de diferentes genotipos de forma directa y recíproca para la población de referencia BAP.	38
Cuadro 3.10 Cruzas de maíz entre los genotipos Exóticos x NAP o BAP.	39
Cuadro 3.11 Genotipos muestreados para determinar polimorfismo en la expresión de la poliembriónía debido al efecto del polen. Tejido foliar.	40
Cuadro 3.12 Temperatura y secuencia de los tres iniciadores ISSR 's.	41
Cuadro 3.13 Composición de la reacción para ISSR's, 11.5 µL de reacción para los tres primers.	42
Cuadro 3.14 Grupos de cruzamiento dependiendo del tipo de progenitores.	44
Cuadro 4.1 Relación de plántulas seleccionadas con diferente expresión fenotípica.	46

Cuadro 4.2 Comparación de secuencias de ADN de la región ITS de la familia D-S ₁ -03.....	49
Cuadro 4.3 Comparación de secuencias de ADN de la región ITS de la familia D-S ₁ -03* (Avendaño, 2012).....	51
Cuadro 4.4 Comparación de secuencias de ADN de la región ITS de la familia D-S ₁ -05.....	53
Cuadro 4.5 Nueva comparación de secuencias de ADN de la región ITS de la familia D-S ₁ -07* (Familia generada por Avendaño en 2012). ..	54
Cuadro 4.6 Nueva comparación de secuencias de ADN de la región IGS de la familia D-S ₁ -07* (Avendaño, 2012). ..	55
Cuadro 4.7 Comparación de secuencias de ADN de la región ITS de la familia D-PL-13.	57
Cuadro 4.8 Comparación de secuencias de ADN de la región IGS de la familia D-PL-13	58
Cuadro 4.9 Porcentajes de las variables GER, PEm y PAN de materiales exóticos, familias S1 y de polinización abierta PL de maíces poliembriónicos.....	60
Cuadro 4.10 Valores de χ^2 calculada para el análisis genético del carácter PEm.....	61
Cuadro 4.11 Rango y número de los alelos para cada locus de los SSR.....	63
Cuadro 4.12 Homocigosis y heterocigosis de Plantas Individuales (PI) Planta PEm (1 de 2 y 2 de 2) con la Madre.	64
Cuadro 4.13 Análisis de similitud de los SSR en porcentaje.	64
Cuadro 4.14. Estimadores de variabilidad genética de cuatro familias poliembriónicas (PEm) y genotipos exóticos.	67
Cuadro 4.15 Análisis molecular de varianza (AMOVA) dentro y entre Familias poliembriónicas.....	68
Cuadro 4.16 ISSR utilizados para la amplificación por PCR de las muestras de maíz poliembriónico, número de productos amplificados por iniciador y nivel de polimorfismo obtenido.	73

Cuadro 4.17 Estimadores de variabilidad genética.....	76
Cuadro 4.18 Cuadro de distancias genéticas de las cruzas de genotipos poliembriónicos.....	79
Cuadro 4.19 Tabla de contingencia de la dirección de la crusa contra marcador ISSR	87
Cuadro 4.20 Tabla de contingencia de la poliembrionía contra Marcador ISSR.	88
Cuadro 4.21 Tabla de contingencia de la prueba de X^2 de los grupos directa y recíproca.	89
Cuadro 4.22. Valores de X^2 de la prueba de la bondad de ajuste y de p - valor a partir de cruzas de maíces poliembriónicos con maíces ajenos a la poliembrionía.	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Organización de la estructura en tándem repetida del ADN ribosomal.....	21
Figura 4.1 Estructura de plántula poliembriónica, compartiendo el nudo escutelar.....	46
Figura 4.2 ADN genómico total extraído de tejido foliar provenientes de plantas de maíces poliembriónicos.....	47
Figura 4.3 Gel de electroforesis de las regiones (a) ITS y (b) IGS. Carril M, marcador de peso molecular de 100pb; Carril 2-12, muestras de maíces poliembriónicos.....	48
Figura 4.4 Análisis de coordenadas principales (ACoP) de genotipos de maíces poliembriónicos y exóticos, utilizando los marcadores moleculares SSR. *= Familias analizadas por Avendaño en 2012.....	70
Figura 4.5 Dendrograma de genotipos de maíces poliembriónicos y exóticos basados en medidas de distancia Andeberg.*=muestras de familias generadas por Avendaño 2012	71
Figura 4.6 Dendrograma (a) y ARM a partir de coordenadas principales (CP1 y CP2) se superpone el árbol de recorrido mínimo (b), ambos a partir de la matriz de distancia basada en el índice de distancia Anderberg de la cruce PE,RE x No-PE,NoRE	84
Figura 4.7 Dendrograma (a) y ARM a partir de coordenadas principales (CP1 y CP2) se superpone el árbol de recorrido mínimo (b), ambos a partir de la matriz de distancia basada en el índice de distancia Anderberg de la cruce PE,NoRE x No-PE,RE.....	85
Figura 4.8 Dendrograma (a) y ARM a partir de coordenadas principales (CP1 y CP2) se superpone el árbol de recorrido mínimo (b), ambos a partir de la matriz de distancia basada en el índice de distancia Euclídea de la cruce No-PE,RE x PE,NoRE	86

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo del maíz (*Zea mays* L.) en México siempre ha sido de gran interés desde el punto de vista económico, cultural y alimentario. Es una de las especies más productivas y cultivadas, cuenta con una gran diversidad genética, formas, texturas, colores, comportamientos y adaptaciones geográficas, generados a partir de la mutación, selección, y recombinación ligados a las necesidades de las poblaciones humanas en crecimiento (Kato *et al.*, 2009). Diversidad que resulta de gran interés y acciones de los agricultores, que en conjunto han permitido la creación de nuevas variedades de maíz reuniendo las características más aprovechables.

Una de las características del maíz que puede ser utilizada para el diseño de nuevas variedades es la poliembrionía, generada a partir de una mutación natural, de alto potencial productivo y calidad nutrimental del grano, bajo la hipótesis de que dos o más embriones por semilla, favorecen el aumento de la producción tanto en el número de plantas como de mazorcas, permitiendo incrementar el almacenamiento de nutrientes de calidad debido al mayor número de embriones (Espinoza *et al.*, 1998; González *et al.*, 2011).

El instituto Mexicano del Maíz - Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (IMM-UAAAN) desarrolla uno de los programas dirigido a estudiar la genética y utilización de la poliembrionía (PEm), lográndose en la actualidad mantener dos poblaciones denominadas en breve, BAP (enana) y NAP (planta de porte normal) (Castro, 1979; Espinoza *et al.*, 1998, 2012). Uno de los resultados de investigación se refiere a la propuesta de la herencia de la PEm, la cual está controlada por dos loci epistáticos recesivos duplicados, donde basta la presencia de un alelo dominante para expresar la condición normal de planta (Rebolloza *et al.*, 2011). Además, se han realizado diversos estudios en relación a los fenómenos ligados a la PEm, como son la documentación de tejido somático (radícula) con células triploides $2n = 3x = 30$ cromosomas (Espinoza *et al.*, 2000), y la propuesta de Espinoza y de León (2005) sobre la posibilidad de que la población BAP pudiera presentar algún tipo de reproducción apomíctica ya que la poliploidía y poliembrionía van regularmente acompañando a la reproducción asexual de este tipo. Al respecto, uno de los trabajos en BAP y NAP donde se buscó la formación de granos sin la acción de la polinización no fue concluyente, ya que se presentó la formación de granos pero, sin la certeza de que se debiera a mecanismos de apomixis (Gallegos, 2007).

En el tema de la PEm también se han realizado diversos estudios basados en el ADN, como determinar mediante el análisis de AFLP's el polimorfismo de la descendencia de plantas individuales y poliembriónicas provenientes de plantas hembras polinizadas con polen de plantas emparentadas y no

emparentadas y con y sin alta poliembrionía (Villareal, 2007). Otro análisis utilizando la misma técnica, fue determinar la asociación de loci relacionados a la poliembrionía, mediante genotipos poliembriónicas experimentales de las poblaciones BAP y NAP (Valdés-Monsivais *et al.*, 2012), en el mismo contexto de asociación, se realizó un análisis utilizando una población segregante F_2 , proveniente de una cruce entre la población BAP y PUMA (Cruz-Requena *et al.*, 2014). También, el realizado por Avendaño (2012) mediante la comparación de secuencias hiper-variables (ITS), donde se utilizó líneas S_1 y familias de medios hermanos de polinización libre correspondiente a la población BAP, el cual presentó un dato interesante en semejanza de secuencias entre madre y una de las hijas PEm en dos de sus familias, surgiendo la interrogante de una probable relación entre poliembrionía y apomixis.

La PEm como fenómeno aprovechable desde el punto de vista agronómico, por efecto en la calidad de los nutrientes con un alto contenido de aceite y calidad proteica, así como el aumento de materia seca en plantas PEm, requiere seguir estudiándose desde la perspectiva agronómica y molecular y en el contexto a este trabajo, la validación de estudios anteriores aportaría un soporte en el propósito de evidenciar claramente la relación entre los fenómenos reproductivos apomixis y poliembrionía en maíz.

En el presente trabajo se hace uso de los marcadores moleculares basados en el grado de variación, como pruebas genéticas en el estudio de regiones hiper-variables (ITS e IGS) y microsatélites (SSR e ISSR) para indagar

con respecto a fenómenos genéticos, mediante el conocimiento de similaridad, polimorfismo, distancia genética entre los integrantes de familias PEm y la asociación de marcadores moleculares.

Utilizando plantas de maíz de origen poliembriónico los objetivos son:

1. Identificar secuencias polimórficas y monomórficas de regiones hipervariables del ADN.
2. Determinar homocigosis o heterocigosis a nivel ADN en plantas.
3. Determinación de polimorfismo en la expresión de la poliembriónía debido al efecto del polen

Hipótesis

La relación de los fenómenos reproductivos poliembriónía, apomixis y efecto del polen en la expresión de la poliembriónía en maíz, tienen una base genética.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Naturaleza y Clasificación de la Poliembrionía

La formación de varios embriones en una semilla sin considerar su origen es conocido como poliembrionía (PE), el fenómeno ocurre espontáneamente en varias especies de plantas y frecuentemente en las angiospermas [Maheshwari, 1950 (citado por: Linacero y Vázquez, 1994); Peter, 2009; Batygina y Osadtchiy, 2013; Blancahard *et al.*, 2010]. Los embriones adicionales pueden resultar de la diferenciación y desarrollo de varios tejidos, cigoto, sinérgidas, antípodas, nucela o del tegumento (Peter, 2009). En plantas, el 78% de los casos poliembriónicos tienen origen del tejido maternal y el 19% proveniente de la partición del cigoto fertilizado siendo genéticamente diferentes al genotipo de la madre (Ganeshaiyah *et al.*, 1991).

La poliembrionía puede aparecer debido a varias razones, algunos autores consideran que en plantas las causas principales surgen en el curso del proceso sexual. Sin embargo, en algunos casos los dos procesos, sexual y asexual, se pueden producir simultáneamente, resultando la formación de varios embriones en una semilla, que difieren en origen y composición genética (Batygina y Osadtchiy, 2013). La poliembrionía en plantas es una característica

de herencia recesiva controlada por uno o más genes recesivos, los cuales actúan juntos en recombinaciones adecuadas (Durzan, 2008).

Las primeras menciones sobre este fenómeno se ubican dos siglos atrás, y se considera a Leeuwenhoek como su descubridor en 1719, quien observó la formación de dos plántulas de la misma semilla en cítricos (Batygina y Vinogradova, 2007), y ha sido descrita de diversas maneras por muchos autores (Pandey y Chadha, 1996). El primer sistema de clasificación fue propuesto por Braun (1859) quien la describe en cuatro tipos: 1) división del cigoto, 2) desarrollo de más de un saco embrionario dentro del mismo óvulo, 3) formación de embriones a partir de células del saco embrionario diferente a la célula huevo y 4) activación de alguna célula esporofita inicial del óvulo (Pandey.,1996; Batygina y Vinogradova, 2007).

Otra clasificación es la propuesta por Ernst (1918), la cual ha sido generalmente aceptada con algunas modificaciones a lo largo del tiempo, y consta de dos categorías, 1) la primera se señala como verdadera poliembrionía y se presenta cuando dos o más embriones se originan en el mismo saco embrionario, y 2) la segunda es denominada falsa poliembrionía, originando embriones de varios sacos embrionarios (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984; Ramawat *et al.*, 2014). En otro orden de ideas, Yakovlev en 1967 (citado por Batygina y Vinogradova, 2007; Ramawat *et al.*, 2014) propuso una base genética para la clasificación de la poliembrionía: a) la gametofítica, que se refiere al origen de múltiples embriones provenientes de células

somáticas del saco embrionario (sinérgida o antípoda) después de la fertilización o sin ella. En este caso se forman embriones tanto haploides como diploides; y b) la poliembrionía esporofítica, que es cuando múltiples embriones se originan de las células esporofíticas del ovulo (nucela ó integumento) sin fertilización y los embriones son diploides parecidos a la madre. También se incluye el fenómeno de cleavage monocigótico y la poliembrionía endospermal, con la excepción de estas dos últimas, las formas de poliembrionía están asociadas con apomixis. De acuerdo con Lakshmanan y Ambegaokar (1984) la poliembrionía en angiosperma puede ser clasificada como simple o múltiple, dependiendo de la presencia de uno o más sacos embrionarios en el mismo ovulo, y por su naturaleza la poliembrionía puede ser sexual o asexual (apomixis).

Se dice que la poliembrionía es simple cuando en un mismo saco embrionario se desarrollan varios embriones, y múltiple cuando éstos se forman en varios sacos embrionarios. La poliembrionía múltiple pueden ser esporofítica o gametofítica y generada por reproducción asexual, los embriones esporofíticos, por otro lado, usualmente ocurre a partir de células de la nucela o integumentos, la poliembrionía gametofítica puede ser haploide o diploide (Naumova, 1992; Singh, 2010).

Existen diferentes opiniones con respecto a la causa para explicar el origen de la poliembrionía, como la teoría de necrohormona que propuso Harberlant (1922) (citado por: Reddy, 2004) donde la degeneración de las

células nucelares pueden producir simultáneamente sustancias llamadas necrohormonas. Estas sustancias pueden inducir a las células adyacentes, dividirse y formar embriones adventicios durante la embriogénesis cigótica normal. Por otro lado, se encuentra la teoría explicada por Leroy (1947) y Baker (1960), la del gene recesivo en la cual un juego de genes recesivos son responsables de la condición poliembriónica, esto ocurre en pocas taxas, por ejemplo el mango en su forma mono embriónica posee genes dominantes y la condición poliembriónica posee genes recesivos. El juego de genes recesivos puede ser el resultado y la expresión del carácter después de la recombinación durante la hibridación.

De acuerdo con Frusato *et al.* en 1957 (citado por Reddy, 2004), diferentes factores tales como 1) la edad, se forman más embriones en plantas más viejas, 2) condición nutricional, con el aumento de suministros de nutrientes se forman más embriones y 3) producción de frutos, a mayores años más elevada la producción de frutos, este es responsable de la poliembrionía en cítricos. También, la ocurrencia de poliembrionía puede variar en gran medida, algunos de los factores son que está fuertemente influenciada por las condiciones ambientales, como la nutrición de la planta, temperatura del medio ambiente, humedad del suelo, del ambiente, y velocidad del aire. Además, los factores que afectan la polinización, como el tipo de polinizador y cantidad de polen disponible, fertilización o desarrollo de la semilla que también afectarán en el porcentaje de poliembrionía y el número de embriones por semilla (Micke *et al.*, 2000; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005).

La poliembrionía es relevante en algunas especies, en las cuales se han realizado diversas investigaciones, tal es el caso en los cítricos donde sólo parece ocurrir en presencia de la reproducción sexual normal, ya que el desarrollo del embrión cigótico conduce al desarrollo de embriones apomícticos a partir de la nucela (Sánchez-Damas *et al.*, 2006; Aleza *et al.*, 2010), resultando inconveniente ya que se convierte en uno de los principales obstáculos debido a que se complica el distinguir los híbridos (de Oliveira *et al.*, 2002; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005). Sin embargo, así como en los cultivos de mangos, los embriones nucelares son deseables para la propagación del mango como patrones debido a su uniformidad (Litz, 1997; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005). También existen otros cultivos que presentan las características de poliembrionía como algunas variedades de olivo que son de origen sexual mostrando cleavage monocigótica después de la fertilización (Trapero *et al.*, 2014).

Poliembrionía en maíz

Entre las citas iniciales sobre la expresión de dos embriones en el maíz está la de Randolph *et al.*, (1936). Otra cita clásica es la de Morgan y Rappleye (1951) quienes reportan la presencia de múltiples plantas provenientes de una sola semilla al hacer cruzamientos de líneas puras con polen expuesto a diferentes dosis de rayos X, y señalan que dosis crecientes de radiación generan mayores niveles de poliembrionía. En un estudio realizado por

Sharman (1942), encontró que al diseccionar dos embriones provenientes de una sola semilla se observaba que estos embriones estaban separados excepto por el escutelo, sugiriendo así que ambos embriones eran idénticos produciendo plantas típicas con el número normal de cromosomas ($2n$).

Una mutación espontánea en maíz fue la descrita por Kermicle (1969) denominada (indeterminate gametophyte) *ig*, que produce efectos inusuales en el saco embrionario en las plantas portadores de este gen mutante. Algunos efectos están asociados a este gen debido a que altera el desarrollo del gametofito femenino, en los que se pueden mencionar como las plantas mutantes homocigóticas (*igig*) presentan androesterilidad, cerca del 50% del grano se producen plantas del tipo *igig* y el 25% de estas plantas son abortivas o anormales; alrededor del 6% de las semillas con endospermo normal que recibieron *ig* de la versión *Igig* o *igig* son poliembrionicas, y cuando las plantas con *igig* eran cruzadas, alrededor del 3% de la progenie tenía la condición monoploide. La monoploidía es de origen materno-paterno, y se presenta en la proporción 1:2, lo que evidencia el mal funcionamiento en el desarrollo del gametofito femenino (Hallauer *et al.*, 2010).

Las aplicaciones agronómicas de la condición de plantas múltiples de maíz germinadas de una sola semilla, fue inicialmente señalada por Pesev *et al.* (1976) quienes desarrollaron líneas endogámicas de maíz a partir de una población que contenía la expresión de plantas gemelas en baja frecuencia; los autores reportaron haber obtenido líneas endogámicas con frecuencias diversas

del carácter (entre 2.1% y 25.3%). En estos maíces se encontró un contenido más alto de lisina y aceite comparados con granos que contenía un solo embrión. Posteriormente, Pollacsek (1984) encontró en una línea de maíz la presencia de plantas con doble tallo en un frecuencia de 4.5% y determinó que la naturaleza de esta poliembrionía no era genética sino que obedecía a una partición temprana que toma lugar durante la embriogénesis, además con una baja penetrancia incompleta. Erldeska et al. (1992) realizaron estudios sobre la presencia de poliembrionía del tipo cleavage de manera espontánea e inducida por 2,4 D (ácido diclorofenoacético).

Los estudios en México sobre genotipos de maíz que manifiestan el fenómeno de plántulas múltiples por semilla germinada han sido publicados en su mayoría por investigadores del Instituto Mexicano del Maíz “Dr. Mario E. Castro Gil” de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (en párrafos en adelante, a estos nombres se le denomina “IMM-UAAAN”). Inicialmente, Castro (1973) reportó la composición de una población de maíz denominada selección súper enana (SSE) integrada por diversas fuentes de germoplasma, cuyas características centrales fueron el porte bajo de sus plantas, incluyendo al gen braquítico-2 (br-2, recesivo), y a una fuente de maíz enano tallo-cuadrado de procedencia argentina. En el proceso de mejoramiento de esta población se pudo detectar la presencia esporádica de plantas gemelas (frecuencia menor a 2%) como segregantes de la recombinación de los genotipos iniciales (Castro *et al.*, 1978).

Considerando que el fenómeno de plantas gemelas pudiera ser de importancia en la mejora genética del maíz, se aisló reproductivamente a un grupo de éstas y se inició un proceso de incremento y selección a favor de la condición gemelar. En el seguimiento de esta estrategia, se formaron tres grupos sintéticos, presentando en dos de ellos dobles embriones de un aumento por selección de 4.012% a 11.43% y en un tercero con plantas sin doble embrión de sólo 4.012% a 5.011% (Rodríguez y Castro, 1978). Al cuarto ciclo de selección, la frecuencia de poliembrionía alcanzó 33.28%, indicando además que el carácter se debe a genes de acción aditiva; concluyendo que el carácter es altamente heredable y que las plantas provenientes de una sola semilla son genéticamente idénticas en base a la reducida varianza que se presenta entre las plantas (Castro, 1979; Rodríguez, 1981). Para el sexto ciclo de selección, la población de plantas gemelas mostró una frecuencia de 46.6% (Gómez, 1983).

A partir del ciclo P/V 1992, la población fundación de plantas gemelas se dividió en dos en función del porte de las plantas, una fue denominada “población enana de plantas gemelas” (PEPG) y la otra como “población normal de plantas gemelas” (PNPG). Dos ciclos de selección recurrente de medios hermanos, las poblaciones fueron denominadas como BAP (Braquítica de Alta Poliembrionía) Y NAP (Porte Normal de Alta Poliembrionía), y para 1996 estas dos poblaciones presentaron una frecuencia promedio de poliembrionía de 62 % (Espinoza *et al.*, 1998).

Con el propósito de valorar la naturaleza genética de la poliembrionía, en 1996 se inició un proceso de selección reversa en las poblaciones BAP y NAP, seleccionando en contra de la poliembrionía (PEm) y generando dos subpoblaciones con poliembrionía reducida (BBP, enana, derivada de BAP, Y NBP, altas, derivada de NAP). Tres ciclos de selección reversa fueron suficientes para reducir la frecuencia de PEm a valores igual o menor a 6% (Espinoza y Vega, 2003). Esta rápida pérdida en la proporción o frecuencia de un carácter seleccionado en contra, es común en casos de selección divergente o bidireccional (Falconer y Makey, 1996).

La PEm estudiada en el IMM-UAAN fue valorada como de herencia cuantitativa, con una heredabilidad de 68 %, calculada por el método regresión progenie-progenitor medio (Castro, 1979). Sin embargo, a lo largo de los ciclos de selección a favor de la condición gemelar (1973-1995), la frecuencia pareció alcanzar un valor constante en el promedio máximo de 46 % (Gómez, 1983; Espinoza *et al.*, 1998). Ante esta situación, se propuso una nueva hipótesis sobre la condición genética que controla a esta PEm, refiriéndose de manera específica a la acción de dos loci epistáticos de recesividad duplicada (Espinoza *et al.*, 2008). Además de la meseta encontrada en la frecuencia de PEm en BAP y NAP, otro de los argumentos para replantear el control genético de PEm fue la observación sobre el hecho de que en líneas S₁ derivadas de la población NAP no se provoca un incremento en la poliembrionía, además de la manifestación de los indicios de un efecto recíproco en la frecuencia de poliembrionía e indica

que este fenómeno se puede aprovechar combinando familias que lo exhiban, sugiriendo un posible efecto materno por estudiar (Musito *et al.*, 2008).

En un estudio histológico realizado con las dos poblaciones BAP y NAP cruzadas con la población Tuxpeño-HOC, presentó una frecuencia de poliembrionía y radículas múltiples del 60 y 14% respectivamente, además de evidenciar como carácter recesivo A la PEm en híbridos F1 con Tuxpeño, informando también la presencia de tres diferentes versiones de radículas múltiples individualizadas o con un cierto grado de fusión pertenecientes a genotipos poliembriónicos (Espinoza *et al.*, 2012).

La hipótesis de dos loci epistáticos como los agentes que controlan a la PEm fue probada a través de progenies F₁, F₂ y RC₁ hacia los progenitores recesivos, derivadas de cruzamientos entre BAP y/o NAP con una serie de materiales híbridos comerciales, completamente ajenos a las dos poblaciones poliembriónicas. Los resultados experimentales fueron respaldo suficiente para establecer que esta PEm está controlada por dos loci epistáticos del tipo recesividad duplicada, segregando en F₂ la proporción de 15: 1 (plantas individuales: plantas poliembriónicas). Además, la PEm concita la manifestación del fenómeno de penetrancia incompleta en grado variable, en función de la naturaleza del material exótico con quien se crucen BAP O NAP (Rebolloza *et al.*, 2011).

En un estudio sobre propiedades químicas, físicas y reológicas de la harina de maíz nixtamalizado, masa y tortillas de grano de maíz con altos niveles de poliembrionía fueron evaluadas. Los resultados indicaron que el contenido de proteína de harina de maíz nixtamalizado de la población BAP fue mayor que los controles, teniendo como una buena opción para la industria de la harina y tortilla (Cruz-Requena *et al.*, 2014).

Con respecto a estudios moleculares Valdés-Monsivais *et al.*, (2012) realizó un estudio donde se identificaron veintinueve loci tentativos asociados a la expresión genética de la poliembrionía en maíz mediante AFLP's (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados). Además, se encontró una alta similitud al comparar secuencias de ADN de la región hipervariable ITS (Internal Transcribed Spacer) en familias endogámicas nivel S₁ de la población BAP, donde una planta individual y una de las plantas poliembriónicas presentaron alta similitud sugiriéndose una probable relación entre la poliembrionía y apomixis (Avendaño, 2012), y derivado de este último trabajo, se generó el interés de indagar más a fondo las características de este fenómeno a nivel molecular.

Apomixis

El proceso de formación de semilla que por un reemplazo de la reproducción sexual altera las funciones reproductivas de la fusión de los gametos en las plantas convirtiéndolo a reproducción asexual, la cual puede resultar de varios tipos, se le ha denominado apomixis. Estos tipos se pueden

describir de tres maneras, como sigue: vegetativa, partenogénesis y poliembrionía. Los casos de apomixis y poliembrionía están generalmente asociados (Mogie, 1992; Chaudhury *et al.*, 2001; Koltunow y Grossniklaus, 2003).

La apomixis puede ser descrita en referencia a la reproducción sexual, donde comúnmente dos células espermáticas entran al saco embrionario y uno se fusiona con la célula huevo y el otro con los núcleos polares para producir el embrión y el endospermo, respectivamente. El embrión y el endospermo comparten diferente relación del contenido genético maternal y paternal. Esta condición puede ser modificada por la apomixis, produciendo una estructura gametofítica femenina funcional que se opone a la recombinación de genes asociados con la meiosis. En algunos casos de apomixis, el endospermo se desarrolla en forma autónoma mientras que en otros la fertilización de los núcleos polares puede ser necesaria para producir un endospermo funcional (Chaudhury *et al.*, 2001).

En general, la apomixis se puede dividir en dos tipos: apomixis gametofítica y apomixis esporfítica. La primera ocurre mayormente en especies poliploides y es caracterizada por evitar la reducción cromosómica (apomeiosis). Aquí la meiosis es alterada o totalmente desviada, y como una consecuencia se forma un gametofito femenino o un saco embrionario no reducido, el cual se desarrolla autónomamente por partenogénesis, dando origen a una planta igual a la planta materna manteniendo el mismo juego de

cromosomas maternas. Este tipo de apomixis puede ser obligada (exclusivamente por apomixis) o facultativa (plantas que se producen por medio apomítico y sexual), y se divide en dos categorías diplosporía y aposporía. En la apomixis diplosporía la célula madre megaspora evita por completo el proceso de meiosis, pero a través de la mitosis forma un saco embrionario con todas las células no reducidas, incluyendo el óvulo. Mientras que en la apomixis aposporía algunas células nucelares entran a la mitosis directamente y se forman sacos embrionarios no reducidos, el proceso apospórico es iniciado después de la diferenciación y formación de célula madre megaspora, la megaspora degenera y el saco embrionario aposporico ocupa la posición del ovulo, en este caso se requiere la fertilización para el desarrollo del endospermo. Este mecanismo es común en plantas superiores, en particular la familia Poaceae o gramíneas (Koltunow y Grossniklaus, 2003; Lone y Lone, 2013). En la mayoría de las especies que presentan este tipo de reproducción, la apomixis parece ser de herencia simple basada en la segregación entre cruzamiento con el progenitor masculino apospórico y un progenitor femenino estrictamente sexual (Jessup *et al.*, 2003; Porceddu *et al.*, 2002; Pupilli *et al.*, 2004).

La apomixis esporofítica (conocida como embrionía adventicia) se caracteriza por que los embriones son formados directamente de células no reducidas de la nucela o del integumento, y la vía de desarrollo de saco embrionario meiótico se mantiene formando la poliembrionía (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984). Esto generalmente se inicia después del desarrollo del

óvulo maduro. Este tipo de apomixis ha sido reportada para de herencia simple, dominante (Iwamasa *et al.*, 1967; Parlevilet y Cameron, 1959).

La apomixis tiene una gran importancia en la agricultura primeramente por su potencial para facilitar la multiplicación de semilla híbrida F1 debido a que proporciona las ventajas de rendimiento y vigor híbrido las cuales pudieran ser fijadas permitiendo la multiplicación indefinida del híbrido con calidad uniforme y sin disminución de la producción (Chaudhury *et al.*, 2001). Otra ventaja que presenta el fenómeno es la alta proporción de loci fijos en condiciones de heterocigotos en comparación con la reproducción sexual (Paun, *et al.*, 2006; Lo *et al.*, 2009).

El control de la apomixis permitiría el uso de una mayor variedad de plantas madre en el mejoramiento para hábitats agrícolas especializados. El uso actual de los híbridos en el mundo tales como el maíz y el arroz se basa en una muy restringida y pequeña base de líneas parentales puras, las cuales no funcionan bien en todas las condiciones. El uso de la apomixis en cruza entre dos candidatos de líneas parentales generaría progenie con un genotipo híbrido fijado. De esta manera, la apomixis podría eliminar la dependencia de las líneas puras actuales y permitirá ampliar la base genética agrícola actual (Chaudhury *et al.*, 2001). Además, se pueden implementar para especies sin mecanismos de control de la fertilidad (ejemplo el sistema de esterilidad masculina) (Acquaah, 2007). Por otro lado, obstaculiza la posibilidad de adquirir variabilidad

y aumenta la carga de mutaciones naturales, conduciendo a la desaparición de clones por consecuencia de la no adaptabilidad (van Dijk, 2004).

La apomixis es una característica controlada genéticamente (Nogler, 1984). Ha sido ampliamente estudiada y sigue siendo poco entendida y sólo dos proposiciones han sido ampliamente aceptadas. La mayoría de los autores están de acuerdo con una simple herencia monogénica en la apomixis apospórica basado en los análisis de segregación como un factor dominante sobre la sexualidad (Savidan, 1982; Nogler, 1984), donde la formación de sacos embrionarios no reducidos (apomícticos) segregaron como un solo alelo dominante. En cuanto al control genético de diplosporia, en *Tripsacum* (Leblanc *et al.*, 1995) se sugiere que es de herencia mendeliana. En segundo lugar, también es ampliamente aceptado que las especies apomícticas son de origen alopoliploide, formado mediante la hibridación entre dos parientes diploides (Gustafsson, 1946; Asker y Jerling, 1992).

Los estudios sobre la herencia de apomixis han sido complicados por el hecho de que, debido a la característica central del fenómeno no se pueden cruzar con plantas sexuales utilizando una hembra apomíctica. Sin embargo, en la mayoría de las especies apomícticas se produce polen viable y por lo tanto pueden ser utilizados como donantes de polen en cruces con hembras sexuales (van Dijk, 2004).

Técnicas moleculares

La correlación de los fenotipos con los marcadores moleculares proporciona puntos de referencia para el esclarecimiento de la variación genética en plantas (Agrawal y Shrivastava, 2014). Existen diversos marcadores moleculares (MM) que se utilizan para análisis molecular, los cuales permiten determinar estructura, dinámica, relación y variabilidad genética de una población. Sirven también para estimar el grado de divergencia entre los individuos. Los MM más útiles para estudio han sido los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), como lo son las regiones hipervariables IGS o espacio intergénico, e ITS o espacio transcrito interno, la amplificación de secuencias cortas repetidas (SSR) y la obtención al azar del ADN polimórfico (ISSR), entre otros (González *et al.*, 2002; Rodríguez-Tovar *et al.*, 2004; Kirst *et al.*, 2005).

Los espacios intergénicos ITS e IGS (Figura 2.1) han sido ampliamente utilizado principalmente como herencia biparental (Álvarez y Wendel, 2003). Estas regiones son secuencias divergentes muy variables, polimórficas en longitud y en secuencia, debido a deleciones e inserciones, son muy informativas y representan una huella genómica (Gardes *et al.*, 1991; Martín *et al.*, 1998; Gardes y Bruns, 1993; Henrion *et al.*, 1994). Los IGS e ITS, son los más adecuados para la comparación de las especies y géneros estrechamente relacionados (Soltis y Soltis, 1998).

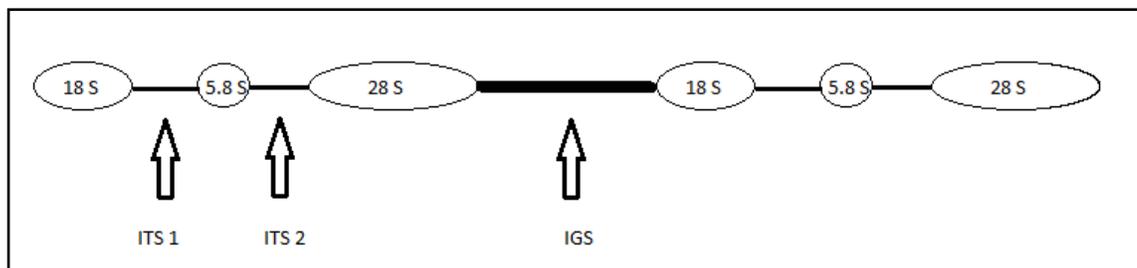


Figura 2.1 Organización de la estructura en tándem repetida del ADN ribosomal.

Los genes que codifican para los ARN ribosomal se componen de unidades repetidas en tándem de ADN ribosomal que codifica para 18S, 5.8S y 26S, además de espacios intergénicos. Estos genes se producen universalmente en todos los organismos, son muy variantes tanto en número de copias y en la longitud de los espacios intergénicos. Las regiones codificantes constituyen secuencias muy conservadas y poseen una tasa baja de divergencia, mientras que en los espacios intergénicos la variabilidad no solo existe entre especies alejadas, sino también entre los miembros de un mismo género y entre los miembros de la misma población de una sola especie. Un análisis de herencia indica que el cambio del número de copias es rápido, ocurriendo incluso entre células somáticas de la misma planta, y que hasta el 90 % o más de las copias del gen son redundantes (Zhou *et al.*, 1996; Rogers y Bendich, 1987; Sharma *et al.*, 2002). Estos espacios han sido ampliamente utilizados para determinar tanto similitud como divergencia en cultivos de arroz (Zhou *et al.*, 1996), trigo (Carvalho *et al.*, 2011), frijol (Nepolo *et al.*, 2010), y en el género *Zea*, donde se incluye al maíz (Buckler y Holtsford, 1996).

Por otra parte, los SSR's (Simple Sequence Repeats) o microsatélites son regiones de secuencias repetidas de ADN, generalmente de dos a tres nucleótidos, los cuales puede o no estar asociados a genes. Estos tienen muchas aplicaciones en estudios genéticos de plantas, incluyendo huellas genéticas de los cultivos y en estudios de diversidad genética, proporcionan información para una mejor toma de decisiones en la selección de germoplasma.

Las características destacadas de los SSR'S es que son repetibles, de herencia codominante, distribuidos en todo el genoma, son altamente polimórficos ya que son de grado altamente mutable, y la técnica es sencilla de utilizar. El polimorfismo es detectado mediante la utilización de la PCR, cuando las secuencias flanqueantes son conocidas generalmente entre 20-25 pares de bases, y su amplicón se compone de tándems cortos repetidos en una longitud de 1 a 6 pares de bases, el cual puede variar en longitud del elemento repetitivo. El uso de los SSR's permite identificar múltiples alelos en un solo locus (Gürcan, *et al.*, 2008; Agrawal y Shrivastava, 2014). Estos marcadores moleculares se han utilizado en cítricos para la determinación del origen sexual de las plantas y determinar las diferencias genéticas entre plantas poliembriónicas y no poliembriónicas (Ruíz *et al.*, 2000).

Los ISSR's (Inter Simple Sequence Repeats) es una técnica que incluye el uso de secuencias de microsatélites como iniciadores basado en la técnica de PCR, de unidades repetidas de di, tri, tetra o penta nucleótidos que se

encuentran universalmente en a los genomas eucariotas, para generar marcadores multi-locus. Este es un método que combina la mayor parte de las ventajas de los microsatélites (SSR) y amplifica polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y la universalidad de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) (Reddy *et al.*, 2002; Agrawal r y Shrivastava, 2014).

Estos marcadores moleculares han demostrado ser simples, rápidos, reproducibles, informativo y baratos en el estudio de variabilidad genética, son utilizados por su gran capacidad de detectar diferencias entre individuos que podrían estar cercanamente relacionados (Ferreira y Gattapaglia, 1998; González *et al.*, 2002), además son ampliamente usados en aplicaciones de taxonomía molecular, evolución, conservación, mejoramiento genético y análisis de diversidad genética (Kumar *et al.*, 2009; Agrawal y Shrivastava, 2014). Son dominantes y proveen alta variabilidad y una alta densidad de mapeo (Nagaoka y Ogiwara, 1997), y tienen la ventaja de que no interacción con el medio ambiente y pueden identificar altos niveles de polimorfismo (Williams *et al.*, 1990). Los marcadores de naturaleza dominante son utilizados con frecuencia para determinar que dos individuos no son iguales, pero la afirmación de que dos individuos son idénticos solo es una aproximación (Kisrt *et al.*, 2005).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo ha sido ordenado en función de los tres objetivos propuestos, y cada uno de ellos contiene diversas actividades de campo, invernadero y laboratorio. Los trabajos de campo fueron realizados en la estación experimental Buenavista, Saltillo, y los trabajos de invernadero se realizaron en el invernadero N° 3, ambas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, localidad Buenavista, Saltillo, Coahuila, México (coordenadas: 25° 21' de latitud Norte; 101° 02' de Longitud Oeste, y 1756 m de altitud, CETENAL, 1975). Los trabajos de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular a cargo del Dr. Raúl Rodríguez Herrera, en el Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México.

Objetivo (1) Identificación de secuencias polimórficas y monomórficas de regiones hiper-variables

Material Genético

Para identificar secuencias polimórficas y monomórficas de regiones hiper-variables ITS e IGS del ADN de maíz poliembriónico, se utilizaron los

siguientes genotipos: 5 familias de líneas endogámicas S₁ y 5 familias de polinización libre (PL's), provenientes de una población de maíz que presenta una alta frecuencia (promedio = 62 %) del carácter poliembrionía, denominada en breve como BAP, "Braquítica-de Alta Poliembrionía" (Cuadro 3.1). Las familias mencionadas fueron generadas en el ciclo P-V/2010, en Buenavista, Saltillo.

Cuadro 3.1. Genotipos utilizados para identificar las secuencias polimórficas y monomórficas.

Familias S₁	Familias PL's
1. BAP-UA-2010 S ₁ -03	6. BAP-UA-2010 PL-01
2. BAP-UA-2010 S ₁ -05	7. BAP-UA-2010 PL-02
3. BAP-UA-2010 S ₁ -07	8. BAP-UA-2010 PL-06
4. BAP-UA-2010 S ₁ -14	9. BAP-UA-2010 PL-12
5. BAP-UA-2010 S ₁ -16	10. BAP-UA-2010 PL-13

Además de estos genotipos, se utilizó también ADN de la familias DS₁-03* y DS₁-07* correspondiente a las familias 1 y 3 (Cuadro 3.1), el cual fue previamente analizado por Avendaño (2012) y que en este trabajo se volverá a analizar con fines de validación de resultados anteriores y actuales en cuanto secuenciación de la región ITS.

Siembra en invernadero

Las familias de maíz se establecieron bajo condiciones de invernadero, en un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones. Los genotipos utilizados en este trabajo se colocaron en macetas de plástico sólido,

en un sustrato con base en una mezcla de tierra de bosque de pino y peat-moss en proporción 2:1 v/v, disponiéndose dos semillas por macetas, y cada repetición fue representada por 12 semillas. En los genotipos se evaluó la germinación (GER), proporciones de poliembrionía (PEm) y anormalidades (AN) en estado de plántulas de 14 a 17 días de edad.

Selección de plántulas

El material genético seleccionado fueron plantas con expresión fenotípica individual, y “plantas” de manifestación doble o más, con las partes estructurales separadas de la radícula y mesocotilo, unidas por nudo escutelar. Sólo se seleccionaron aquellas familias que mostraron la estructura mencionada (Figura 1).

Toma de la muestra

Se tomó tejido foliar de las progenies de manera aséptica, realizando pequeños cortes entre 5-8 mm, colocados en papel aluminio y conservándolos en un recipiente hermético (hielera) con temperatura aproximada de 4°C, para posteriormente ser almacenadas bajo congelación a -50° C, por el tiempo necesario hasta que se realizó en ellas la extracción de ADN.

Extracción del ADN

Entre los métodos de extracción se encuentran los basados en bromuro de hexa-decil-trimetil-amonio (CTAB), el cual se adhiere fuertemente al ADN, desplaza las proteínas y previene la degradación (Doyle y Doyle, 1987). Fue utilizado el método reportado por estos autores, con algunas modificaciones. El procedimiento general fue como sigue: cada muestra de aproximadamente 0.1 g de tejido foliar fue desecada por inmersión en nitrógeno líquido, se pulverizó en un mortero previamente esterilizado y congelado a -20°C , se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetado, se agregó 800 μL de la solución de lisis compuesta por CTAB 1X [NaCl 5 M, EDTA 0.5 M (pH 8), Tris 1 M (pH 8)] y 2-mercaptoetanol 0.5% adicionado inmediatamente antes de su uso y precalentado a 60°C . Se mezcló e incubó a 60°C durante un lapso de 30-60 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó aproximadamente 600 μL del líquido sobrenadante transfiriéndose a un nuevo tubo de 1.5 mL al que se le agregaron un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 V/V), mezclándose por inversiones suaves sucesivas durante 1 minuto para precipitar las proteínas, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos. Nuevamente se recuperó el sobrenadante transfiriéndose a un tubo nuevo, agregándosele 800 μL de etanol al 99% y se mezcló por inversiones sucesivas, dejándose reposar durante 30-60 minutos a -20°C , esto con la finalidad de precipitar el ADN. Se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos, se desechó el sobrenadante, se lavó tres veces con etanol al 70% y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos. Se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se le agregó 50 μL de TE 1X más 10 μL de RNasa

(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dejándose a una temperatura de 55°C durante 30 minutos. Finalmente se almacenó a -20°C .

Evaluación del ADN extraído

La cuantificación de la concentración y calidad del ADN se midió en un equipo EpochTM Sistema Espectrofotómetro Micro-Volúmenes, bajo una relación de longitudes de onda de 260 nm y 280 nm, colocando tan solo 2 μL de muestra de ADN.

Electroforesis del ADN extraído

Para la visualización del ADN extraído se utilizó la técnica de electroforesis, usando un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En un vaso de precipitado de 125 mL se disolvieron 0.5 g de agarosa en un volumen de 50 mL de buffer SB (borato de sodio) se calentó en microondas hasta disolverse por completo. Posteriormente se dejó enfriar y antes de gelificar se adicionó 4 μL de bromuro de etidio, después se vació en la base de la cámara electroforética hasta enfriarse (aproximadamente 25 minutos) y una vez logrado esto se cargó la mezcla de 2 μL ADN de la muestra y 3 μL de buffer de carga azul de bromofenol y posteriormente se colocó en la cámara sumergiéndose en buffer SB. Para correr el gel se utilizaron los siguientes parámetros: 90 volts durante 30 minutos de corriente alterna. Finalmente las bandas se visualizaron a través de un transiluminador de luz ultravioleta.

Amplificación las regiones hipervariables

La región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADN ribosomal 18S-26S fue amplificada utilizando los iniciadores N18L-F (5'-AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3') e C26A-R (5'-TTTCTTTTCCTCCGCT-3') (Eldenäs *et al.*, 1998), el ADN utilizado se llevó a una concentración final de 100 ng/μL.

Por otra parte, la región del espaciador intergénico (IGS) del ADN ribosomal fue amplificada con los iniciadores IGS-F (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3') e IGS-R (5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3') (Kim *et al.*, 2001).

La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 25 μL, compuesta por ddH₂O, buffer 10X adicionado con MgCl₂, mezcla de dNTP's, iniciadores, PaqDNA polimerasa (5U/μL) y ADN, según los cuadros 3.2 y 3.3 respectivamente. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Px2 Thermal cycler utilizando el siguiente perfil térmico: temperatura inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos compuestos por desnaturalización 1 minuto 94°C, alineación 1 minuto a 50.3°C para (ITS) y 51.3°C para (IGS) y una extensión 1 minutos a 72°C. Finalmente un pasó de extensión 5 minutos a 72°C. Los productos amplificados fueron visualizados a través de un gel de agarosa al 1% junto con el marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder INVITROGEN®.

Cuadro 3.2. Composición de la reacción para la región ITS.

Reactivo	Concentración final	Volumen final (25µL)
ddH ₂ O		14.5
Buffer 10X	1X	3.5
dNTP's	0.2 mM	0.5
N18L	0.8 µM	2.0
C26A	0.8 µM	2.0
PaqDNA	0.1U/ µL	0.5
ADN		2.0

Cuadro 3.3. Composición de la reacción para la región IGS.

Reactivo	Concentración final	Volumen final (25 µL)
ddH ₂ O		17
Buffer 10X	0.4X	1
dNTP's	0.2 mM	0.5
IGS-F	0.8 µM	2
IGS-R	0.8 µM	2
PaqDNA	0.1U/ µL	0.5
ADN		2

Secuenciación

Una vez amplificado el ADN obtenidos de la PCR con los iniciadores ITS e IGS, se mandó a secuenciar en un solo sentido 5' – 3', los productos amplificados fueron secuenciados en un equipo Perkin Elmer de Applied Biosystems Modelo 3730 por el método de Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing.

Edición de secuencias y alineamiento

Las secuencias generadas de los productos amplificados fueron importadas al programa Bioedit versión 7.1.3, la edición de secuencias se realizó con correcciones manuales, donde se revisó base por base y se recortaron los extremos para eliminar fragmentos. Los alineamientos se realizaron comparando las secuencias de los diferentes genotipos como se muestra en el Cuadro 3.4, con la finalidad de encontrar sitios homólogos. Para el análisis de polimorfismo se utilizó el programa DnaSP (DNA Sequence Polymorphism versión 5.10.01) (Librado y Rozas, 2009).

Cuadro 3.4. Comparaciones de las secuencias de los integrantes de las familias.

Familia
Madre (M) vs Planta individual (PI)
Madre (M) vs Planta PEm 1 de 2 (PE12)
Madre (M) vs Planta PEm 2 de 2 (PE22)
Planta individual hermana (PI) vs Planta PEm 1 de 2 (PE12)
Planta individual hermana (PI) vs Planta PEm 2 de 2 (PE22)
Planta PEm 1 de 2 (PE12) vs Planta PEm 2 de 2 (PE22)

Análisis molecular de las regiones hipervariables ITS e IGS

Las secuencias editadas incluyeron diversas longitudes en pares de bases, correspondientes a las regiones en estudio, determinándose el número de sitios totales, porcentaje de sitios invariables, de sitios polimórficos, de diversidad nucleotídica y de contenido de G+C.

Análisis estadístico de la prueba de X^2 de bondad de ajuste

Para corroborar la frecuencia de plantas poliembriónicas bajo la hipótesis de que la clase PEm aparece en una proporción 6: 10 (individuales:poliembriónicas), con las reservas que implica el fenómeno de penetrancia incompleta, se aplicó una prueba de X^2 de bondad de ajuste; la proporción sugerida obedece a la frecuencia reportada por [Rebolloza *et al.*, 2011; (Espinoza *et al.*, 2012; Espinoza *et al.*, 1998)], donde se espera una frecuencia de PEm entre 55-65%. Debido a la naturaleza de alta frecuencia en estas poblaciones, la hipótesis se basó en valores superiores al de la referencia.

Objetivo (2) Determinación de homocigosis o heterocigosis

Material Genético

Los genotipos utilizados para determinar homocigosis y/o heterocigosis a nivel ADN en plantas poliembriónicas, se utilizaron aquellas familias de los genotipos de maíz que en alguna de las comparaciones presentaron en el análisis de polimorfismo un 99 y 100% de sitios invariables de las regiones ITS ó IGS, agregando dos de las familias S_1 seleccionadas en el trabajo realizado por Avendaño (2012), esto es con la finalidad de realizar la validación de la concordancia de los resultados obtenidos, y como material de referencia a la línea de alta endogamia denominada AN-Tep.3 y la población Tuxpeño HOC.

Cada familia está constituida por planta madre, una planta individual, y dos plantas poliembriónicas como se muestra en el Cuadro 3.5.

Cuadro 3.5. Genotipos utilizados para la determinación de homocigosis o heterocigosis mediante SSR.

Tipo de planta	DS ₁ -03	DPL-13	DS ₁ -03*	DS ₁ -07*
Madre (M)	DS ₁ -03	DPL-13	DS ₁ -03	DS ₁ -07
Individual (PI)	DS ₁ -03 PI	DPL-13 PI	DS ₁ -03 PI*	DS ₁ -07 PI*
Planta PEm 1 (PE1)	DS ₁ -03 P21	DPL-13 P21	DS ₁ -03 P21*	DS ₁ -07 P21*
Planta PEm 2 (PE2)	DS ₁ -03 P22	DPL-13 P22	DS ₁ -03 P22*	DS ₁ -07 P22*

Amplificación de SSR's

En el análisis SSR se utilizaron diez loci microsatélites de maíz, uno de cada cromosoma, de la base de datos MaizeDB (<http://www.maizegdb.org/>) consultada en septiembre del 2013, seleccionados en base a la ubicación cromosómica, consistiendo un iniciador de cada cromosoma (Cuadro 3.6).

Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 15 µL, compuesta por ddH₂O, 1.5 a 3X de buffer 10X adicionado con MgCl₂, 0.25 mM de la mezcla de dNTP's, 0.66 a 2 µM de cada iniciador, 6.6% de DMSO, 0.1 U de PaqDNA polimerasa (5U/ µL) y ADN, según la tabla para cada microsatélite (Cuadro 3.7). Las condiciones de amplificación fueron descritas por (Warburton *et al.*, 2002) consistieron en una temperatura inicial de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, 30 ciclos compuestos por desnaturalización 30 segundos 94°C, alineación

1 minuto y una extensión 1 minuto a 72°C. Finalmente un paso de extensión 5 minutos a 72°C, las temperaturas de alineamiento fueron determinadas para las condiciones para del termociclador Px2 Thermal cycle las cuales se muestran en la tabla (Cuadro 3.7). Los productos amplificados fueron visualizados a través de un gel de agarosa al 3% junto con el marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder INVITROGEN®.

Cuadro 3.6. Lista de los diez marcadores de secuencias simples repetidas (SSR) con su posición genómica, temperatura de alineamiento y secuencia.

Nombre del iniciador	Posición genómica	Temp. Alineam.(°C)	Secuencia
phi064 f	1.11	56.0	CCGAATTGAAATAGCTGCGAGAACCT
phi064 r			ACAATGAACGGTGGTTATCAACACGC
phi96100 f	2.0	50.0	AGGAGGACCCCAACTCCTG
phi96100 r			TTGCACGAGCCATCGTAT
phi053 f	3.05	60.0	CTGCCTCTCAGATTCAGAGATTGAC
phi053 r			AACCCAACGTA CTCCGGCAG
phi072 f	4.01	56.0	ACCGTGCATGATTAATTTCTCCAGCCTT
phi072 r			GACAGCGCGCAAATGGATTGAACT
zct118 f	5.07	56.0	CTTCCAGCCGCAACCCTC
zct118 r			CCAACAACGCGGACGTGA
phi452693 f	6.06	52.4	CAAGTGCTCCGAGATCTTCCA
phi452693 r			CGCGAACATATTCAGAAGTTTG
phi328175 f	7.04	60.0	GGGAAGTGCTCCTTG CAG
phi328175 r			CGGTAGGTGAACGCGGTA
phi420701 f	8.01	60.0	ATGTTTCAA AACCCAG A
phi420701 r			ATGGCACGAATAGCAACAGG
phi032 f	9.04	56.0	CTCCAGCAAGTGATGCGTGAC
phi032 r			GACACCCGGATCAATGATGGAAC
umc1152 f	10.01	60.0	CCGAAGATAACCAAACAATAATAGTAGG
umc1152 r			ACTGTACGCCTCCCCTTCTC

Cuadro 3.7. Composición de la concentración final de la reacción para SSR.

Reactivo	phi064	phi96100	phi053	phi072
ddH2O				
Buffer 10X	1.5X	2.25X	2.25X	3X
dNTP's	0.25 mM	0.25 mM	0.25 mM	0.25 mM
Iniciador F	1.33 μ M	1.33 μ M	1.33 μ M	1.33 μ M
Iniciador R	1.33 μ M	1.33 μ M	1.33 μ M	1.33 μ M
DMSO	6.6%	6.6%	6.6%	6.6%
PaqDNA	0.1U/ μ L	0.1U/ μ L	0.1U/ μ L	0.1U/ μ L
Reactivo	zct1182	phi452693	phi328175	phi420701
ddH2O				
Buffer 10X	1.5X	2.25X	2.25X	2.25X
dNTP's	0.25 mM	0.25 mM	0.25 mM	0.25 mM
Iniciador F	1.33 μ M	1.33 μ M	1.33 μ M	1.33 μ M
Iniciador R	1.33 μ M	1.33 μ M	1.33 μ M	1.33 μ M
DMSO	6.6%	6.6%	6.6%	6.6%
PaqDNA	0.1U/ μ L	0.1U/ μ L	0.1U/ μ L	0.1U/ μ L
Reactivo	phi032	umc1152		
ddH2O				
Buffer 10X	2.25X	2.25X		
dNTP's	0.25 mM	0.25 mM		
Iniciador F	0.66 μ M	1.33 μ M		
Iniciador R	0.66 μ M	1.33 μ M		
DMSO	6.6%	6.6%		
PaqDNA	0.1U/ μ L	0.1U/ μ L		

Análisis estadísticos de datos moleculares SSR's

Para la determinación del genotipo homocigótico o heterocigótico asociado a las plantas poliembriónicas, a partir de la amplificación de los SSR se generó un código binario, codificado como ausencia y presencia (0 y 1 respectivamente). De esta manera, se compararon patrones de similitud entre la planta madre y cada plántula hija individual y poliembriónica.

Utilizando el software INFOGEN se determinaron algunos estimadores de la variabilidad genética como lo son: loci polimórficos, diversidad genética, heterocigosis insesgada de Nei, número promedio de alelos y número de alelos efectivos. La matriz de ceros y unos también se usó para calcular el análisis de varianza molecular (AMOVA). Además, se construyó un análisis de coordenadas principales (ACoP) y un dendrograma con el fin de agrupar los genotipos estudiados.

Objetivo (3) Determinación de polimorfismo en la expresión de la poliembrionía debido al efecto del polen

Material genético y manejo reproductivo

Para determinar el polimorfismo se utilizó como progenitores a dos familias de cada una de las poblaciones BAP y NAP (Braquítica y Normal, de alta poliembrionía, respectivamente), y los materiales ajenos a estas poblaciones, la línea de alta endogamia denominada AN-Tep.3 y la población Tuxpeño HOC (Cuadro 3.8). Los objetos de estudio fueron una serie de progenies derivadas de varios tipos de cruzamiento dentro y entre estos genotipos.

Cuadro 3.8 Genotipos de maíz poliembriónicos y exóticos.

Genotipo	Id
NAP FMHS 247-9-1-5	C ₁
NAP FMHS 316-112-1-1-4	C ₂
BAP FMHS 55-1-2-1	D ₁
BAP FMHS 108-2-2-1	D ₂
Tuxpeño HOC	Tuxp. HOC
AN-Tepalcingo.3	AN-Tep.3

FMHS: familia de medios hermanos. C = población NAP, D = población BAP.

Los cruzamientos se realizaron en el ciclo P/V 2013, e incluyeron cruzas directas y recíprocas (Cuadro 3.9). Para esto se tomó como población de referencia a las familias pertenecientes de la población BAP; dentro de la familia se tomaron como hembras a las plantas con expresión fenotípica doble (PE), y a las que germinaron como plantas individuales (No-PE) de la población BAP, a plantas poliembriónicas (dobles) No-relacionadas (NoRE) de la población NAP ya sea cualquiera de las dos familias participantes (PE, NoRE) y No-poliembriónicas No-relacionadas de naturaleza PEm de la población NAP (No-PE, NoRE). Como fuentes de polen (progenitor masculino) se utilizaron los siguientes materiales (1) plantas poliembriónicas genéticamente relacionadas (PE, RE) y plantas No-poliembriónicas relacionadas (No-PE, RE), pertenecientes a la población de referencia BAP, (2) plantas poliembriónicas No-relacionadas (PE, NoRE) y plantas No-poliembriónicas No-relacionadas de naturaleza PE (NoPE, NoRE) ambas de la población NAP, y (3) plantas No-poliembriónicas, No-relacionadas, ajenas a la PE, una perteneciente a una línea endogámica AN-Tep.3, y la otra a una población Tuxpeño HOC (catalogadas como NoPE NoRE).

Cuadro 3.9. Esquema de cruzamiento de diferentes genotipos de forma directa y recíproca para la población de referencia BAP.

Progenitores	♂PE, RE	♂PE, NoRE	♂No-PE, RE	♂No-PE, No RE
♀ PE, RE	PE,RE x PE,RE	PE,RE x PE,NoRE	PE,RE x No-PE,RE	PE,RE x No-PE,No RE
♀ PE, NoRE	PE,NoRE x PE,RE	PE,NoRE x PE,NoRE	PE,NoRE x NoPE,RE	PE,NoRE x No-PE,NoRE
♀ No-PE, RE	No-PE,RE x PE,RE	No-PE,RE x PE,NoRE	No-PE,RE x No-PE,RE	No-PE,RE x No-PE,NoRE
♀ No-PE, NoRE	No-PE,NoRE x PE,RE	No-PE NoRE x PE,NoRE	No-PE,NoRE x No-PE,RE	No-PE,NoRE x No-PE,NoRE

Siembra en invernadero

Las cruzas generadas a partir del plan de cruzamiento anterior (Cuadro 3.9), generaron las progenies señaladas en el cuadro 3.10. Éstas fueron sembradas bajo condiciones de invernadero, en un diseño experimental completamente al azar, con dos repeticiones. La siembra de los genotipos se llevó a cabo en charolas de germinación de polipropileno, de 200 cavidades, dimensiones de 67 x 34 x 7 cm, en un sustrato basado en una mezcla de suelo de bosque-peat moss en proporción 2:1, como el que fue mencionado en la sección anterior. Cada repetición fue representada por 40 semillas, disponiéndose una semilla por cavidad, sin embargo, debido a insuficiente material genético remanente de las progenies que corresponden a las progenies catalogadas como 14, 25, 39 y 42, cada repetición fue de 20 semillas. En los genotipos se evaluó la germinación (GER), proporciones de

poliembriónía (PEm) y anomalías (AN) en estado de plántulas de 14 a 17 días de edad.

Cuadro 3.10 Cruzas de maíz entre los genotipos Exóticos x NAP o BAP.

Progenie	Cruza	Progenie	Cruza
1	C ₁ (PE) x Tuxp HOC	23	D ₁ (PE) x D (Ind)
2	C ₂ (PE) x Tuxp HOC	24	D ₁ (PE) x C (PE)
3	C ₁ (PE) x AN-Tep.3	25	D ₂ (PE) x C (PE)
4	C ₁ (PE) x D (PE)	26	D ₂ (PE) x C (Ind)
5	C ₁ (PE) x D (Ind)	27	D ₂ (Ind) x Tuxp HOC
6	C ₂ (PE) x D (Ind)	28	D ₁ (Ind) x AN-Tep.3
7	C ₁ (PE) x C (Ind)	29	D ₂ (Ind) x AN-Tep.3
8	C ₂ (PE) x C (Ind)	30	D ₁ (Ind) x D (PE)
9	C ₁ (Ind) x Tuxp HOC	31	D ₂ (Ind) x D (PE)
10	C ₂ (Ind) x Tuxp HOC	32	D ₁ (Ind) x D (Ind)
11	C ₁ (Ind) x AN-Tep.3	33	D ₁ (Ind) x C (PE)
12	C ₂ (Ind) x AN-Tep.3	34	D ₂ (Ind) x C (PE)
13	C ₁ (Ind) x D (PE)	35	D ₁ (Ind) x C (Ind)
14	C ₁ (Ind) x D (Ind)	36	Tuxp HOC x D (PE)
15	C ₂ (Ind) x D (Ind)	37	Tuxp HOC x D (Ind)
16	C ₁ (Ind) x C (PE)	38	Tuxp HOC x C (PE)
17	C ₂ (Ind) x C (PE)	39	Tuxp HOC x C (Ind)
18	D ₁ (PE) x Tuxp HOC	40	AN-Tep.3 x D (PE)
19	D ₂ (PE) x Tuxp HOC	41	AN-Tep.3 x D (Ind)
20	D ₂ (PE) x AN-Tep.3	42	AN-Tep.3 x C (PE)
21	D ₁ (PE) x D (PE)	43	AN-Tep.3 x C (Ind)
22	D ₂ (PE) x D (PE)		

Toma de las muestras foliares

De los genotipos detallados en el cuadro 3.11 se tomaron las muestras de tejido foliar siguiendo el mismo procedimiento que fue mencionado en la sección anterior.

Cuadro 3.11 Genotipos muestreados para determinar polimorfismo en la expresión de la poliembrionía debido al efecto del polen. Tejido foliar.

Progenie	Tipo de Cruza	Cruza
4	PE,NoRE x PE,RE	C ₁ (PE) x D (PE)
6	PE,NoRE x No-PE,RE	C ₂ (PE) x D (Ind)
13	No-PE,NoRE x PE,RE	C ₁ (Ind) x D (PE)
14	No-PE,NoRE x No-PE,RE	C ₁ (Ind) x D (Ind)
15	No-PE,NoRE x No-PE,RE	C ₂ (Ind) x D (Ind)
18	PE,RE x No-PE,NoRE	D ₁ (PE) x Tuxp HOC
19	PE,RE x No-PE,NoRE	D ₂ (PE) x Tuxp HOC
20	PE,RE x No-PE,NoRE	D ₂ (PE) x AN-Tep.3
21	PE,RE x PE,RE	D ₁ (PE) x D (PE)
23	PE,RE x No-PE,RE	D1 (PE) x D (Ind)
24	PE,RE x PE,NoRE	D1 (PE) x C (PE)
25	PE,RE x PE,NoRE	D2 (PE) x C (PE)
26	PE,RE x No-PE,NoRE	D2 (PE) x C (Ind)
27	No-PE ,REx No-PE,NoRE	D2 (Ind) x Tuxp HOC
28	No-PE,RE x No-PE,NoRE	D1 (Ind) x AN-Tep.3
31	No-PE,RE x PE,RE	D2 (Ind) x D (PE)
32	No-PE,RE x No-PE,RE	D1 (Ind) x D (Ind)
33	No-PE,RE x PE,NoRE	D1 (Ind) x C (PE)
34	No-PE,RE x PE,NoRE	D2 (Ind) x C (PE)
35	No-PE,RE x No-PE,NoRE	D1 (Ind) x C (Ind)
36	No-PE,NoRE x PE,RE	Tuxp HOC x D (PE)
37	No-PE,NoRE x No-PE,RE	Tuxp HOC x D (Ind)
41	No-PE,NoRE x No-PE,RE	AN-Tep.3 x D (Ind)

Amplificación de ISSR's por PCR

Para determinar el polimorfismo por la vía de ISSR's se utilizaron tres iniciadores, seleccionados a partir de doce iniciadores disponibles, en base a la presencia de un mayor número de bandas claras y definidas. La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 11.5 μL , compuesto de 3.0 μL de ddH₂O, 2.17X de buffer 10X adicionado con MgCl₂, 0.21 mM de la mezcla de dNTP's, 2.6 μM de cada iniciador, 8.7% de DMSO, 0.1 U de PaqDNA polimerasa (5U/ μL) y ADN (Cuadro 3.13). El perfil térmico se llevó a cabo en un termociclador Px2 Thermal cycle y consistió en una temperatura inicial de desnaturalización de 1 minuto a 94°C, 40 ciclos compuestos por desnaturalización 1 minuto 94°C, alineación 45 segundos y una extensión 2 minutos a 72°C. Finalmente, un pasó de extensión 7 minutos a 72°C, las temperaturas de alineamiento fueron determinadas, las cuales se muestran en el cuadro 3.12. Los productos amplificados fueron visualizados a través de un gel de agarosa al 1.5% junto con el marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder INVITROGEN®.

Cuadro 3.12 Temperatura y secuencia de los tres iniciadores ISSR 's.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de alineamiento (°C)
1	GAGAGAGAGAGAGATC	48.2
9	GTGTGTGTGTGTGTGTTT	48.0
11	TCTCTCTCTCTCTCC	54.1

Cuadro 3.13 Composición de la reacción para ISSR's, 11.5 μ L de reacción para los tres iniciadores.

Reactivo	Concentración final	Volumen final (μ L)
ddH ₂ O		3.00
Buffer 10X	2.17X	2.50
dNTP's	0.21 mM	0.25
ISSR's	2.6 μ M	3.00
DMSO	8.7%	1.00
PaqDNA	0.1U/ μ L	0.25
ADN		1.50

Análisis ISSR

Las bandas que se obtuvieron se analizaron como marcadores genéticos, suponiendo que cumplen las siguientes consideraciones: (a) se comportan como marcadores dominantes que segregan de forma mendeliana, (b) las frecuencias genotípicas de los alelos mantienen las proporciones de Hardy-Weinberg, y (c) todos los alelos recesivos (“ausencia de banda”) son idénticos en estado (es decir, provienen de mutaciones idénticas) tanto entre individuos como dentro de individuos; lo mismo ocurre con los alelos dominantes (“presencia de banda”) (Segura-Buitrago, 2002). Mediante los perfiles de bandas obtenidos en los geles se elaboró una matriz de datos binarios correspondiente a los tres iniciadores utilizados, donde la presencia y ausencia de bandas fue registrado, asignando 1 y 0, respectivamente. Con el código binario generado se analizó el índice de Información de Shannon como medida de la diversidad genética, índice de contenido polimórfico, heterocigosis insesgada de Nei, número promedio de alelos, número de alelos efectivos, se

construyó un dendrograma entre los individuos de cada tipo de cruce basado en el coeficiente de correlación que mide la correlación entre las interdistancias y un análisis de coordenadas principales con el fin de agrupar a los individuos estudiados, utilizando el software INFOGEN.

Análisis de asociación de la prueba exacta de Fisher

Para la evaluación estadística de significancia de los locus asociados en un conjunto de datos fue usada la prueba exacta de Fisher, en el cuadro de contingencia, producida por un grupo de bandas pertenecientes a las categorías “PE, poliembriónica” y “NoPE, no poliembriónica” para cada uno de los locus encontrados, para ser asociados a la característica de la expresión de la poliembriónia. Para reducir la probabilidad de obtener falsos significativos e ignorando en gran medida las tendencias de significativos débiles, se utilizó la corrección de Bonferroni con un nivel de confianza $\alpha=0.05$ entre el número de locus obtenidos, por ejemplo $0.05/70= 7.1e-4$ (Ryman y Jorde, 2001; Balluerka y Vergara, 2002). Para determinar asociaciones se realizó una exploración amplia tomándose dos criterios de clasificación, uno fue el basado de acuerdo a los cruzamientos representados en el cuadro 3.11, y el segundo fue fundamentalmente basado en el tipo de progenitores, quedando como se muestra en el Cuadro 3.14.

Cuadro 3.14 Grupos de cruzamiento dependiendo del tipo de progenitores.

Grupo	Tipo de Cruza
I	Ambos con expresión fenotípica doble (PE)
II	Uno PE con uno Individual de naturaleza PE
III	Ambos Individual de naturaleza PE
IV	Uno PE con uno Individual de naturaleza No-PE
V	Uno Individual de naturaleza PE con uno Individual de naturaleza No-PE

Análisis de asociación de la prueba X^2 de la tabla de contingencia

Para la determinación de la asociación de la frecuencia de plantas poliembriónicas con el tipo de progenitores, en cada locus se realizó una Chi-cuadrada método tabla de contingencia, obteniendo valores de la X^2 y de probabilidad (p -valor).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo 1: Identificación de secuencias polimórficas y monomórficas de regiones hiper-variables

Selección de plantas PEm

El análisis de similaridad de las regiones hipervariables del ADN como uno de los propósitos de esta investigación requirió primero seleccionar el tipo de material apropiado (Figura 4.1), donde el par de plántulas hermanas sólo compartieran el nudo escutelar. Esta condición, al hacer germinar las semillas de los genotipos para el estudio, se presentó en una frecuencia baja, del orden de 0.55%. Debido a esto, se incorporaron al análisis dos plantas con semejanza al apropiado (Cuadro 4.1). Este tipo de estructuras fue observada en líneas de maíces poliembriónicos, originadas a partir de la división longitudinal parcial del pro-embrión, conectados por un solo escutelo, parcialmente dividida y encerrados en una sola cariósida con una masa común de endospermo, proponiendo una identidad similar, algo semejante a lo que definió Sharman (1942).

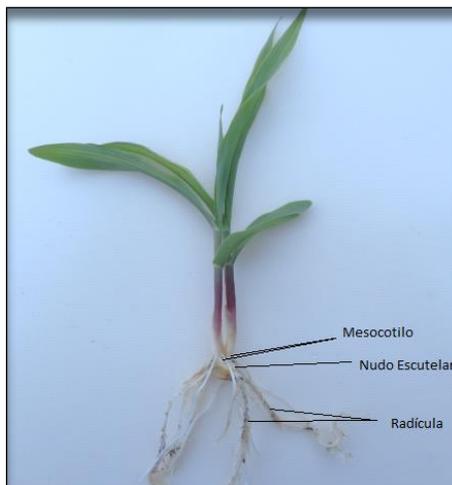


Figura 4.1. Estructura de plántula poliembriónica, compartiendo el nudo escutelar.

Cuadro 4.1 Relación de plántulas seleccionadas con diferente expresión fenotípica.

Genotipo	Descripción
D-S ₁ -03	Plántulas hermanas con dos mesocotilos y dos radículas soldadas.
D-S ₁ -05	Plántulas hermanas con dos mesocotilos y una radícula.
D-PL-13	Plántulas hermanas con dos mesocotilos y dos radículas separadas.

Extracción, pureza e integridad del ADN

Las muestras para la extracción de ADN provinieron de tejido foliar, de plántulas en pares e individuales, de los diferentes genotipos, a los 15-17 días de edad. Para verificar la calidad e integridad de la extracción del ADN, se observaron bandas nítidas que indican la presencia de ADN de calidad (Figura 4.2).

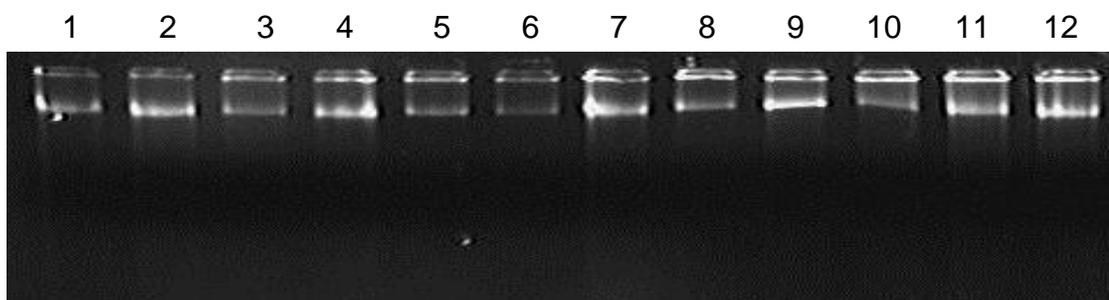


Figura 4.2 ADN genómico total extraído de tejido foliar provenientes de plantas de maíces poliembriónicos.

La medición de pureza mediante espectrofotometría de las diferentes muestras de ADN extraído resultó en una serie de valores en el rango de 1.6 a 2. Como se establece en el estándar de la técnica, los valores óptimos se ubican en el intervalo de 1.8 a 2, por lo que una proporción de 20% de las muestras en este trabajo estuvieron ligeramente debajo del umbral inferior. Es frecuente que la calidad del ADN inferior al estándar se deba a contaminación con ARN, proteínas u otros componentes celulares (van der Vlies y van Diem, 2012).

Longitud de los fragmentos de las regiones hipervariables ITS e IGS

La amplificación de los fragmentos de las regiones de espacios transcritos internos (ITS) y de secuencias intergénicas (IGS) fue mediante el método PCR. El patrón de bandeo en las regiones fue aproximadamente de 700 pb y 3,000 pb, respectivamente. Esto coincide con lo reportado por Baldwin *et al.* (1995) donde indican que la región ITS completa en angiospermas tienen una longitud entre 500 – 700 pb, y para la región IGS, caso concreto del

maíz, se han registrado longitudes entre 2,400 - 3,800 pb (Roger y Bendich,1987). En la Figura 4.3 se puede observar una adecuada amplificación de ADN, dado que las bandas se observaron claramente.

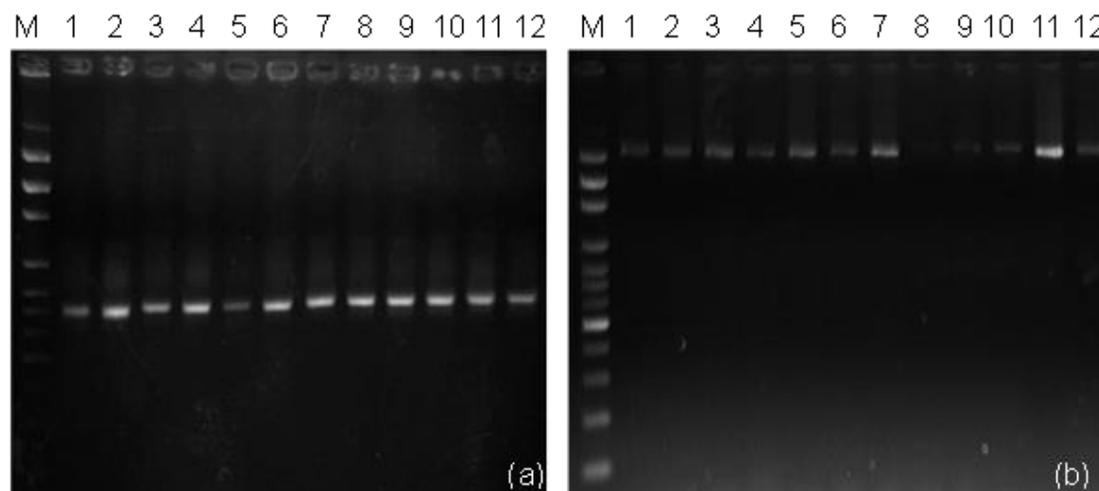


Figura 4.3 Gel de electroforesis de las regiones (a) ITS y (b) IGS. Carril M, marcador de peso molecular de 100pb; Carril 2-12, muestras de maíces poliembriónicos.

Análisis molecular de las regiones hipervariables ITS e IGS

El análisis de las regiones hipervariables se realizó a partir de muestras de tres familias (D-S₁-03, D-S₁-05 y D-PL-13) y en muestras-remanente de ADN de las familias (D-S₁-03* y D-S₁-07*), el cual fue extraído por Avendaño (2012). Al respecto, es conveniente mencionar dos puntos importantes: 1) que la familia (D-S₁-03* y D-S₁-03) tuvieron el mismo origen, pero se refieren a dos muestras, una utilizando ADN extraído por Avendaño (2012), y la segunda con nueva extracción de ADN, obtenido en este trabajo; y 2) los integrantes de las dos familias, tienen en común a la misma planta madre. La comparación de las secuencias se realizó entre pares de individuos integrantes de cada familia.

Comparación de secuencias nucleotídicas de familias S₁

Las comparación de secuencias de la familia D-S₁-03, mostraron una similitud de sitios invariables en la región ITS de intermedios-altos (Cuadro 4.2). De acuerdo al análisis no se detectan casos de secuencias idénticas entre las seis comparaciones posibles. El porcentaje de contenido G+C fue de 71-76% siendo casi iguales, teniendo como referencia que la composición del maíz en cuanto contenido G+C es muy amplio de 45 a 75% (Carels y Bernardi, 2000).

Cuadro 4.2 Comparación de secuencias de ADN de la región ITS de la familia D-S₁-03.

Comparaciones	Núm. Sitios	S inv (%)	S (%)	Pi (%)	G+C (%)
M vs PI	140	80	20	19	71
M vs PEm1	141	86	14	14	71
M vs PEm2	137	88	12	12	73
PI vs PEm1	141	80	20	25	74
PI vs PEm2	138	86	14	25	76
PEm1 vs PEm2	137	88	12	12	75

Núm. sitios= número de sitios: S inv (%)= Sitios invariables (monomórficos); S = Sitios polimórficos; Pi = Diversidad nucleotídica; G+C = Proporción del contenido de guanina y citosina. M = Madre, PI = Planta individual, PEm1 = Planta PEm 1 de 2, PEm2 = Planta PEm 2 de 2.

En esta serie de comparaciones, la relación de diferencias en cuanto a diversidad nucleotídica es muy estrecha, presentando menor polimorfismo cuando se compararon hermanas poliembriónicas (PEm1 y PEm2) y cuando se compararon estas con la madre que las generó no fueron homólogos. La

diferencia del valor exacto de la madre con un hija poliembriónica (PEm1) es producido por la longitud del fragmento comparado.

La morfología fenotípica de las hermanas PEm, 1 y 2, de la familia D-S₁-03 es descrita como dos plántulas de plúmula independiente, con dos mesocotilos, y dos radículas, estas unidas longitudinalmente (soldadas). En un estudio realizado por Espinoza *et al.* (2012), se indica que la progenie derivada de las poblaciones PEm BAP y NAP, presentaron diferentes tipos de formación de radícula, presentes en una gama de expresión, como sigue: radículas independientes, o con un cierto grado de fusión; dos radículas que comparten tejido cortical pero con cilindro vascular independiente; otras radículas que comparten tanto el tejido cortical como el cilindro vascular. El caso actual, se pudiera comparar con una de estas formas, pero no se puede confirmar con exactitud debido a la falta de evidencia histológica en la familia de este trabajo, que pudiera ubicar de manera inequívoca a cual tipo corresponde.

El análisis actual de la familia D-S₁-03* (Avendaño, 2012), correspondiente a el mismo material genético que en el trabajo anterior, los valores de similaridad mostraron porcentajes de sitios invariables más divergentes que en la familia anterior (Cuadro 4.3). En base a los resultados obtenidos se puede observar una discrepancia entre los valores de similaridad en el juego de comparaciones, obtenidos en el análisis realizado por Avendaño (2012) con los actualmente generados. Cabe señalar que en el análisis anteriormente

realizado se obtuvo un 100% de similitud entre una de las plantas poliembriónicas con respecto a la madre que la generó.

Cuadro 4.3 Comparación de secuencias de ADN de la región ITS de la familia D-S₁-03* (Avenidaño, 2012).

Comparaciones	Núm. Sitios	S inv (%)	S (%)	Pi (%)	G+C (%)
M vs PI	234	75	25	25	61
M vs PEm1	235	66	34	33	61
M vs PEm2	235	66	34	34	60
PI vs PEm1	234	75	25	25	68
PI vs PEm2	237	79	21	20	66
PEm1 vs PEm2	235	94	6	6	66

Núm. sitios= número de sitios; S inv (%)= Sitios invariables (monomorfismos); S = Sitios polimórficos; Pi = Diversidad nucleotídica; G+C = Proporción del contenido de guanina y citosina. M = Madre, PI = Planta individual, PEm1 = Planta PEm 1 de 2, PEm2 = Planta PEm 2 de 2.

En el análisis actual ambas comparaciones, madre (M) con las hijas poliembriónicas (PEm1 y PEm2), presentaron valores de un grado intermedio. Es importante señalar que los rangos de similitud del análisis realizado por Avenidaño (2012) y el actual fueron en cierto grado consistentes, presentándose en un rango de 66 a 100% para el primero y 66 a 94% para el actual.

En el mismo orden de ideas, se puede concluir que la similitud entre ambas plantas poliembriónicas (PEm1 vs PEm2) fue la más estrecha pero no igual. De acuerdo a esta evidencia, los embriones adventicios desarrollados no pudieron haber tenido un origen a partir de alguna célula somática de la nucela, ni tampoco 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 no se puede sugerir una implicación como la que postuló Avendaño (2012). Es claro que los resultados de la comparación de similitudes de las dos familias, no parecen validar que las dos hermanas PEm sean de algún modo idénticas (twins), al observar que la máxima similitud fue inferior a 90%.

La serie de comparaciones de secuencias correspondientes a la familia D-S₁-05 no mostraron alguna similitud total de base a base entre las comparaciones realizadas (Cuadro 4.4). Los resultados producidos por estas comparaciones arrojaron datos divergentes, con una similitud más cercana entre los pares posibles entre hermanas PI, PEm1 y PEm2, cuyos valores en esta familia se situaron en los más altos. Debe notarse la consistencia comparativa, si los sitios invariables entre la madre y las tres hijas es de monto muy similar, bajo (40 % aprox.), y entre las dos hermanas PEm es moderadamente alto, el que se suscita entre cualquiera de ellas y la hermana individual (PI) puede ser de un monto semejante, lo cual es el que se observa. Esta tendencia a la relación más cercana entre las tres hermanas también es observado en las dos familias anteriores D-S₁-03 y D-S₁-03*.

Cuadro 4.4 Comparación de secuencias de ADN de la región ITS de la familia D-S₁-05.

Comparaciones	Núm. Sitios	S inv (%)	S (%)	Pi (%)	G+C (%)
M vs PI	300	42	58	55	53
M vs PEm1	300	42	58	55	57
M vs PEm2	300	39	61	54	58
PI vs PEm1	300	86	14	12	64
PI vs PEm2	300	78	22	20	63
PEm1 vs PEm2	300	84	16	15	64

Núm. sitios= número de sitios; S inv (%)= Sitios invariables (monomorfismos); S = Sitios polimórficos; Pi = Diversidad nucleotídica; G+C = Proporción del contenido de guanina y citosina. M = Madre, PI = Planta individual, PEm1 = Planta PEm 1 de 2, PEm2 = Planta PEm 2 de 2.

La morfología fenotípica correspondiente a esta familia, plántulas con dos mesocotilos y una radícula doble fusionada desde la rotura de la caliptra (al inicio de la germinación), como en la familia anterior, también pudiera asemejarse a alguna de las versiones señaladas por Espinoza *et al.* (2012), pero se carece de las pruebas histológicas.

Conocida la rápida evolución de las regiones IGS (Zhou *et al.*, 1996) donde lo común es la manifestación de polimorfismo, y con los resultados de similaridad (monomorfismo) en ITS, en las familias etiquetadas como D-S₁-03, D-S₁-03* y D-S₁-05, no se requirió la continuación del análisis de comparaciones de individuos de la región IGS.

Los resultados de similitud de las comparaciones realizadas en la familia D-S₁-07* (Avendaño, 2012) se muestran en el Cuadro 4.5. La discrepancia que se observa entre los valores obtenidos en el trabajo de Avendaño (2012) y los encontrados en el presente, pudiera deberse a la diferencia en el número de pares de bases nucleotídicas comparadas de 150 pb contra 289-296 pb, que significa una cobertura al doble de la región. El intervalo de los sitios monomórficos en esta familia anteriormente fue en el rango de 72% a 100%, correspondiendo el valor más alto a la comparación de las secuencias entre la planta madre (M) Y una de las hijas PEm.

Cuadro 4.5 Nueva comparación de secuencias de ADN de la región ITS de la familia D-S₁-07* (Familia generada por Avendaño en 2012).

Comparaciones	Núm. Sitios	S inv (%)	S (%)	Pi (%)	G+C (%)
M vs PI	150	99	1	1	74
M vs PEm1	150	97	3	3	72
M vs PEm2	150	99	1	1	73
PI vs PEm1	150	96	4	4	73
PI vs PEm2	150	98	2	2	74
PEm1 vs PEm2	150	98	2	2	72

Núm. sitios= número de sitios; S inv (%)= Sitios invariables (monomórfismos); S = Sitios polimórficos; Pi = Diversidad nucleotídica; G+C = Proporción del contenido de guanina y citosina. M = Madre, PI = Planta individual, PEm1 = Planta PEm 1 de 2, PEm2 = Planta PEm 2 de 2.

Una de las causas de la ausencia de una total similaridad en los sitios analizados puede ser debido a la tasa de error de 10^{-7} a 10^{-8} , de la enzima encargada de la replicación (Schaaper, 1993). Estos errores en la síntesis

resulta beneficioso para la evolución de las especies para la generación de diversidad y para una mayor supervivencia (Kunkel, 2004).

Los altos niveles de similaridad, al menos en una de las comparaciones, sugieren la posibilidad de validar el resultado con un análisis de la región IGS. Sin embargo, la aplicación del análisis presentó resultados con una notable divergencia debido a que, en general la familia, presentó valores de sitios invariables por muy debajo a los obtenidos en la región ITS (Cuadro 4.6).

Cuadro 4.6 Nueva comparación de secuencias de ADN de la región IGS de la familia D-S₁-07* (Avendaño, 2012).

Comparaciones	Núm. Sitios	S inv (%)	S (%)	Pi (%)	G+C (%)
M vs PI	280	46	54	53	46
M vs PEm1	279	51	49	47	51
M vs PEm2	280	57	43	41	57
PI vs PEm1	280	56	44	42	56
PI vs PEm2	280	54	46	44	54
PEm1 vs PEm2	280	66	34	31	66

Núm. sitios= número de sitios; S inv (%)= Sitios invariables (monomorfismos); S = Sitios polimórficos; Pi = Diversidad nucleotídica; G+C = Proporción del contenido de guanina y citosina. M = Madre, PI = Planta individual, PEm1 = Planta PEm 1 de 2, PEm2 = Planta PEm 2 de 2.

El valor más alto de sitios monomórficos correspondiente a la región IGS fue generado por la comparación de las hermanas PEm 1 y 2. La compulsa entre los porcentajes de esta familia son consistentes, debido a que en el juego de comparaciones posibles los valores se sitúan dentro los intermedios. En base a los resultados, es evidente que las comparaciones que presentan un

valor más elevado de sitios invariables en las familias S_1 lo presenta el par de plantas poliembríonicas PEm 1 y 2.

En una revisión realizada por Willson y Burley (1983) mencionan a la simple poliembrionía como la capacidad del gametofito femenino de presentar más de una célula huevo con el potencial de producir un embrión después de ser fertilizado por el mismo o diferente macho, eso dependerá de la fuente de los granos de polen (Tudge, 2006). Con los valores obtenidos en este análisis, se puede apoyar el hecho de que las plantas poliembríonicas no son consideradas como idénticas y que por lo tanto no provienen del mismo origen, aún en el caso cuando la polinización es controlada y que el grado de parecido pudiera proceder de la acumulación de genes en estado homocigótico.

Comparación de secuencias nucleotídicas de la familias PL

La familia D-PL-13 fue la única representante de los casos donde no existió un control de la polinización. Al alinear secuencias nucleotídicas de la región ITS en cada par de comparaciones, los datos muestran alta similitud entre todos los integrantes de la conforman (Cuadro 4.7). Es decir, como si la secuencia de nucleótidos de cada uno de ellos en ITS fuera prácticamente el mismo. Con base a estos resultados se puede establecer la hipótesis de que pudiera existir algún tipo de reproducción asexual ya que la progenie, producto de la polinización libre, no contiene la acumulación forzada de pares de genes

en homocigosis por efecto de la autofecundación, condición que incrementa la posibilidad de similaridad, al menos entre ADN de plantas hermanas.

Cuadro 4.7 Comparación de secuencias de ADN de la región ITS de la familia D-PL-13.

Comparaciones	Núm. Sitios	S inv (%)	S (%)	Pi (%)	G+C (%)
M vs PI	145	99	1	0	74
M vs PEm1	145	99	1	0	74
M vs PEm2	145	99	1	0	74
PI vs PEm1	144	100	0	0	74
PI vs PEm2	144	100	0	0	74
PEm1 vs PEm2	144	100	0	0	74

Núm. sitios= número de sitios; S inv (%)= Sitios invariables (monomórfismos); S = Sitios polimórficos; Pi = Diversidad nucleotídica; G+C = Proporción del contenido de guanina y citosina. M = Madre, PI = Planta individual, PEm1 = Planta PEm 1 de 2, PEm2 = Planta PEm 2 de 2.

Una forma de probar la hipótesis propuesta con respecto a la similaridad casi total de la región ITS es a través del análisis de comparación de la región IGS en los genotipos de la familia D-PL-13. Los resultados se muestran en el Cuadro 4.8.

El análisis de similaridad de la región IGS mostró que la comparación de la secuencia de la madre (M) con la hija no poliembriónica (PI) presentaron el mayor porcentaje de similaridad. Las comparaciones de las secuencias de la planta poliembriónica PEm2 con la madre (M) y planta individual (PI) es en la que se presenta los valores más bajos de similaridad. Aunque la planta PEm2 es la más alejada, el valor más alto que esta presenta es cuando se compara

con la planta poliembriónica PEm1. Cabe mencionar, que el trabajo realizado por Avendaño (2012) dos de tres familias de polinización abierta presentan también los valores más altos de sitios invariables entre las dos plantas PEm 1 y 2. Por lo tanto, el análisis de la región ITS no es evidencia suficiente para avalar la hipótesis mencionada.

Cuadro 4.8 Comparación de secuencias de ADN de la región IGS de la familia D-PL-13

Comparaciones	Núm. Sitios	S inv (%)	S (%)	Pi (%)	G+C (%)
M vs PI	319	81	19	18	65
M vs PEm1	317	68	32	32	62
M vs PEm2	319	48	52	50	58
PI vs PEm1	318	67	33	32	63
PI vs PEm2	318	51	49	46	59
PEm1 vs PEm2	318	64	36	34	56

Núm. sitios= número de sitios; S inv (%)= Sitios invariableS (monomorfismos); S = Sitios polimórficos; Pi = Diversidad nucleotídica; G+C = Proporción del contenido de guanina y citosina. M = Madre, PI = Planta individual, PEm1 = Planta PEm 1 de 2, PEm2 = Planta PEm 2 de 2.

La expresión fenotípica de las plántulas poliembriónicas está constituida por dos mesocotilos y dos radículas completamente separadas, similar a una de las tres versiones descritas por Erldeska *et al.* (1996), donde se producen múltiples embriones individuales estrechamente unidos, pero separadas por una epidermis, con plúmulas y radículas independientes, generado por el fenómeno llamado poliespermia, donde los embriones se originan a partir de la fecundación de múltiples células huevo. Una de las causas probables que pudieron originar la similaridad de secuencias en la región ITS, puede ser

debido a la condición genética similar de la fuente de polinización, provocada por una base genética en común.

Análisis agronómicos de familias PEs

El manejo del material experimental bajo condiciones de invernadero permitió catalogar a las progenies de las familias bajo estudio por sus capacidades para germinar, manifestar la frecuencia de PEm, así como anomalías de emergencia de plántulas. Una semilla que germina dos o más plántulas es declarada como PEm; la condición normal de la o las plántulas fue declarada cuando emergieron con todas sus estructuras morfológicas reconocibles, de acuerdo a la morfología del maíz, mientras que las declaradas como anormales, fueron las que presentaban malformaciones, partes incompletas y raquitismo.

Los valores promedio obtenidos de las variables, porcentajes de germinación (PGER), poliembrionía (PPEm), y anomalías (PAN) Se presentan en el Cuadro 4.9. Los datos obtenidos con respecto a la manifestación de plantas múltiples se sometieron a un análisis de X^2 , para corroborar la frecuencia PEm esperada de 55 A 65 %, correspondiente a la población BAP, y sus progenies (Espinoza *et al.*, 1998; Espinoza *et al.*, 2008; Pliego, 2014).

Los resultados en seis de doce genotipos estudiados mostraron un porcentaje de germinación superior al 85%, medida comercial para calificar

como buena la capacidad germinativa. En esta variable, las familias de naturaleza poliembriónica presentó un rango de 33.7 a 100.0%. La variable PPEm presentó una media general de 52.1% con una desviación estándar ± 12.1 , en un intervalo de 33.7 a 74.2%. Aunque se mostraron valores bajos a los reportados por Espinoza, *et al.* (2008) entre 55 y 65%, la mayoría de los genotipos se encuentran sobre el rango e incluso lo superan.

Cuadro 4.9 Porcentajes de las variables GER, PEm y PAN de materiales exóticos, familias S1 y de polinización abierta PL de maíces poliembriónicos.

Genotipo	PGER (%)	PPEm (%)	PAN (%)
D-S ₁ -03	92.7	44.0	24.1
D-S ₁ -05	80.5	55.1	31.1
D-S ₁ -07	72.2	61.2	31.0
D-S ₁ -14	97.2	47.6	23.2
D-S ₁ -16	94.4	74.2	12.1
D-PL-01	75.0	37.0	44.6
D-PL-02	83.3	57.5	12.8
D-PL-06	86.1	33.7	31.6
D-PL-12	77.8	52.4	9.4
D-PL-13	100.0	55.5	8.3
Tuxp-HOC	91.7	0	9.1
Tep-3	61.1	0	47.1
Media	84.7 \pm 11.5	52.1 \pm 12.1	23.5 \pm 12.6

PGER: porcentaje germinación; PPEm: porcentaje de poliembriónia; PAN: porcentaje de plantas anormales.

Por lo que se refiere al análisis de la prueba de χ^2 de la bondad de ajuste, en el Cuadro 4.10 se observan que cuatro de los diez casos de las familias respondieron a lo esperado, una frecuencia de PEm de 65%. La frecuencia promedio de la PEm a partir de las seis familias fue de 59.3 %. La familia D-S₁-16 fue la que presentó un porcentaje mucho mayor. Lo que corresponde a las familias que no respondieron al valor esperado, se presentaron en una frecuencia promedio de PEm de 40.6%, en un intervalo de 33.7 a 47.6%.

Cuadro 4.10 Valores de χ^2 calculada para el análisis genético del carácter PEm.

Genotipo	χ^2	p-valor
D-S ₁ -03	9.61	0.002*
D-S ₁ -05	3.86	0.049*
D-S ₁ -07	1.73	0.188
D-S ₁ -14	7.56	0.006*
D-S ₁ -16	0.94	0.330
D-PL-01	18.68	1.54e-05*
D-PL-02	1.076	0.299
D-PL-06	21.08	4.41e-06*
D-PL-12	1.87	1.452
D-PL-13	1.45	2.28e-01*

‡ Hipótesis frecuencia de 6:10 (Poliembriónicas:Individuales); * = $\alpha \leq 0.05$

El sesgo de estas frecuencias pudo ser debido a dos causas posibles: 1) al fenómeno de penetrancia incompleta, que obstruye la expresión de la

poliembriónía, y que de acuerdo al análisis realizado por Rebolloza *et al.* (2012) los valores corresponden del orden de 10 a 50%; 2) el número de semillas utilizadas en este estudio fue de 12 en tres repeticiones, muestra determinada en función de la semilla disponible, número que es superado por mucho al utilizado en el estudio de Rebolloza *et al.* (2012) donde se establecieron en lotes con 200 semillas por repetición, cinco repeticiones.

Objetivo 2: Determinación de homocigosis o heterocigosis mediante marcadores moleculares SSR

Análisis molecular de los SSR

Las familias que mostraron similitud de secuencias en cualquiera de las regiones ITS e IGS, y las dos familias S₁ seleccionadas en el trabajo realizado por Avendaño (2012), se utilizaron para realizar el análisis de patrón de bandeo asociado a homocigosis o heterocigosis, además de determinar parámetros de variabilidad genética. Con el uso de los marcadores moleculares microsatélites SSR se generó un total de 40 alelos en muestras de plantas de maíz PEm y exóticos (línea de alta endogamia denominada AN-Tep.3 y la población Tuxpeño HOC). En el cuadro 4.11 se puede observar el tamaño y el número de alelos correspondiente a cada marcador.

Cuadro 4.11 Rango y número de los alelos para cada locus de los SSR.

Número	Locus	Unidades repetidas	Tamaño (pb)	Número de alelos
1	phi064	ACGC	60-75	3
2	phi96100	ACCT	165-315	2
3	phi053	ATAC	80-210	11
4	phi072	AAAC	105-110	2
5	zct118	AG	100-200	2
6	phi452693	AGCC	120-125	2
7	phi328175	AGG	125-600	7
8	phi420701	CCG	285-320	4
9	phi032	AAAG	325-265	4
10	umc1152	ATAG	160-180	3
			Total	40

El genotipo de cada individuo para cada locus se puede observar en el Cuadro 4.12. Este análisis sólo se realizó en ocho de los diez iniciadores utilizados, debido a que en dos se observó una presencia de multialelos, impidiendo la determinación del genotipo (homocigoto o heterocigoto).

Los porcentajes de similitud se pueden observar en el Cuadro 4.13, donde se comparó patrones de genotipos de la planta madre con las hijas, una individual y dos poliembriónicas (PI y PEm1 y 2), y posteriormente entre ellas.

Cuadro 4.12 Homocigosis y heterocigosis de Plantas Individuales (PI) Planta PEm (1 de 2 y 2 de 2) con la Madre.

Integrantes	SSR	SSR	SSR	SSR	SSR	SSR	SSR	SSR
	1	2	4	5	6	8	9	10
D-S1-03 M	HE	HO	HO	ND	HO	HO	ND	HO
D-S1-03 PI	HE	HO	HO	ND	HO	HO	ND	HO
D-S1-03 PEm1	HE ^ε	HO	HO	ND	HO	HO	ND	HO
D-S1-03 PEm2	HO	HO	HO	ND	HO	HO	ND	HO
D-PL-13 M	HE	HO	HO	HE	HO	HE	HO	HO
D-PL-13 PI	HO	HO	ND	HE	HO	HO ^ε	HO	HE
D-PL-13 PEm1	HO	HO	ND	HE	ND	HO	ND	HO
D-PL-13PEm2	HO	HO	HO	ND	HO	HO	HO	HO
D-S1-03 M	HE	HO	HO	ND	HO	HO	ND	HO
D-S1-03 PI*	HO	HO	HO	ND	HO	HO ^ε	ND	HO
D-S1-03 PEm1*	HO	HO	HO	ND	HO	HO ^ε	ND	HO
D-S1-03 PEm2*	HO	HO	HO	ND	HO	HO ^ε	ND	HO
D-S1-07 M*	HE	HO	HO	HE	HO	HE	HE	HE
D-S1-07 PI*	HO	HO	HO	HO	HO	HO	ND	HE
D-S1-07 PEm1*	HO	HO	HO	HE	HO	HO	HO	HE
D-S1-07 PEm2*	HE	HO	HO	HE	ND	HO	HO	HE

M = Madre; PI = Planta individual; PEm1 = Planta PEm 1 de 2; PEm2 = Planta PEm 2 de 2; HE= alelo heterocigoto; HO= alelo homocigoto; ND=ausencia de banda;*=Plántulas analizadas por Avendaño 2012; ^ε= diferente longitud en pb con respecto a la madre (M). ^ε= diferente longitud en pb con respecto a las plantas poliembriónicas (PEm1 y PEm2).

Cuadro 4.13 Análisis de similitud de los SSR en porcentaje.

Comparaciones	D-S ₁ -03	D-PL-13	(Avendaño, 2012)	
			D-S ₁ -03*	D-S ₁ -07*
M vs PI	100	25	67	50
M vs PEm1	83	50	67	67
M vs PEm2	83	50	67	83
PI vs PEm1	83	50	100	83
PI vs PEm2	83	50	100	67
PEm1 vs PEm2	83	100	100	83

Los resultados de las comparaciones (Cuadro 4.13), en la familia D-S₁-03 presento un 100% de similaridad de loci entre la planta madre y la planta hija individual, teniendo un porcentaje de loci homocigotos de 83% (porcentajes obtenidos a partir del Cuadro 4.12). De igual manera en la familia D-PL-13, se presentó una similaridad de 100% pero ahora entre las dos plantas poliembriónicas, el porcentaje de loci homocigóticos de la madre fue de 63 y de las hijas PEm de 88%.

Lo que corresponden a la familia D-S₁-03* (Avendaño, 2012) presentó un patrón de similaridad de genotipo de 100% en las comparaciones entre PI vs PEm1, PI vs PEm2 y PEm1 vs PEm2. Cada uno de estos individuos presentó 100% de loci homocigóticos, con respecto a la planta madre que presentó un 83%.

Los loci homocigóticos aumentan debido a la reducción de sitios heterocigóticos procedente de la autofecundación, como fue el caso de las tres familias S₁ analizadas, caso contrario a lo que ocurre en PL's. Las poblaciones que son sometidas a la PL deben presentar la mayoría loci heterocigóticos, y de acuerdo a los resultados obtenidos esto no se observa en la familia D-PL-13, lo cual se puede explicar debido a que las poblaciones PE comparten la misma base genética. De acuerdo a la literatura, las plantas de origen sexual se distinguen de las asexuales por ser homocigotas en uno o más loci, donde el progenitor hembra es heterocigoto. La reproducción asexual está fuertemente correlacionada con la hibridación, debido a que la mayoría de las especies que

son apomícticas, surgieron de la hibridación de dos genomas por lo tanto sus loci son heterocigotos, y siendo la apomixis resultado de cambios epigenéticos en la regulación de los genes y/o la relación asincrónica de los genomas perpetuándose la heterocigosis y por lo tanto se esperaría altos niveles de loci heterocigotos (Beck *et al.*, 2011; Lovell *et al.*, 2013). Lovell *et al.* (2013) mencionan que en un estudio realizado en el género *Boecheira* se observó una alta heterocigosidad en líneas triploides apomícticas, pero en líneas diploides apomícticas tienen valores intermedios mientras que los casos de diploides sexuales se mostraron mayormente homocigóticos.

Estimadores de la variabilidad genética

La variabilidad genética se puede evaluar con diferentes tipos de datos, pero los más adecuados son los marcadores codominantes, y puede determinarse de diferentes maneras a través de indicadores como son la proporción de loci polimórficos, diversidad genética y la heterocigosidad, entre otros (Balzarini *et al.*, 2010).

Los estimadores de la variabilidad genética obtenidos para cada familia en este trabajo se muestran en el Cuadro 4.14. La familia que obtuvo mayor número de loci polimórficos y diversidad genética fue la familia D-PL-13, mientras que D-S₁-03 y D-S₁-07* presentaron el menor número, siendo esto lógico debido a la estrategia de polinización utilizada.

Cuadro 4.14. Estimadores de variabilidad genética de cuatro familias poliembriónicas (PEm).

Estadístico	D-S ₁ -03	D-PL-13	Avendaño, 2012	
			D-S ₁ -03*	D-S ₁ -07*
Loci polimórficos (95)	0.33	0.68	0.53	0.33
Diversidad genética	0.13	0.27	0.20	0.13
Heter. Insegada de Nei	0.15	0.31	0.23	0.15
Núm. Promedio de alelos	1.33	1.68	1.53	1.33
Núm. Efectivo de alelos	1.23	1.47	1.34	1.23

Por un lado, los valores muestran que existe una variabilidad genética de nivel bajo a intermedio (0.33 a 0.68), con poca diversidad genética dentro las familias de valores de 0.13 a 0.27, lo que pudiera ser producto de la selección y tipo de estructura genética familiar. Estos resultados validan la propuesta de la base genética en común que presentan las poblaciones. Además, cuando la heterocigosidad insegada de Nei (heterocigosidad esperada) y el número promedio de alelos es similar en todas las familias, significando que existe una variabilidad genética muy reducida (Aranguren *et al.*, 2001) entre de cada familia.

Análisis de varianza molecular (AMOVA)

En el análisis de varianza molecular (Cuadro 4.15) se detectaron diferencias significativas ($p < 0.0075$) entre los cinco grupos analizados pero más aún dentro de cada grupo ($p < 0.0025$). Cuatro de los grupos corresponden a familias PEm y el quinto pertenece a una línea de alta endogamia denominada AN-Tep.3 y la población Tuxpeño HOC. Como se observa el mayor porcentaje

de variación genética es debido a la diferencia entre los individuos que conforman los grupos y la restante se debe a la variación entre los integrantes del mismo. Un estudio realizado por Ramakrishnan *et al.* (2014) en brotes por explante de 17 genotipos de maíz, determinaron que el porcentaje de variación dentro los genotipos tuvo un valor de 93% y entre los genotipos de 3%, concluyendo que la madre y las plántulas generadas *in vitro* tienen un 100% de similaridad genética.

Cuadro 4.15 Análisis molecular de varianza (AMOVA) dentro y entre Familias poliembriónicas.

Fuente de Variación	gl	SC	CM	Porcentaje de Variación	p-valor	Número de interacciones
Familias	4	95.1	23.78	26.2	0.0075	400
Dentro de Familias	13	138.0	10.6	73.8	0.0025	400
Total	17	233.1	13.71			

Los porcentajes de variación en el presente estudio vuelven a indicar que existe una relación estrecha, pero no alguna identidad genética similar entre los integrantes de las cuatro familias analizadas, y más aún en el grupo que corresponde a los genotipos exóticos debido a que los integrantes que lo conforman se refieren a una población Tuxpeño HOC de polinización abierta y la AN-Tep.3 es altamente homocigota.

En el análisis de coordenadas principales (ACoP), se realizó un ordenamiento de las muestras de maíces poliembriónicos y exóticos en base a los resultados binarios obtenidos con los 10 SSR y con la distancia *Andeberg*

que fue con la que se obtuvo la mayor correlación cofenética (0.966), interpretándose como un ajuste muy bueno, es decir, que existe una clara estructura jerárquica entre los individuos (Figura 4.4). Este análisis, permite visualizar de forma más simple el patrón de agrupamiento de todos los individuos en el espacio, con lo que se puede obtener un acercamiento a las relaciones de parentesco entre los genotipos.

El ordenamiento consistió en la formación de cuatro grupos. Uno que contiene a la línea de alta endogamia denominada AN-Tep.3 y la población Tuxpeño HOC, que representa a maíz común, y genéticamente distantes de las familias de naturaleza PEm. El segundo grupo está compuesto con algunos integrantes de las familias D-S₁ 03 y D-PL13; el tercer grupo incluye a la familia D-S₁ 07* y un integrante de la familia D-PL 13; y por último, el cuarto grupo está integrado de la familia D-S₁ 03* y el resto de los individuos de la familia D-PL 13.

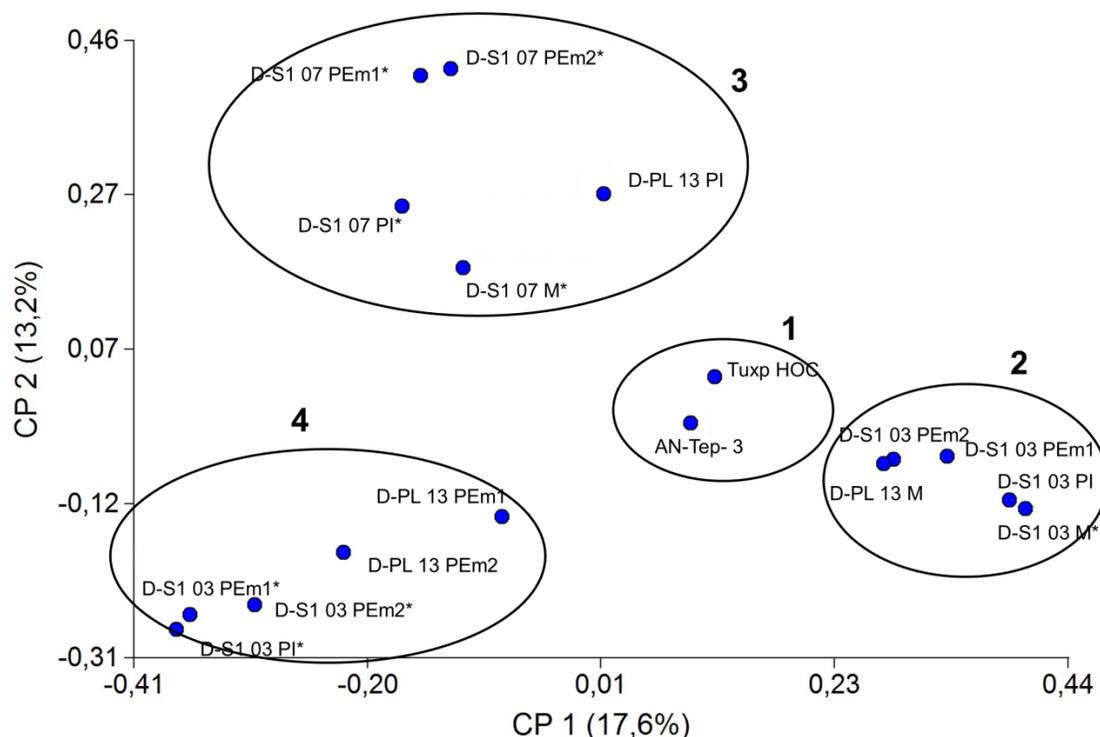


Figura 4.4. Análisis de coordenadas principales (ACoP) de genotipos de maíces poliembriónicos y exóticos, utilizando los marcadores moleculares SSR. *= Familias analizadas por Avendaño en 2012.

Se puede observar que las familias que tuvieron una distancia más ordenada fueron las D-S₁ 03 y D-S₁ 07*, este ordenamiento es consistente con la relación estrecha de los porcentajes de sitios invariables correspondiente a la región ITS de estas mismas familias. Por otro lado, los individuos que tienen una distancia menos ordenada son los que pertenecen a la familia D-PL13, debido a que se generó por la vía polinización no controlada.

El dendrograma obtenido con el método de agrupación de UPGMA (*Unweigthed Pair-Group arithmetic Average Method*, por su siglas en inglés) se representa en la Figura 4.5, con el fin de identificar el agrupamiento de los

integrantes que conforman una familia. Igual que en el ACoP se identificaron cuatro grupos principales.

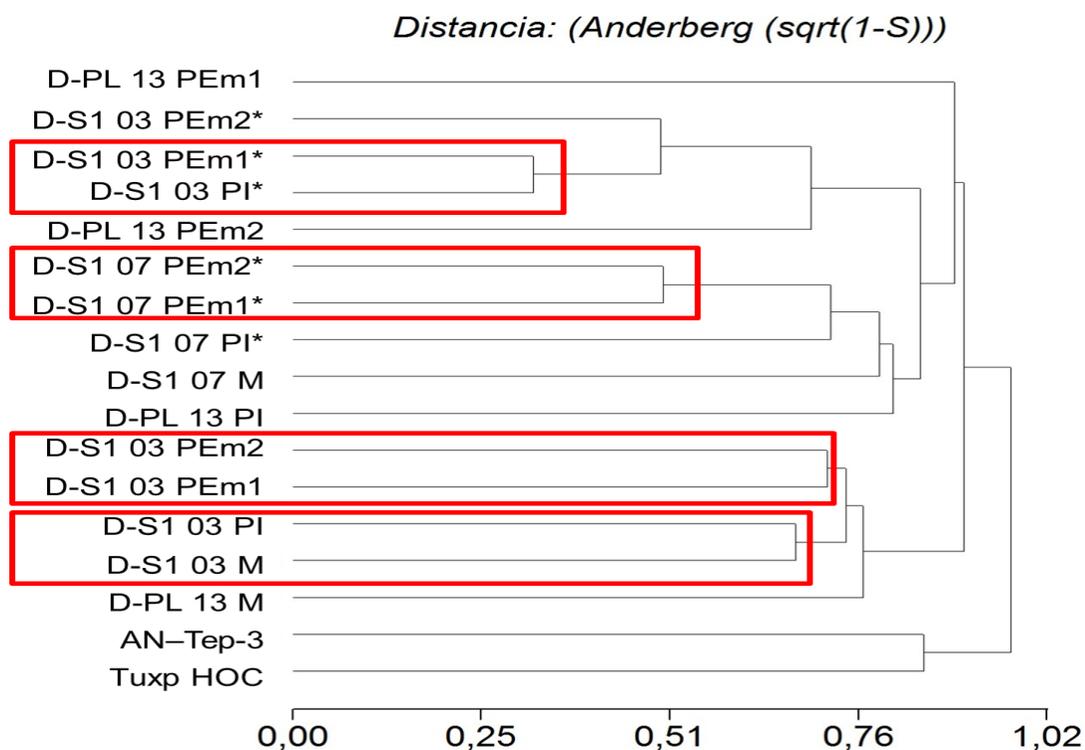


Figura 4.5 Dendrograma de genotipos de maíces poliembriónicos y exóticos basados en medidas de distancia Anderberg.*=muestras de familias generadas por Avendaño 2012.

El grupo más alejado corresponde, desde luego, a los genotipos AN-Tep.3 y la población Tuxpeño HOC. El segundo consistió en la formación de dos pequeños sub-grupos un poco distantes, uno compuesto entre una planta madre (D-S₁-03 M) y una planta hija individual (D-S₁-03 PI), de acuerdo a las unidades taxonómicas aquí calculadas ese sub-grupo tuvo un valor de 0.69, considerándose un valor intermedio ya que la mayor distancia observada fue del valor de 1.02, dato que coincide en la comparación de secuencias de la

familia D-S₁ 03 en la región ITS. El segundo sub-grupo entre las dos plantas poliembriónicas de la misma familia (D-S₁ 03 PEm1 y D-S₁ 03 PEm2).

En el tercer grupo, se observa que dos plantas poliembriónicas de la familia D-S₁-07 forman un pequeño sub-grupo (D-S₁-07 PEm1* y D-S₁-07 PEm2*), presentando uno de unidades taxonómicas de 0.50, y en el cuarto grupo, se forma un sub-grupo con una distancia menor de 0.32 entre una planta individual y una planta poliembriónica (D-S₁-03 PI* y D-S₁-03 PEm1*), considerándose en este análisis genotipos más estrechamente relacionados.

En general se puede distinguir un agrupamiento hacia las plantas poliembriónicas procedentes de una misma semilla, presentado un perfil más relacionado en comparación con el resto de los integrantes, tal es el caso en las familias D-S₁-03 y D-S₁-07*, agrupamiento que coincide con los valores más altos de similaridad de la región ITS.

Los resultados de los tres análisis realizados ACoP, agrupación UPGMA y comparación de secuencias de la familia D-S₁-07*, región ITS, coinciden en la estrecha relación que existe entre los integrantes que la conforman, pero más aún entre las dos plantas poliembriónicas hermanas (PEm 1 y PEm2). En la familia D-S₁-03 se presentó una consistencia en la agrupación de los integrantes que la conforma, ratificado por una dispersión reducida en los tres análisis realizados. Por otro lado, en la familia D-PL-13 se corrobora la divergencia entre los integrantes que la conforman.

Objetivo 3: Determinación de polimorfismo en la expresión de la poliembrionía debido al efecto del polen

Análisis molecular de los ISSR

El análisis realizado tuvo como base a la población BAP (enana), de alta poliembrionía, y a la población NAP (porte alto), también de naturaleza PEM pero no relacionada (es decir, sin relación o parecido genético). Un total de 70 alelos fueron generados utilizando tres iniciadores (Cuadro 4.16), siendo muy eficientes para revelar varias bandas informativas en una sola amplificación, con tamaños de fragmentos que oscilaron entre 221 y 1,243 pb. El ISSR 1 fue el iniciador que produjo mas polimorfismo, como se indicó también en un estudio realizado por Escobar (2012) en variedades de manzano, donde superó ligeramente al valor presentado en este trabajo.

Cuadro 4.16 ISSR utilizados para la amplificación por PCR de las muestras de maíz poliembriónico, número de productos amplificados por iniciador y nivel de polimorfismo obtenido.

ISSR	Secuencia (5´-3´)	Temperatura de alineamiento (°C)	No. total de bandas	Bandas polimórficas (%)
1	(GA) ₇ TC	48.2	17	88.23
9	(GT) ₈ TC	48.0	25	80.00
11	(TC) ₈ C	54.1	28	78.57

Si una banda está presente, se puede asumir que la secuencia donde se alinea el iniciador se encuentra presente en ambos lados de la cadena del ADN.

Por lo contrario, la ausencia de la banda podría significar una de cuatro posibles condiciones, como sigue a) falta de un sitio de apareamiento para el iniciador, b) la existencia de mutación en cualquiera de los sitios de apareamiento; c) re-arreglo estructural de los cromosomas durante la meiosis y, d) la ocurrencia de una inserción o una deleción de tamaño considerable como para que altere el tamaño de la banda para ser registrada como un locus diferente (Johnson *et al.*, 2004).

Variabilidad genética

Los estimadores de variabilidad entre los integrantes de cada tipo de cruce, se puede observar en el Cuadro 4.17. Los valores de índice de diversidad genética que se obtuvieron muestran la reducida variabilidad que existe entre las cruces, ya que en términos generales, un índice de diversidad genética cercano a 1 indica que la presencia de la mayoría de las bandas es de naturaleza polimórfica.

Es de interés en este análisis ubicar el polimorfismo generado a partir de una fuente de polen determinada. Las cuatro fuentes de polen aquí analizadas corresponden al tipo PE,RE, No-PE, PE,NoRE y No-PE,NoRE, los dos primeros pertenecientes a la población poliembriónica BAP y los otros dos a la población NAP.

Los valores obtenidos a partir del polimorfismo indican que la mayor variación proviene cuando la fuente de polinizador es de naturaleza PE no

relacionada, con un promedio de 60%. La versión que genera este valor corresponde cuando la hembra pertenece a la población BAP y el macho a la población NAP (PE,NoRE). Los valores intermedios se presentaron cuando la fuente de polen pertenecía a plantas de expresión fenotípica individual, de cualquier población BAP (No-PE,RE) o NAP (No-PE,NoRE), con valores de 49 y 52% respectivamente. Por otro lado, la menor variación se presentó cuando el progenitor masculino era de naturaleza PE perteneciente a la población BAP, con un promedio de 45%, y más aún cuando las hembras pertenecían a la misma población, situando a esta combinación como una de las menos variables, debido a que los progenitores portan una mayor cantidad de genes en común. En un estudio realizado por Osipova *et al.* (2003), utilizaron marcadores moleculares ISSR y RAPD para analizar la diversidad en plantas regeneradoras a partir de cultivo de callos de una línea de maíz, mostrando diferencia entre ellos y la línea original, variando desde 6.5 hasta 23%, este resultado sugieren que los obtenidos en el presente estudio indican que los genotipos se encuentran cercanamente relacionados.

En el estudio realizado por Valdés-Monsivais *et al.* (2012), donde utilizando la técnica AFLP's y poblaciones de maíces poliembriónicos BAP y NAP, se determinó una diversidad genética entre 29 a 53%, valores que no superan al valor más elevado obtenido en este análisis cuando el progenitor masculino es de naturaleza PE no relacionada (PE,NoRE).

Cuadro 4.17 Estimadores de variabilidad genética.

Tipo de Cruza		Parcela	Porcentaje de polimorfismo	Diversidad genética	Heterocigosis insesgada de Nei	Promedio de alelos	Número efectivo de alelos
PE,RE	x PE,NoRE	24	61.43	0.21	0.22	1.61	1.33
PE,RE	x PE,NoRE	25	61.43	0.20	0.21	1.61	1.32
No-PE,RE	x PE,NoRE	33	55.71	0.18	0.20	1.56	1.30
No-PE,RE	x PE,NoRE	34	62.86	0.22	0.24	1.63	1.37
PE,RE	x No-PE,NoRE	26	45.71	0.16	0.17	1.46	1.25
No-PE,RE	x No-PE,NoRE	35	58.57	0.20	0.21	1.59	1.33
PE,RE	x No-PE,RE	23	50.00	0.17	0.18	1.50	1.28
PE,NoRE	x No-PE,RE	6	58.57	0.20	0.22	1.59	1.34
No-PE,RE	x No-PE,RE	32	47.14	0.16	0.17	1.47	1.25
No-PE,NoRE	x No-PE,RE	14	40.00	0.15	0.16	1.40	1.26
PE,RE	x PE,RE	21	41.43	0.15	0.16	1.41	1.24
PE,NoRE	x PE,RE	4	52.86	0.18	0.20	1.53	1.30
No-PE,RE	x PE,RE	31	37.14	0.14	0.15	1.37	1.24
No-PE,NoRE	x PE,RE	13	48.57	0.18	0.19	1.49	1.30

Como se puede observar, esta discrepancia pudiera ser debida al tipo de estructuras genéticas sobre las cuales se realizó el análisis, ya que en el presente se estudian sólo cuatro familias específicas, emparentadas o no, mientras que en Valdés-Monsivais *et al.* (2012), los genotipos BAP y NAP utilizados fueron líneas experimentales.

Frankham *et al.*, (2002) señalan que el número promedio de alelos por locus también conocida como diversidad alelo, es un parámetro importante de la diversidad genética, y el número efectivo de alelos también se puede utilizar como un indicador de la variación (Frankham *et al.*, 2002). El número reducido presentados en estos dos parámetros indican que el polimorfismo y la diversidad genética no es tan abundante y provoca muy poca variación, esto puede ser debido a que las poblaciones BAP y NAP parten de una base genética en común (Espinoza *et al.*, 1998), y que para mantener la alta frecuencia de la PEm se ha tenido que utilizar la recombinación de genotipos relacionados, transmitiendo genes ligados a este fenómeno.

Las tres fuentes de polen (PE,NoRE, No-PE,NoRE y No-PE,RE) que presentaron entre valores intermedios y altos de polimorfismo, fueron en las que se observó parcelas con una distancia genética muy estrecha, entre dos plantas poliembriónicas provenientes de una misma semilla. Las parcelas mencionadas corresponden a, No-PE,RE x PE,NoRE (Parcela: 34), PE,RE x

No-PE, NoRE (Parcela: 26) y PE, NoRE x No-PE, RE (Parcela: 6), y cada una de ellas presentan una morfología compuesta por un mesocotilo y una radícula.

Los valores de las distancias genéticas se observan en el Cuadro 4.18. Cada parcela está conformada por siete integrantes, dos progenitores (PRO_H) y (PRO_M) Hembra y Macho, una planta individual hermana (PI), dos macetas de plantas hermanas PEm etiquetadas de la siguiente manera, maceta uno PE(1)1_2 y PE(1)2_2 y maceta dos PE(2)1_2 y PE(2)2_2 de plantas poliembriónicas de maíz.

Las distancias genéticas de la parcela 34 y 6, versión directa y recíproca respectivamente, presentaron una diversidad genética semejante, indicando con esto un grado de parecido y que no existe alguna obstrucción en el comportamiento por efecto de la dirección de la cruce. En una de las comparaciones, un par de plantas hermanas de naturaleza y expresión PEm, [PE(2) 1_2 vs PE(2) 2_2] y [PE(1) 1_2 vs PE(1) 2_2], correspondiente a cada cruce, se observó una distancia genética de 0.03.

Cuadro 4.18 Cuadro de distancias genéticas de las cruzas de genotipos poliembriónicos.

	PE,RE x PE,RE Parcela 21	No-PE,RE PE,RE Parcela 31	PE,NoRE x PE,RE Parcela 4	No-PE,NoRE x PE,RE Parcela 13	PE,NoRE x No-PE,RE Parcela 6	No-PE,NoRE x No,PE,RE Parcela 14
PI vs PE(1) 1_2	0.11	0.07	0.19	0.17	0.26	0.15
PI vs PE(1) 2_2	0.17	0.14	0.21	0.21	0.26	0.11
PI vs PE(2) 1_2	0.14	0.15	0.21	0.24	0.26	0.14
PI vs PE(2) 2_2	0.14	0.21	0.22	0.22	0.19	0.15
PE(1) 1_2 vs PE(1) 2_2	0.12	0.15	0.11	0.22	0.03	0.07
PE(1) 1_2 vs PE(2) 1_2	0.15	0.11	0.14	0.09	0.26	0.14
PE(1) 1_2 vs PE(2) 2_2	0.15	0.15	0.19	0.11	0.22	0.15
PE(1) 2_2 vs PE(2) 1_2	0.06	0.14	0.15	0.19	0.22	0.15
PE(1) 2_2 vs PE(2) 2_2	0.12	0.15	0.21	0.28	0.19	0.17
PE(2) 1_2 vs PE(2) 2_2	0.09	0.07	0.04	0.14	0.19	0.11
PRO_H vs PI	0.28	0.24	0.17	0.32	0.38	0.17
PRO_H vs PE(1) 1_2	0.38	0.19	0.28	0.26	0.22	0.28
PRO_H vs PE(1) 2_2	0.26	0.12	0.30	0.30	0.22	0.30
PRO_H vs PE(2) 1_2	0.22	0.14	0.22	0.26	0.34	0.19
PRO_H vs PE(2) 2_2	0.30	0.12	0.24	0.24	0.26	0.24
PRO_M vs PI	0.30	0.34	0.36	0.22	0.40	0.30
PRO_M vs PE(1) 1_2	0.24	0.32	0.44	0.32	0.36	0.30
PRO_M vs PE(1) 2_2	0.17	0.21	0.51	0.40	0.32	0.36
PRO_M vs PE(2) 1_2	0.14	0.30	0.34	0.28	0.49	0.24
PRO_M vs PE(2) 2_2	0.21	0.28	0.36	0.26	0.32	0.30
PRO_M vs PRO_H	0.28	0.17	0.26	0.24	0.36	0.17

PI, Planta Individual; PE(1) 1_2, Planta PE 1; PE (1) 2_2, Planta PE 2; PE(2) 1_2, Planta PE 1; PE (2) 2_2, Planta PE 2.

..... continúa Cuadro 4.18

	No-PE,RE No-PE,RE Parcela 32	PE,RE x PE,NoRE Parcela	No-PE,RE x PE,NoRE Parcela 33	No-PE,RE PE,NoRE Parcela 34	PE,RE x No-PE,NoRE Parcela 26	No-PE,RE x No-PE,NoRE Parcela 35
PI vs PE(1) 1_2	0.22	0.40	0.21	0.14	0.19	0.32
PI vs PE(1) 2_2	0.24	0.21	0.17	0.28	0.19	0.11
PI vs PE(2) 1_2	0.12	0.26	0.17	0.28	0.19	0.15
PI vs PE(2) 2_2	0.11	0.14	0.22	0.28	0.19	0.11
PE(1) 1_2 vs PE(1) 2_2	0.17	0.19	0.22	0.12	0.06	0.22
PE(1) 1_2 vs PE(2) 1_2	0.26	0.14	0.22	0.34	0.12	0.40
PE(1) 1_2 vs PE(2) 2_2	0.28	0.38	0.24	0.34	0.12	0.19
PE(1) 2_2 vs PE(2) 1_2	0.28	0.14	0.12	0.34	0.15	0.24
PE(1) 2_2 vs PE(2) 2_2	0.30	0.19	0.17	0.38	0.15	0.12
PE(2) 1_2 vs PE(2) 2_2	0.04	0.24	0.14	0.03	0.00	0.17
PRO_H vs PI	0.21	0.22	0.28	0.15	0.28	0.15
PRO_H vs PE(1) 1_2	0.24	0.40	0.26	0.14	0.28	0.49
PRO_H vs PE(1) 2_2	0.30	0.21	0.19	0.28	0.28	0.24
PRO_H vs PE(2) 1_2	0.17	0.30	0.22	0.28	0.24	0.12
PRO_H vs PE(2) 2_2	0.22	0.21	0.21	0.28	0.24	0.24
PRO_M vs PI	0.11	0.34	0.36	0.49	0.30	0.40
PRO_M vs PE(1) 1_2	0.17	0.58	0.42	0.46	0.30	0.51
PRO_M vs PE(1) 2_2	0.26	0.40	0.26	0.56	0.34	0.38
PRO_M vs PE(2) 1_2	0.17	0.38	0.30	0.56	0.22	0.40
PRO_M vs PE(2) 2_2	0.15	0.24	0.32	0.51	0.22	0.38
PRO_M vs PRO_H	0.22	0.38	0.42	0.36	0.24	0.40

PI, Planta Individual; PE(1) 1_2, Planta PE 1; PE (1) 2_2, Planta PE 2; PE(2) 1_2, Planta PE 1; PE (2) 2_2, Planta PE 2.

..... continúa Cuadro 4.18

	PE,RE x No-PE,RE (23)	PE,RE x PE,NoRE (25)
PI vs PE(1) 1_2	0.22	0.15
PI vs PE(1) 2_2	0.17	0.26
PI vs PE(2) 1_3	0.12	0.32
PI vs PE(2) 2_3	0.15	0.24
PI vs PE(2) 3_3	0.22	0.36
PE(1) 1_2 vs PE(1) 2_2	0.17	0.12
PE(1) 1_2 vs PE(2) 1_3	0.22	0.14
PE(1) 1_2 vs PE(2) 2_3	0.22	0.14
PE(1) 1_2 vs PE(2) 3_3	0.22	0.21
PE(1) 2_2 vs PE(2) 1_3	0.21	0.11
PE(1) 2_2 vs PE(2) 2_3	0.32	0.11
PE(1) 2_2 vs PE(2) 3_3	0.24	0.11
PE(2) 1_3 vs PE(2) 2_3	0.19	0.15
PE(2) 1_3 vs PE(2) 3_3	0.12	0.22
PRO_H vs PI	0.15	0.36
PRO_H vs PE(1) 1_2	0.15	0.24
PRO_H vs PE(1) 2_2	0.24	0.21
PRO_H vs PE(2) 1_3	0.19	0.26
PRO_H vs PE(2) 2_3	0.19	0.30
PRO_H vs PE(2) 3_3	0.26	0.15
PRO_M vs PI	0.19	0.56
PRO_M vs PE(1) 1_2	0.22	0.46
PRO_M vs PE(1) 2_2	0.28	0.38
PRO_M vs PE(2) 1_3	0.26	0.44
PRO_M vs PE(2) 2_3	0.19	0.36
PRO_M vs PE(2) 3_3	0.38	0.36
PRO_M vs PRO_H	0.22	0.40

PI, Planta Individual; PE(1) 1_2, Planta PE 1; PE (1) 2_2, Planta PE 2; PE(2) 1_3, Planta PE 1; PE (2) 2_3, Planta PE 2; PE (2) 3_3, Planta PE 3.

La parcela 26 presentó valores de índices de variabilidad genética dentro los valores bajos, observándose una distancia genética de 0.00 entre dos plantas hermanas de naturaleza y expresión PE [PE(2) 1_2 vs PE(2) 2_2]. Aunque, la cruza inversa No-PE,RE x PE,RE (Parcela: 31) presenta el valor más en cuanto a diversidad genética 0.14, no se observa ningún tipo de similitud estrecha entre los individuos que la integran, que puede ser debido a efecto del muestreo.

En base a los resultados obtenidos, las menores distancias genéticas principalmente se presentaron entre el par de hermanas poliembriónicas provenientes de una misma semilla esto independientemente del tipo de polinizador (PE,RE, No-PE,RE, PE,NoRE y No-PE,NoRE), siendo del orden de 0.00 a 0.03.

En un estudio realizado por Nkongolo *et al.* (2011), utilizaron variedades de maíz de alta calidad proteica (QPM) y maíces normales, mediante la técnica ISSR's, determinaron en dos variedades con el mismo origen una distancia genética de 0.098, revelando una estrecha base genética. Una de las desventajas de la utilización de los ISSR es que fragmentos del mismo tamaño y movilidad, pueden proceder de regiones no homologas y así conducir a una mala interpretación de la estimación de similitud genética (Agrawal y Shrivastava, 2014). De acuerdo a esto, la presencia de una distancia genética estrecha entre individuos provenientes de una misma semilla indica la

existencia una alta relación, pero no lo suficiente para proponer que base por base sean idénticas y considerar que tienen un mismo origen.

A continuación, se muestran los dendrogramas y los árboles de recorrido mínimo (ARM) que apoyan el análisis de distancias genéticas, construidos teniendo como criterio de selección un mayor coeficiente de correlación cofenética, indicando que las distancias en el mejor dendrograma son las distancias verdaderas entre los individuos (Balzarini *et al.*, 2010).

PE,RE x No-PE,NoRE (Parcela: 26)

Los perfiles moleculares de los individuos PE(2)1_2 y PE(2)2_2 de la parcela 26 se unen con una distancia de cero, uniéndose en orden decreciente de parecido los perfiles PE(1)1_2, PE(1)2_2 y PI. Evidenciando que están estrechamente relacionadas, debido a que comparten la mayoría de sus genes por su condición emparentada. Los perfiles de los individuos PRO_H y PRO_M se presentan como los más diferentes, ya que se unen a una mayor distancia (Figura 4.6). Si bien el biplot explicó un bajo porcentaje de la variabilidad genética (54.8 %), la misma no se debe confundirse con la variación total, ya que el biplot sólo incluye la variación debida a los individuos y a la interacción “genotipos x marcadores” (Yan *et al.*, 2000).

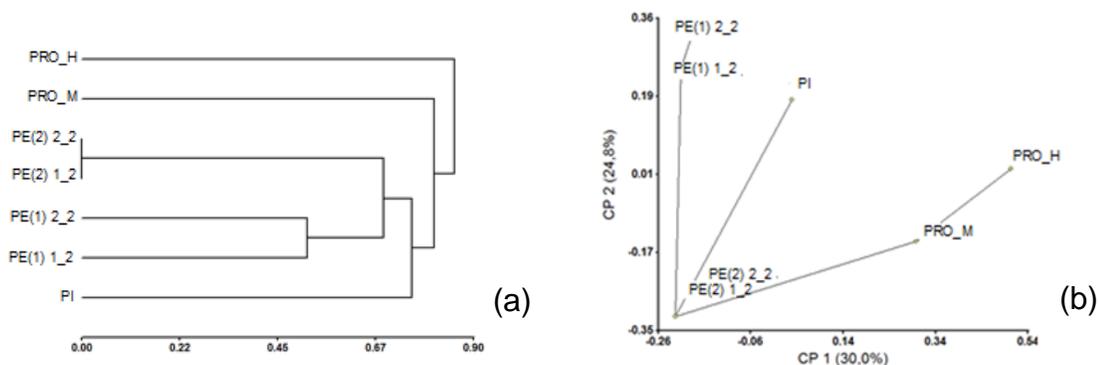


Figura 4.6 Dendrograma (a) y ARM a partir de coordenadas principales (CP1 y CP2) se superpone el árbol de recorrido mínimo (b), ambos a partir de la matriz de distancia basada en el índice de distancia Anderberg de la cruz PE,RE x No-PE,NoRE.

PE,NoRE x No-PE,RE (Parcela: 6)

Los perfiles moleculares de los individuos de la parcela 6, presentan una distancia genético de 0.03 entre plantas poliembriónicas hermanas PE(1)1_2 y PE(1)2_2 formado un grupo. A ese grupo se unen, en orden decreciente de parecido los perfiles PRO_M, PE(2)2_2 y PE(2)1_2. Los perfiles de los individuos PI y PRO_H se presentan como los más diferentes, ya que se unen a la mayor distancia. En el ARM se observa al igual que en el dendrograma una distancia reducida entre las hermanas poliembriónicas PE(1). Con el análisis de ARM se puede confirmar que verdaderamente existe una relación estrecha entre los individuos (Balzarini *et al.*, 2010) (Figura 4.7). El biplot explicó un bajo porcentaje de la variabilidad genética (46.2%).

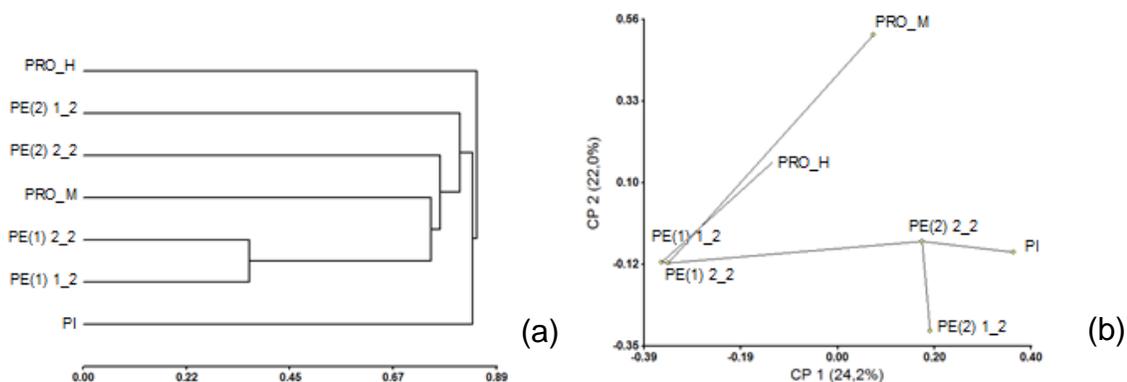


Figura 4.7 Dendrograma (a) y ARM a partir de coordenadas principales (CP1 y CP2) se superpone el árbol de recorrido mínimo (b), ambos a partir de la matriz de distancia basada en el índice de distancia Anderberg de la cruce PE, NoRE x No-PE, RE .

No-PE x PE, NoRE (Parcela: 34)

Los perfiles moleculares de las plantas poliembriónicas hermanas PE(2)1_2 y PE(2)2_2 se unen a distancia de 0.03 menor que el resto de los individuos. A ese grupo se unen en orden decreciente de parecido los perfiles PE(1)2_2, PI, PE(1)1_2 y PRO_H. El perfil del individuo PRO_M presenta diferente, ya que se une a la mayor distancia (Figura 4.8). Con el uso del análisis de las distancias realizado con la técnica de árbol de recorrido mínimo y los resultados del dendrograma se puede determinar que existe una gran similitud genética entre las plantas poliembriónicas procedentes de una misma semilla en función del patrón de bandeo presentado.

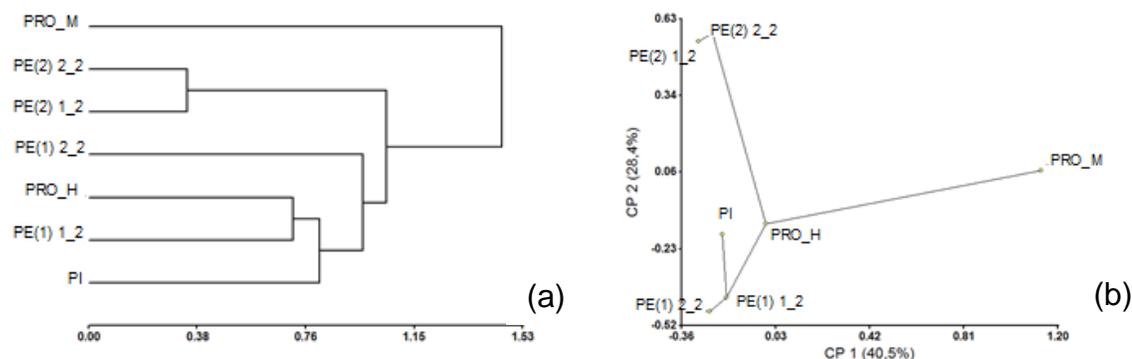


Figura 4.8 Dendrograma (a) y ARM a partir de coordenadas principales (CP1 y CP2) se superpone el árbol de recorrido mínimo (b), ambos a partir de la matriz de distancia basada en el índice de distancia Euclídea de la crucea No-PE,RE x PE,NoRE .

Análisis de la Prueba Exacta de Fisher

Los resultados del análisis de asociación de locus con respecto a la dirección de la crucea y del tipo de progenitores se pueden observar en los Cuadros 4.19 y 4.20, respectivamente. En el grupo II, donde uno de los progenitores es PE y el otro individual de naturaleza PE, excluyendo a la población Tuxpeño HOC y la línea endogámica AN-Tep. 3, existen tres locus donde la presencia o ausencia puede putativamente estar influenciada por la dirección de la crucea.

En el tipo de crucea PE,RE x PE,NoRE, se observó que el locus 341 del ISSR1 está correlacionado con la dirección de la crucea.

Cuadro 4.19 Tabla de contingencia de la dirección de la cruce contra marcador ISSR

Locus	Marcador	Grupo o tipo de cruce	Dirección	Presencia	Ausencia	valor-p
285	ISSR 11	II	Directa	2	24	0.000427
			Recíproca	7	3	
341	ISSR 1	II	Directa	3	23	1.13E-06
			Recíproca	10	0	
477	ISSR 1	II	Directa	2	24	5.86E-05
			Recíproca	8	2	
341	ISSR 1	PE,RE X	Directa	0	11	0.000229
		PE,NoRE	Recíproca	5	1	

PE: Poliembriónica, PE,NoRE: Poliembriónica No relacionada.

Mediante una prueba de la bondad de ajuste de la X^2 , tres de los cuatro locus que presentaron asociación, difieren significativamente ($p < 0.05$) de la relación de segregación esperada de 1:1, locus dominante (Semagn *et al.*, 2006). El locus 341 del ISSR1 es el único locus (PE,RE x PE,NoRE), que estadísticamente puede tener una relación tentativa de la expresión en la progenie, teniendo a consideración la dirección de la cruce. Este hecho, no está relacionado con la expresión de la poliembriónía, si no exclusivamente con el efecto recíproco que presentan las cruces. El resto de los locus, 285 ISSR11, 341 ISSR1 y 477 ISSR1 fueron excluidos debido a la distorsión de la segregación (1:1) hacia la ausencia de bandas frente a las presentes que muestran.

En el mismo contexto mediante el análisis de la X^2 , los resultados donde se toma en cuenta el fenotipo poliembriónico y No-poliembriónico (Cuadro

4.20), solo un locus de los 70 analizados, sugiere que puede estar relacionado tentativamente con la expresión de genes ligados con PEm.

Cuadro 4.20 Tabla de contingencia de la poliembrionía contra Marcador ISSR.

Locus	Marcador	Grupo	Tipo de cruce	Presencia	Ausencia	valor-p
363	ISSR 11	II	PE	18	3	7.89E-07
			No-PE	3	2	

PE: Poliembrionía, NOPE: no poliembrionía.

En un estudio anteriormente realizado por Cruz-Requena *et al.* (2014) utilizaron una población segregante F_2 de naturaleza poliembrionía mediante AFLP, encontrando más de un loci asociado con la poliembrionía en maíz, pero en este estudio fue realizado a través de marcadores moleculares ISSR utilizando integrantes de familias integradas por una planta madre (M), hija planta individual (PI) e hijas plantas poliembrionías (PE12 y PE22), encontrando dos locus asociados, uno a la dirección de la cruce y el otro con la expresión de la PEm.

Análisis de asociación de la prueba X^2 tabla de contingencia

A partir de las frecuencias poliembrionías, a continuación se desarrollaron una serie de asociaciones estadísticas de interés, evaluando el nivel de asociación por medio de la prueba X^2 , planteando como hipótesis nula el hecho de que las variables no están asociadas o son independientes, lo que significa que los valores no están influenciados por el tipo o nivel que la otra toma. Como

un dato presuntivo en el análisis de asociación entre Directas vs Recíproca se obtuvo un p -valor igual a 0.0004998 y un $X^2 = 26.1$, indicando tentativamente que la expresión de la PEm está influenciado por la dirección de la cruce

En el mismo orden de ideas, en el Cuadro 4.21 se puede observar que, de acuerdo a los valores obtenidos, ningún tipo de cruce muestra alguna asociación en la presencia de plantas múltiples. Este fenómeno fue analizado por Pliego (2014), donde determino en base a pruebas de X^2 , que la discrepancia de los valores entre grupos segregantes F_2 directa y recíproca, es solo una circunstancia experimental y no se debe a efectos genéticos, como el efecto maternal propuesto por Musito *et al.* (2008).

Cuadro 4.21 Tabla de contingencia de la prueba de X^2 de los grupos directa y recíproca.

Tipo de cruce	Directa		Recíproca		X^2	p -valor
	PE	No-PE	PE	No-PE		
No-PE,RE X PE,RE	46	29	34	36	2.3843	0.135
No-PE,RE X PE,NoRE [‡]	103	52	72	84	13.0178	0.001
NoPE,RE X NoPE,NoRE [‡]	51	23	67	46	1.7799	0.224
PE,RE X No-PE,NoRE [‡]	46	29	34	36	2.3843	0.146
PE,RE X PE,NoRE [‡]	93	13	57	16	2.9674	0.096
PE,RE X No-PE,RE	49	22	96	48	0.1193	0.765

[‡]: Polinizador de la población NAP.

Frecuencia de la poliembrionía en los diferentes cruzamientos

Las proporciones de PEm en las progenies de los diversos cruzamientos aparecen en el Cuadro 4.22. Como puede observarse, en todo caso fue posible notar la manifestación de poliembrionía, con excepción donde uno de los progenitores fue exótico a los genotipos PEm, es decir, materiales genotípicamente ajenos, representantes del maíz común, regularmente No-PEm.

Cuadro 4.22. Valores de X^2 de la prueba de la bondad de ajuste y de p -valor a partir de cruza de maíces poliembriónicos con maíces ajenos a la poliembrionía.

Parcela	Cruza	Tipo de cruza	%PEm	X^2	p -valor
1	C1 (PE) x Tuxp HOC	PE,NoRE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
2	C2 (PE) x Tuxp HOC	PE,NoRE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
3	C1 (PE) x AN-Tep.3	PE,NoRE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
4	C1 (PE) x D (PE)	PE,NoRE*PE,RE	77.3	7.56	0.006*
5	C1 (PE) x D (Ind)	PE,NoRE*No-PE,RE	68.6	1.51	0.22
6	C2 (PE) x D (Ind)	PE,NoRE*No-PE,RE	23.1	51.72	6.39E-13*
7	C1 (PE) x C (Ind)	PE*No-PE,RE	62.1	0.001	0.975
8	C2 (PE) x C (Ind)	PE*No-PE,RE	79.0	8.12	0.004*
9	C1 (Ind) x Tuxp HOC	No-PE,NORE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
10	C2 (Ind) x Tuxp HOC	No-PE,NORE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
11	C1 (Ind) x AN-Tep.3	No-PE,NORE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
12	C2 (Ind) x AN-Tep.3	No-PE,NORE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
13	C1 (Ind) x D (PE)	No-PE,NoRE*PE,RE	49.3	4.67	0.031*
14	C1 (Ind) x D (Ind)	No-PE,NoRE*NoPE,RE	57.7	0.21	0.649
15	C2 (Ind) x D (Ind)	No-PE,NoRE*NoPE,RE	60.3	0.09	0.764
16	C1 (Ind) x C (PE)	No-PE*PE,RE	52.8	2.52	0.112
17	C2 (Ind) x C (PE)	No-PE*PE,RE	66.7	0.55	0.456
18	D1 (PE) x Tuxp HOC	PE,RE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
19	D2 (PE) x Tuxp HOC	PE,RE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
20	D2 (PE) x AN-Tep.3	PE,RE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
21	D1 (PE) x D (PE)	PE,RE*PE,RE	76.8	6.55	0.010*
22	D2 (PE) x D (PE)	PE,RE*PE,RE	72.8	3.20	0.073
23	D1 (PE) x D (Ind)	PE,RE*No-PE,RE	67.7	0.79	0.374
24	D1 (PE) x C (PE)	PE,RE*PE,NoRE	89.4	23.04	1.59E-06*

25	D2 (PE) x C (PE)	PE,RE*PE,NoRE	83.4	6.04	0.014*
26	D2 (PE) x C (Ind)	PE,RE*No-PE,NoRE	61.1	0.04	0.835
27	D2 (Ind) x Tuxp HOC	No-PE,RE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
28	D1 (Ind) x AN-Tep.3	No-PE,RE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
29	D2 (Ind) x AN-Tep.3	No-PE,RE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
30	D1 (Ind) x D (PE)	No-PE,RE*PE,RE	60.9	0.13	0.722
31	D2 (Ind) x D (PE)	No-PE,RE*PE,RE	73.7	3.53	0.050*
32	D1 (Ind) x D (Ind)	No-PE,RE*No-PE,RE	70.3	1.67	0.196
33	D1 (Ind) x C (PE)	No-PE,RE*PE,NoRE	59.9	0.13	0.722
34	D2 (Ind) x C (PE)	No-PE,RE*PE,NoRE	73.4	4.02	0.045*
35	D1 (Ind) x C (Ind)	No-PE,RE*No-PE,NoRE	68.4	0.81	0.368
36	Tuxp HOC x D (PE)	No-PE,NoRE*PE,RE	0.0	ND	<2.2E-16*
37	Tuxp HOC x D (Ind)	No-PE,NoRE*No-PE,RE	0.0	ND	<2.2E-16*
38	Tuxp HOC x C (PE)	No-PE,NoRE*PE,No-RE	0.0	ND	<2.2E-16*
39	Tuxp HOC x C (Ind)	No-PE,NoRE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*
40	AN-Tep.3 x D (PE)	No-PE,NoRE*PE,RE	0.0	ND	<2.2E-16*
41	AN-Tep.3 x D (Ind)	No-PE,NoRE*No-PE,RE	0.0	ND	<2.2E-16*
42	AN-Tep.3 x C (PE)	No-PE,NoRE*PE,No-RE	0.0	ND	<2.2E-16*
43	AN-Tep.3 x C (Ind)	No-PE,NoRE*No-PE,NORE	0.0	ND	<2.2E-16*

* Valores significativos.

Un total de nueve de cuarenta y tres cruzas se desvían de la hipótesis planteada 6:10 (individuales:poliembriónicas), cinco de las nueve superan a la frecuencia esperada. Desde el punto de vista de producción de semilla, que el material poliembriónico cuente con fenómenos que obstaculizan la expresión, como la penetrancia incompleta, implica una reducción en los niveles de rendimiento, ya que se esperarían progenies 100% PEm.

Por otro lado, trece parcelas fueron las que presentaron frecuencias superiores a 65%, valor que corresponde a la frecuencia superior de referencia [Rebolloza *et al.*, 2011; (Espinoza *et al.*, 2012; Espinoza *et al.*, 1998)]. La mayor frecuencia se presentó en las cruzas de tipo (PE,RE x PE,RE), (PE,NoRE x

PE,RE) y (PE,RE x PE,NoRE) con valores superiores a 75%, evidenciando que con la presencia de dos progenitores de expresión PE aumenta la frecuencia de esta condición, superando promedios del 75% como lo plantea Espinoza y Vega (2003). Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Villareal (2007), donde al igual que aquí el valor más alto de la frecuencia poliembriónica lo presentó la cruce tipo PE,NoRE x PE,RE, ambos progenitores pertenecen a poblaciones no relacionadas pero de expresión doble, confirmando así el supuesto de la complementariedad de genes para la poliembrionía. En un estudio realizado por Firetti *et al.* (2013), en el género *Anemopaegma* documentaron la presencia de una mayor frecuencia plantas poliembriónicas en progenie derivadas de polinización cruzada que en las provenientes de la autopolinización. En base a esto, se puede destacar que entre más genes en común posean las plantas progenitoras de expresión poliembriónica, menor es la presencia de plantas múltiples, pudiendo ser provocada por el aumento en la condición homocigótica.

En base a estos resultados, se puede concluir que la mayor frecuencia de plantas poliembriónicas se presenta cuando los dos progenitores son de diferentes poblaciones poliembriónicas (BAP y NAP), y además que esta versión es la que generó los valores más altos de polimorfismo. Estos resultados, pudieran estar relacionados con el vigor híbrido que presentan las plantas alógamas, grupo al que pertenece el maíz, proporcionando una mayor energía para que los embriones adicionales se puedan desarrollar, y resultaría interesante comprobar esta hipótesis.

Para corroborar el fenómeno de la penetrancia incompleta en maíces poliembriónicos propuesta por Rebolloza *et al.* (2012), se analizó las progenies generadas a partir progenitores con expresión del prototipo de maíz normal (No-PE), de naturaleza poliembriónica y genotipos testigos ajenos a la poliembriónia (AN-Tep.3 o Tuxpeño-HOC). De acuerdo a los resultados obtenidos, cuando se cruzan dos plantas individuales y al menos uno es ajeno a la poliembriónia, el 100% de la progenie generada es de expresión fenotípica individual, siendo claro esto debido a que el control genético de esta PEm es por dos loci en interacción epistática de recesividad duplicada, donde basta la presencia de un alelo dominante de cualquiera de ellos para expresar la condición normal de plántula.

Por otro lado, la progenie esperada de dos plantas poliembriónicas de expresión fenotípica individual (No-PE) deberían ser 100% plantas poliembriónicas, esto debido al tipo de herencia (doble recesiva), situación que no sucede, debido a que la frecuencia de la poliembriónia en la progenie presentó valores de 57 a 70%, corroborando de esta forma la presencia del fenómeno de la penetrancia.

En base a estos datos se reafirma el fenómeno de la penetrancia incompleta propuesta por Rebolloza *et al.* (2011) donde indica que esta se encuentra en valores de 33% para los casos estudiados para ese carácter.

Como en el apartado del objetivo (1), el sesgo observado podría ser debido a las dos causas posibles anteriormente mencionadas.

V. CONCLUSIONES

Con base en el desarrollo experimental y resultados en este tema, se concluye lo siguiente:

1. La condición gemelar de la población de maíz UA-IMM-BAP, de alta frecuencia poliembriónica, con estructuras que sólo compartan el nudo escutelar, con radículas y mesocotilos separadas se presentó menor a 1%.
2. La utilización de regiones hipervariables ITS no es evidencia suficiente para avalar una identidad genética idéntica entre la planta madre y una de las hijas PEm, como lo propuesto en el trabajo realizado por Avendaño (2012).
3. La validación de la similitud del 100% en algunas de las comparaciones de secuencias de bases de madre-hijas, individuales y PEm, indican que las plantas fueron generadas a partir de la reproducción del tipo sexual, hecho que se corrobora con los análisis moleculares de la región IGS, SSR e ISSR, por lo que es improbable que la condición se deba a una probable relación entre la poliembrionía y apomixis.

4. Ligado a lo anterior, se pudo determinar la existencia de la variación genética generada, a partir de la comparación de genotipos entre los integrantes de una familia, donde la relación genética que guardan las plantas poliembriónicas generadas a partir de una misma semilla es estrecha pero no idéntica.
5. De manera preliminar, puede establecerse que un locus está asociado a la dirección de cruce (sea directa o recíproca) en cruzamientos entre maíces poliembriónicos.
6. Además, un locus tentativo fue asociado en maíces poliembriónicos con la expresión de genes ligados con PEm.
7. Se pudo corroborar que el mayor porcentaje de plantas poliembriónicas se obtienen a partir de la recombinación de dos poblaciones diferentes, BAP como hembra y NAP como polinizador, ambas de expresión poliembriónica.

VI. RESUMEN

El maíz es una de las especies que cuenta con una gran diversidad genética, generada a partir de la mutación, selección, y recombinación. Diversidad que resulta de gran interés y que han permitido la creación de variedades que reúnen las características más aprovechables desde un punto de vista productivo. Una de las características del maíz que puede ser utilizada para el diseño de nuevas variedades es la poliembrionía (PEm), dada su influencia en la calidad del grano, mayor contenido de ácidos grasos, triptófano y lisina, así como el potencial de rendimiento por la condición de generar múltiples plantas por semilla.

En el presente trabajo de investigación se propuso validar la similaridad de secuencias nucleótidas, con el propósito de corroborar y evidenciar la relación entre los fenómenos reproductivos poliembrionía y apomixis en familias PEm, y corroborar fenómenos ligados, mediante la utilización de marcadores moleculares que se basan en el grado de variación, como lo son las regiones hiper-variables (ITS e IGS), microsatélites (SSR) e inter-microsatélite (ISSR).

El análisis de identificación de secuencias polimórficas y monomórficas de regiones hiper-variables del ADN de maíz poliembriónico, se realizó en una

selección de tres familias (D-S₁-03, D-S₁-05 y D-PL-13) de la población UAAAN-IMM-BAP (en breve BAP o D). Además, se incluyó ADN de familias (D-S₁-03* y D-S₁-07*) que corresponden a muestras-remanente, extraído por Avendaño (2012). Las familias D-S₁-03 y D-S₁-03* tienen en común a la madre. Cada familia estuvo integrada por la madre y tres hijas, una de tipo individual y dos hermanas PEm, germinadas en la misma semilla. Las familias utilizadas para determinar homocigosis y heterocigosis, y variación genética fueron D-S₁-03, D-S₁-03*, D-S₁-07* y D-PL-13. Para la determinación de polimorfismo en la expresión de la PEm por el efecto del polen y otros fenómenos ligados, se utilizó progenies de dieciséis cruzas directas y recíprocas de las poblaciones BAP o D, y UAAAN-IMM-NAP (en breve NAP o C) y dos materiales ajenos a estas poblaciones.

El análisis molecular de la validación de semejanza de secuencias entre madre e hija PEm, y la probable relación entre poliembrionía y apomixis en familias PEm, se basó en 1) la comparación de secuencias nucleotídicas, 2) comparación de clase genotípica (homocigoto y heterocigoto), 3) determinación de estimadores de variabilidad genética, 4) análisis de variación genética, 5) análisis de coordenadas principales, y 6) dendrograma. Para el efecto del polen a nivel polimorfismo en la expresión de la PEm, se determinaron estimadores de variabilidad, ratificaron casos particulares de estrecha relación mediante árboles de recorrido mínimo y dendrogramas. También, se realizó análisis de asociación de locus mediante la prueba exacta de Fisher, dependiendo de la dirección de la cruce y expresión fenotípica de la progenie, PEm y No-PEm. A

nivel frecuencias del carácter PEm, se realizó un análisis de asociación a la expresión de la PEm dependiendo de la dirección de la cruce con la prueba de X^2 tabla de contingencia. Se corroboraron proporciones de frecuencias PEm utilizando la prueba de X^2 de bondad de ajuste y se confirmó el fenómeno de la penetrancia incompleta, asociado a esta poliembrionía.

Las frecuencias de sitios invariables en las comparaciones pares entre miembros de cada familia analizada para la región ITS mostraron valores de hasta 100% en las seis comparaciones, donde la familia D-S₁-07* (96 a 99%) y D-PL-13 (99 a 100%) presentaron los valores más altos. La familia que presentó mayor variabilidad fue la D-S₁-05. En las familias D-S₁-03, D-S₁-03* y D-S₁-07*, el mayor porcentaje de similaridad fue para el par de plantas hermanas PEm. Por otro lado, el análisis de comparación de secuencias de la región IGS discrepan de los obtenidos en la región ITS en las familias D-S₁-07* (46 a 66%) y D-PL-13 (48 a 67%).

Las familias que presentaron el valor más elevado de similaridad de loci fueron D-S₁-03, D-S₁-03* y D-PL-13. En, la primera, la planta madre y la hija individual presentaron 83% de loci homocigotos, mientras que en la segunda las tres plantas hijas (PI, PEm1 y PEm2) presentaron 100% de loci homocigóticos y la madre 83%. De manera análoga, la familia D-PL-13 presentó una alta similaridad entre las dos plantas poliembriónicas, con un porcentaje de loci homocigóticos de 88% y la madre de sólo 63%.

El análisis de varianza molecular detectó diferencias significativas ($p \leq 0.0075$) entre los cinco grupos analizados, pero las diferencias fueron aún mayores dentro de cada grupo ($p \leq 0.0025$). El ordenamiento del análisis de coordenadas principales consistió en la formación de cuatro grupos. Se desprende de estos resultados que las familias que tuvieron una distancia más ordenada fueron D-S₁-03 y D-S₁-07.

El dendrograma obtenido para identificar el agrupamiento de familias indicó que la familia D-S₁-03 presentó un sub-grupo constituido por las dos plantas hermanas poliembriónicas (D-S₁-03 PEm1 y D-S₁-03 PEm2), con una distancia taxonómica de 0.74; de manera similar, la familias D-S₁-07 formó otro subgrupo con las dos plantas hermanas poliembriónicas misma familia (D-S₁-07 PEm1* y D-S₁-07 PEm2*), con una distancia de 0.50.

Los estimadores de variabilidad muestran poca variación entre las cruzas analizadas. El mayor polimorfismo promedio y la mayor frecuencia de plantas poliembriónicas se presentó cuando ambos progenitores PE son de diferente población, NAP como polinizador y BAP como hembra, y la menor variación fue cuando los genotipos pertenecían a BAP.

Se determinaron cuatro tipos de fuentes de polen poliembriónico como sigue: PE,RE, NoPE,RE, PE,NoRE y No-PENoRE. Los polinizadores PE,NoRE, No-PE,NoRE y No-PE,RE, presentaron progenies con una distancia genética de

0.0 y 0.03 entre el par de plantas hermanas PEm. Los dendrogramas y árboles de recorrido mínimo apoyan la relación estrecha de las plantas hermanas PEm.

El análisis de asociación determinó un locus, 341 (ISSR1) correlacionado con la dirección de la cruce sin importar la expresión fenotípica, y el locus 363 ISSR 11, se asocia a la expresión fenotípica PE y No-PE cuando uno de los progenitores es PEm y el otro individual, pero perteneciente a una familia de naturaleza PEm.

La frecuencia de plantas PEm no muestra asociación con respecto a la dirección de la cruce, es decir, que la proporción de casos PEm en casos de segregación obedece sólo al patrón de herencia de la PEm. Por otra parte, cuando se cruzan dos plantas tipificadas como individuales, aunque sean parte de una familia poliembriónica, producen progenie con expresión poliembriónica en proporciones de 57 a 70%, lo cual confirma el fenómeno de la penetrancia incompleta.

A partir de este conjunto de resultados, se concluye lo siguiente: 1) La utilización de regiones hipervariables ITS no son evidencia suficiente para avalar una identidad genética idéntica entre la planta madre y una de las hijas PEm; 2) Los diversos análisis aportaron evidencia para señalar que el tipo de reproducción de las familias analizadas es sexual y que solo existe una relación estrecha y no alguna identidad genética similar entre la planta madre-hija, sea esta individual y/o PEm; 3) La relación genética que guardan las plantas poliembriónicas generadas a partir de una misma semilla es estrecha pero no

idéntica; y 4) desde el punto de vista agronómico, la mejor combinación a favor de una alta frecuencia PEm es entre individuos poliembriónicos, donde la planta hembra provenga de BAP, y el polinizador sea de NAP.

VII. LITERATURA CITADA

- Acquaah, G. 2007. Principles of plant genetics and breeding. John Wiley & Sons. 569 p.
- Agrawal, P.K. and R. Shrivastava. 2014. Molecular Markers. *In: Advances in Biotechnology* . Springer India. P. 25-39.
- Aleza, P., J. Juárez, P. Ollitrault and Navarro, L. 2010. Polyembryony in non-apomictic citrus genotypes. *Annals of botany*. 106(4): 533-545.
- Álvarez, I. and J.F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular phylogenetics and evolution*. 29(3): 417-434.
- Andrade-Rodríguez, M., Villegass-Monter A., Gutiérrez-Espinoza M.A., Carrillo-Castalleda G. and García Velázquez A. 2005. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in Citrus. *Agrociencia*. 39(4): 371-383.
- Asker, S.E. and L. Jerling. 1992. Apomixis in Plants. CRC Press, Boca Raton, Florida. 298 p.
- Aranguren-Méndez, J., J. Jordana and M. Gómez. 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetics Selection Evolution*. 33(4): 433-442.
- Avendaño S., M.C. 2012. Relación entre poliembrionía, apomixis y xenia en maíces poliembriónicos. Trabajo de tesis de maestría en Ciencias en Fitomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah. Mex.
- Baker, H.G. 1960. Apomixis and polyembryony in *Paqaira oleaginea* (Bombacaceae). *American Journal of Botany* 47: 296–302.

- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell and M.J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, p. 247-277.
- Balluerka, N. y A.I. Vergara. 2002. *Diseños de investigación experimental en Psicología*. Madrid: Prentice-Hall.
- Balzarini, M., C. Bruno, A. Peña, I. Teich and J. Di Rienzo. 2010. *Estadística en Biotecnología. Aplicaciones en Info-Gen*. 227 p.
- Batygina, T.B. and G.Y. Vinogradova. 2007. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. *Russian Journal of Developmental Biology*. 38(3): 126-151.
- Batygina, T.B. and J.V. Osadtchiy. 2013. Polyembryony: Twins-The result of vegetative propagation. *The international Journal on Plant Reproductive Biology*. 5: 21-27.
- Beck, J.B., P.J. Alexander, L. Allphin, I.A. Al-Shehbaz., C. Rushworth, C.D. Bailey and M.C. Windham. 2012. Does hybridization drive the transition to asexuality in diploid *Boechera*?. *Evolution*. 66(4): 985-995.
- Blanchard, M.L., J.N. Barney, K.M. Averill, C.L. Mohler and A. DiTommaso. 2010. Does polyembryony confer a competitive advantage to the invasive perennial vine *Vincetoxicum rossicum* (Apocynaceae)?. *American journal of botany*. 97(2): 251-260.
- Buckler, E.S. and T.P. Holtsford. 1996. *Zea* systematics: ribosomal ITS evidence. *Molecular Biology and Evolution*. 13(4): 612-622.
- Carels, N. and G. Bernardi. 2000. Two classes of genes in plants. *Genetics*. 154(4): 1819-1825.
- Carrillo-Castañeda, G., Á. Villegas-Monter, M.A. Gutiérrez-Espinosa, A. García-Velázquez and M. Andrade-Rodríguez. 2005. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. *Agrociencia*. 39(4): 371-383.
- Carvalho, A., H. Guedes-Pinto and J. Lima-Brito. 2011. Intergenic spacer length variants in Old Portuguese bread wheat cultivars. *Journal of genetics*. 90(2): 203-208.

- Castro G., M. 1973. Maíces Superenanos para el Bajío. Boletín técnico Núm. 1. Escuela Superior de Agricultura "Antonio Narro" de la Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila. México. 20 p.
- Castro G., M. 1978. Informe de Avances de Investigación en el mejoramiento Genético de Maíz. Boletín Técnico No. 1 Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista. Saltillo Coahuila, México, p 47.
- 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, Coahuila. México. p 24 – 25
- Chaudhury, A.M., A.M. Koltunow, T. Payne, M. Luo, M.R. Tucker, E.S. Dennis and W.J. Peacock. 2001. Control of early seed development. Annual review of cell and developmental biology. 17: 677–691.
- Cruz-Requena, M., C.N. Aguilar-González, J. Espinoza-Velázquez, M.H. Reyes-Valdés and R. Rodríguez-Herrera. 2014. AFLPs loci associated with polyembryonic maize using selective genotyping analysis. Israel Journal of Plant Sciences, (ahead-of-print), 1-5.
- de Oliveira, A.C., A.N. Garcia, M. Cristofani and M.A. Machado. 2002. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. Euphytica. 128(3): 397-403.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem bull. 19: 11-15.
- Durzan, D. J. 2008. Monozygotic cleavage polyembryogenesis and conifer tree improvement. Cytology and Genetics. 42(3): 159-173.
- Eldenäs, P., A.A. Anderberg and M. Källersjö. 1998. Molecular phylogenetics of the tribe Nuleae s. str. (Asteraceae), based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Plant systematics and evolution. 210(3-4): 159-173.
- Erdelska, O., and Z. Vidovencova. 1992. Cleavage polyembryony in maize. Sexual Plant Reproduction. 5(3): 224-226.
- Erdelska, O. 1996. Polyembryony in maize—histological analysis. Acta Soc. Bot. Pol. 65: 123–125.

- Espinoza, J., C. Vega, E. Navarro y G. Burciaga. 1998. Poliembriónía en maíces de porte normal y enano. *Agronomía Mesoamericana*. 9(2): 83-88.
- Espinoza V., J. y M.C. Vega. 2000. Maíces de alta frecuencia poliembriónica. En: Memoria del XVIII Congreso Nacional de SOMEFI. Irapuato, Guanajuato, México. 15 al 20 de octubre, 2000. P. 106-108.
- Espinoza, J., J. Sánchez y F. Ramírez. 2000. Triploides encontrados en maíces poliembriónicos. *In*: Zavala G, F; R Ortega P; J A Mejía C; I Benitez R; y H. Guillén A (eds). Memorias del XVIII Congreso Nacional de Fitogenética: Notas Científicas. SOMEFI. Chapingo, México. p. 274.
- Espinoza V., J., M.C. Vega S. 2003. Estudios Genéticos Sobre Poliembriónía o Semillas Prolífica. Resultados de Proyectos de Investigación UAAAN-2003 ISBN-968-844-030-2. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 2003.
- Espinoza V., J. y H. de León C. 2005. Apomixis, ¿un fenómeno en proceso de adopción natural en maíz? En: Valdez R., J. 2005. Resultados de proyectos de investigación 2004. p. 245-252. Dirección de investigación, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Espinoza-Velázquez, J., J. Valdés-Reyna, J.M. Alcalá-Rodríguez. 2012. Morfología y anatomía de radículas múltiples en plántulas de maíz derivadas de cariopsis con poliembriónía. *Polibotánica*. 33: 207-221.
- Espinoza V., J, J.M. Alcalá, D. Sámano G., J. Valdez R., H. De León C. y V.M. González V. 2012. Características de maíz en plántulas y su relación con la producción de plantas adultas de maíz involucrando poliembriónía. *In*: M.A. Estrada V. y M.L. Villareal S. (eds) Avances y Resultados de Proyectos de Investigación 2008. Segunda edición. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Dirección de Investigación. Libro electrónico www.uaaan.mx. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 2012.
- Falconer, D.S. and T.F. MacKay. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th edition. Longman Scientific & Technical, Burnt Mill, Harlow, United Kingdom.
- Ferreira, M.E. and D. Grattapaglia. 1998. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análises Genéticas. 2nd edition. Embrapa-Cenargen, Brasília, 220 p.

- Firetti-Leggieri, F., Lohmann, L. G. Alcantara, S. Alcantara, I.R. da Costa, and J. Semir. 2013. Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignoniaceae, Bignoniaceae). *Plant Reproduction*. 26(1): 43-53.
- Frankham, R., J.D. Ballou and D.A. Briscoe. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press. p. 619.
- Gallegos S., J.E. 2007. Estudio cromosómico y de la formación de semilla cuando se obstruye la polinización en maíces. Trabajo de tesis de maestría en Ciencias en Fitomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Ganeshaiyah, K.N., R.U. Shaanker and N.V. Joshi. 1991. Evolution of polyembryony: Consequences to the fitness of mother and offspring. *Journal of Genetics*. 70(2): 103-127.
- Gardes, M., T.J. White, J. Fortin, T.D. Bruns and J.W. Taylor. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany*. 69: 180–190.
- Gardes, M. and T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*. 2(2): 113-118.
- Gómez G., J.R. 1983. Estudio sobre herencia y valor nutritivo de semilla de maíz con doble embrión. *Avances de investigación de maíz*. Dirección de Investigación. Sección maíz. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah. Mex. p. 77.
- González, V., F. Arenal, G. Platas, F. Esteve-Raventós and F. Peláez. 2002. Molecular typing of Spanish species of *Amanita* by restriction analysis of the ITS region of the DNA. *Mycological Research*. 106(08): 903-910.
- González, V., O. Salazar, M.C. Julián, J. Acero, M.A. Portal, R. Muñoz, H. López, E. Gómez, P. López and V. Rubio. 2002. *Ceratobasidium albasitensis*-A new *Rhizoctonia*-like fungus isolated in Spain. *Persoonia*. 17: 601-614.

- González-Vázquez, V. M., J. Espinoza-Velázquez, R. Mendoza-Villarreal, H. León-Castillo y M.A. Torres-Tapia. 2011. Caracterización de germoplasma de maíz que combina un alto contenido de aceite y poliembrionía. *Universidad y ciencia*. 27(2): 157-167.
- Gürcan, K., S.A. Mehlenbacher and N.V. Bassil. 2008. Highly informative simple sequence repeat (SSR) markers for fingerprinting hazelnut. *In: VII International Congress on Hazelnut* 845. p. 103-108.
- Gustafsson, A. 1946. The effect of heterozygosity on variability and vigour. -- *Hereditas* XXXII.
- Hallauer, A. R., M.J. Carena and J.D. Miranda F. 2010. Quantitative genetics in maize breeding. Springer. Vol: 6.
- Henrion, B., G. Chevalier and F. Martin. 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research*. 98(1): 37-43.
- Iwamasa, M., I. Ueno and M. Nishiura. 1967. Inheritance of nucellar embryony in Citrus. *Bulletin of the Horticultural Research, Shizuoka*. 7: 1-8.
- Jessup, R.W., B.L. Burson, G. Burow, Y.W. Wang, C. Chang, Z. Li, A.H. Paterson and M.A. Hussey. 2003 Segmental allotetraploidy and allelic interactions in buffelgrass (*Pennisetum ciliare*) revealed by genome mapping. *Genome*. 46: 304–313.
- Johnson, E., J. Romero-Severson, C. Astorga, F. Casanoves, S. Jackson, J. L. Ortiz, O. Quiroz, and J. Stuart. 2004. Applications of Molecular Tools in Agricultural and Forestry Sciences. Costa Rica. CATIEPurdue University. p. 150.
- Kato Y., T. A., S. C. Mapes, O. L. Mera, J. A Serratos H., y R. A Bye B. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 115 p.
- Kermicle, J. L. 1969. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science*. 166: 1422 1424.

- Kim, H. J., Y.K. Choi and B.R. Min. 2001. Variation of the Intergenic Spacer (IGS) region of ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae speciales. *Journal of microbiology-Seoul*. 39(4): 265-272.
- Kirst, M., C.M. Cordeiro, G.D.S.P. Rezende and D. Grattapaglia. 2005. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. *Journal of Heredity*. 96(2): 161-166.
- Koltunow, A. M., and U. Grossniklaus. 2003. Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology*. 54(1): 547-574.
- Kumar, R. S., K.T. Parthiban and M.G. Rao. 2009. Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular biology reports*. 36(7): 1951-1956.
- Kunkel, T. A. 2004. DNA replication fidelity. *Journal of Biological Chemistry*. 279(17): 16895-16898.
- Lakshmanan, K.K. and K.B. Ambegaokar. 1984. Polyembryony, Embryology of Angiosperms, Johri, B.M., Ed., Berlin: Springer. p. 448–475.
- Leblanc, O., D. Grimanelli, D. Gonzalez-de-Leon and Y. Savidan. 1995. Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-Tripsacum hybrids using maize RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 90(7-8): 1198-1203.
- Leroy, J.F. 1947. La Polyembryonie chez les Citrus. Son intérêt dans la culture et l'amélioration. *Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale*. 27(301-302): 483-495.
- Librado, P., and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.
- Linacero, R., and A.M. Vázquez. 1994. Genetic analysis of a polyembryonic mutant in rye. *Sexual Plant Reproduction*. 7(5): 290-296.
- Litz, R.E. 1997. (Ed) *The mango botany, production and uses*. CAB International, Wallingford, UK. 679 p.

- Lo, E.Y., S. Stefanović and T.A. Dickinson. 2009. Population genetic structure of diploid sexual and polyploid apomictic hawthorns (*Crataegus*; Rosaceae) in the Pacific Northwest. *Molecular ecology*. 18(6): 1145-1160.
- Lone, F.A. and S. Lone. 2013. Manuscript Info Abstract. *International Journal*. 1(7): 130-136.
- Lovell, J. T., O.M. Aliyu, M. Mau, M.E. Schranz, M. Koch, M., C. Kiefer, B.H. BSong, T. Mitchell-Olds and T.F. Sharbel. 2013. On the origin and evolution of apomixis in *Boechera*. *Plant reproduction*. 26(4): 309-315.
- Maheshwari, P. 1950. *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.
- MaizeGBD. 2013. MaizeGDB www.maizegdb.org/(Consulta Septiembre 2013).
- Martin, F., C. Delaruelle and M. Ivory. 1998. Genetic variability in intergenic spacers of ribosomal DNA in *Pisolithus* isolates associated with pine, eucalyptus and *Azelia* in lowland Kenyan forests. *New Phytologist*. 139(2): 341-352.
- Escobar-Saucedo, M.A. 2012. Caracterización bromatológica, genética y epigenética de mutantes de manzano con bajos requerimientos de frío. Tesis. Maestría. Facultad de Ciencias Químicas-Unidad Saltillo, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.
- Micke, W.C. J.H. Connel, P. Verdegal, M. Viveros, J.T. Yeager, M.A. Thorpe, and T.M. Gradziel. 2000 Progress report on regional almond variety trials. University of California. p 25.
- Mogie, M. 1992. *The Evolution of Asexual Reproduction in Plants*. Chapman and Hall, London: Chapman and Hall. 276 p.
- Morgan, D.T. and R.D. Rapleyye. 1951. Polyembryony in maize and lily, following X-radiation of the pollen. *J. Hered.* 42: 91-93.
- Musito, R.N., J. Espinoza V., V.M. González V., J.E. Gallegos S., H. De León C. 2008. Características de plántulas en familias derivadas de una población de maíz poliembriónico. *Rev. Fitotec. Mex.* 31(4): 399-402.

- Nagaoka, T. and Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and applied genetics*. 94(5): 597-602.
- Naumova, T.N. 1992. *Apomixis in Angiosperms: Nucellar and Integumentary Embryony*. CRC Press, Boca Raton, FL .
- Nepolo, E., P.M. Chimwamurombe, C.A. Cullis and M.A. Kandawa-Schulz. 2010. Determining genetic diversity based on ribosomal intergenic spacer length variation in Maramba bean (*Tylosema esculentum*) from the Omipanda area, Eastern Namibia. *African Journal of Plant Science*. 4(9): 368-373.
- Nkongolo, K. K., K. Mbuya, M. Mehes-Smith and A. Kalonji-Mbuyi. 2013. Molecular analysis of quality protein (QPM) and normal maize varieties from the DR-Congo breeding program. *African Journal of Biotechnology*. 10(65): 14293-14301.
- Nogler, G. A. 1984. Gametophytic apomixis. *In: Embryology of Angiosperms*. B.M. Johri, ed (Berlin:Springer-Verlag). p. 377-444.
- Osipova, E. S., O.V. Koveza, A.V. Troitskij, Y.I. Dolgikh, Z.B. Shamina and S.A. Gostimskij. 2003. Analysis of specific RAPD and ISSR fragments in maize (*Zea mays* L.) somaclones and development of SCAR markers on their basis. *Russian Journal of Genetics*. 39(12): 1412-1419.
- Pandey, S. N. and A. Chadha. 1996. *Plant Anatomy and Embryology*. Vikas Publishing House Pvt Ltd.
- Parlevilet, J. E., and J.W. Cameron. 1959. Evidence on the inheritance of nucellar embryony in Citrus. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci*. 74: 252–26.
- Paun, O. and E. Hörandl. 2006. Evolution of hypervariable microsatellites in apomictic polyploid lineages of *Ranunculus carpaticola*: directional bias at dinucleotide loci. *Genetics*. 174(1): 387-398.
- Pesev, N., R. Petrovic, LjZecevic and M. Milosevic. 1976. Study of possibility in raising maize Inbred lines with two embryos. *Theoretical and Applied Genetic*. 47: 197-201.
- Peter, K. E. 2009. *Basics of Horticulture*. New India Publishing. p 733.

- Pliego M., J.A. 2014. Caracterización de plántula de genotipos segregantes de la poliembrionía en maíz. Tesis. Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah. Mex. 96 p.
- Pollacsek, M. 1992. Management of the *ig* gene for haploid induction in maize. *Agronomie*. 12(3): 247-251.
- Pollacsek, M. 1984. Twin stalks in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 58: 58-56
- Porceddu, A., E. Albertini, G. Barcaccia, E. Falistocco and M. Falcinelli. 2002. Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two way pseudo-testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 104(2-3): 273-280.
- Pupilli, F., E.J. Martinez, A. Busti, O. Calderini, C.L. Quarin and S. Arcioni. 2004. Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Molecular Genetics and Genomics*. 270(6): 539-548.
- Ramakrishnan, M., S.A. Ceasar, V. Duraipandiyar and S. Ignacimuthu. 2014. Efficient plant regeneration from shoot apex explants of maize (*Zea mays*) and analysis of genetic fidelity of regenerated plants by ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 119(1): 183-196.
- Ramawat, K. G., J.M. Mérillon and K.R. Shivanna. 2014. (Eds.). *Reproductive biology of plants*. CRC Press.
- 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.
- Reddy, S.M., M. Madhusudhana R., A. Srinivas R., M. Mahender R., S. Janardhana C. 2004. *University botany III (Plant Taxonomy, Plant embryology, Plant Physiology)*, New age international. Vol: 3.

- Reddy, M.P., N. Sarla and E.A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. 128(1): 9-17.
- Rodríguez, T.A., M. Valdés and B. Xoconostle C. 2004. Ecología molecular de los hongos ectomicorrizicos. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol: 27.
- Rodríguez, H.S. 1981. Determinación de la heredabilidad y efectos de la selección para el carácter doble embrión en maíz (*Zea mays* L.) Tesis. Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah. Mex. p. 48.
- Rodríguez, H., S. y G.M. Castro. 1978. Estudio sobre herencia de semillas con dos embriones. *Avances de investigación en maíz*, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México. p.19.
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Molecular Biology*. 9(5): 509-520.
- Ruiz, C., M.P. Breto and M.J. Asins. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica*. 112(1): 89-94.
- Ryman, N. and P.E. Jorde. 2001. Statistical power when testing for genetic differentiation. *Molecular Ecology*. 10(10): 2361-2373.
- Sánchez-Damas, J. J., E. Avitia-García, A.M. Castillo-González, A. Villegas-Monter and T. Corona-Torres. 2006. Estudio anatómico de la poliembrionía en tres portainjertos de cítricos. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 12: 145-152.
- Savidan, Y. 1982. Nature and heredity of apomixis in *Panicum maximum* Jacq. Ph.D. Dissertation, University of Paris XI.
- Schaaper, R. M. 1993. Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 268(32): 23762-23765.

- Segura, B.M.D. 2002. Análisis poblacional y evolutivo en "*Bactrocera oleae*" (Gmelin) mediante el uso de marcadores moleculares (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones).
- Semagn, K., Å. Bjørnsta and M.N. Ndjioudjop. 2006. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology*. 5(25).
- Sharma, S., S. Rustgi, H.S. Balyan and P.K. Gupta. 2002 Internal transcribed spacer (ITS) sequences of ribosomal DNA of wild barley and their comparison with ITS sequences in wheat. *Barley Genet. Newslett.* 32: 38–45.
- Sharman, B.C. 1942. A twin seedling in *Zea mays* L. Twinning in the Gramineae. *New Phytologist*. 41(2): 125-129.
- Singh, R. J. 2010. Plant cytogenetics. CRC press. p 464.
- Soltis, D.E. and P.S. Soltis. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. *In Molecular systematics of plants II* Springer US. p. 1-42.
- Trapero, C., D. Barranco, A. Martín and C.M. Díez. 2014. Occurrence and variability of sexual polyembryony in olive cultivars. *Scientia Horticulturae*. 177: 43-46.
- Tudge, C. 2006. The tree: A natural history of what trees are, how they live, and why they matter. Random House LLC.
- Valdés-Monsivais, N.F., G. Gaona-Lozano, R. Rodríguez-Herrera, C.N. Aguilar-González, V.M. Gonzalez-Vazquez, M.H. Reyes-Valdés and J. Espinosa-Velazquez. 2012. Putative loci associated to polyembryony in maize populations. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 15(3).
- Van de Vlies, P. and C.C. van Diemen. 2012. Guidelines Analysis of DNA Quantity and Quality for Infinium and GoldenGate Projects. Version 2. UMCG Genetica- Genome Analysis Facility.
- van Dijk, P.J. and J.T. Bakx-Schotman. 2004. Formation of unreduced megaspores (diplospory) in apomictic dandelions (*Taraxacum officinale*, sl) is controlled by a sex-specific dominant locus. *Genetics*. 166(1): 483-492.

- Villareal C., A.G. 2007. Relación de xenia y apomixis con la poliembrionía en maíz. Tesis. Maestría. Facultad de Ciencias Químicas-Unidad Saltillo, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.
- Warburton, M. L., X. Xianchun, J. Crossa, J. Franco, A.E. Melchinger, M. Frisch, M. Bohn and D. Hoisington. 2002. Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. *Crop Science*. 42(6): 1832-1840.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.
- Willson, M. F. and N. Burley. 1983. Mate choice in plants: mechanisms, tactics and consequences. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA. Willson Mate choice in plants: mechanisms, tactics, and consequences.
- Yan, W. L.A. Hunt, Q. Sheng and Z. Szlavnic. 2000. Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. *Crop Science*. 40(3): 597-605.
- Zhou, Y., Y.-P. Zou, D.-Y. Hong and Sh.-Y. Chen. 1996. ITS1 sequences of nuclear ribosomal DNA in wild and cultivated rice of China and their phylogenetic implications. *Acta. Bot. Sin.* 38: 785-791.