



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y  
ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO  
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



**EL SACO EMBRIONARIO DE**  
*Polianthes tuberosa* L.

Tesis  
que para obtener el grado académico de  
Maestra en Ciencias de la Floricultura

P R E S E N T A

**Alejandra Guillermina González Gutiérrez**



Zapopan, Jalisco, julio de 2015

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ, A.C.), con el financiamiento del proyecto CONACYT CB-24554 y los proyectos SINAREFI-SNICS BEI-AGA-10-8, BEI-AGA-11-8.

“... ve lo que todo el mundo ha visto y  
piensa lo que nadie más ha pensado”

Albert Szent-György

# AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincera gratitud a las personas e instituciones sin cuya colaboración no hubiera sido posible la realización del presente trabajo:

Al CIATEJ por haberme dado cobijo durante todos estos años. Gracias por el apoyo otorgado a lo largo de mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada para mis estudios de maestría.

A mi director de tesis el Dr. Benjamín Rodríguez Garay, por toda la paciencia, por compartirme de sus conocimientos, por la confianza en mi persona. Gracias por ser mi maestro, por todos sus consejos académicos pero también por los personales.

A mis revisores Dr. Alejandro Muñoz Urías, Dr. Ernesto Tapia Campos, Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba y M.C. José Manuel Rodríguez Domínguez por las valiosas aportaciones y sugerencias a mi trabajo. Gracias por el tiempo invertido en la revisión de la tesis.

De manera especial expreso mi más sincero agradecimiento al M.C. José Manuel Rodríguez Domínguez quién además de contribuir directamente en mi formación me ha mostrado el lado humano de la ciencia.

## DEDICATORIAS

Gracias a todas esas personas importantes en mi vida, aquellas que siempre estuvieron listas para brindarme su apoyo, todos ustedes han contribuido a la feliz terminación de este trabajo. Ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado.

Con todo mi cariño esta tesis se las dedico a ustedes...

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
ÍNDICE DE CUADROS .....	IV
RESUMEN .....	V
ABSTRACT .....	VI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1. ANGIOSPERMAS .....	3
2.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ANGIOSPERMAS .....	3
2.1.2. FORMACIÓN DE GAMETOS EN ANGIOSPERMAS .....	4
2.1.2.1. GAMETOFITO MASCULINO .....	5
2.1.2.2.1. MICROSPOROGÉNESIS .....	5
2.1.2.2.2. MICROGAMETOGÉNESIS .....	7
2.1.2.2. GAMETOFITO FEMENINO .....	8
2.1.2.2.1. EL ÓVULO .....	9
2.1.2.2.2. EL SACO EMBRIONARIO .....	11
2.1.2.2.2.1. MEGASPOROGÉNESIS .....	12
2.1.2.2.2.2. MEGAGAMETOGÉNESIS .....	13
2.1.3. LA DOBLE FECUNDACIÓN .....	15
2.1.4. EMBRIOGÉNESIS .....	16
2.1.5. EL ENDOSPERMO .....	17
2.2. LA EMBRIOLOGÍA DE LAS ANGIOSPERMAS: IMPORTANCIA Y APLICACIONES .....	20
2.2.1. EMBRIOLOGÍA Y LA TAXONOMÍA .....	20
2.2.2. EMBRIOLOGÍA EXPERIMENTAL Y APLICADA .....	22
2.3. EL NARDO .....	24
2.3.1. ORDEN ASPARAGALES .....	24
2.3.1.1. EL GÉNERO POLIANTHES (FAMILIA ASPARAGACEAE, SUB-FAMILIA AGAVOIDEAE) .....	24
2.3.1.1.1. POLIANTHES TUBEROSA L. ....	26
3. ANTECEDENTES .....	27
3.1. ESTUDIOS DEL DESARROLLO DEL GAMETOFITO FEMENINO EN LA SUB-FAMILIA AGAVOIDEAE .....	27
3.2. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DEL GAMETOFITO FEMENINO EN ANGIOSPERMAS .....	31
3.2.1. TÉCNICAS DE CLARIFICACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE ÓVULOS COMPLETOS .....	32
3.2.2. ANÁLISIS DEL MEGAGAMETOFITO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL .....	34
4. JUSTIFICACIÓN .....	36
5. HIPÓTESIS .....	37

<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>6.1 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>38</b>
<b>6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>38</b>
<b>7. METODOLOGÍA.....</b>	<b>39</b>
<b>7.1. MATERIAL VEGETAL .....</b>	<b>39</b>
<b>7.2. MUESTREO Y COLECTA DE ESPECÍMENES.....</b>	<b>39</b>
7.2.1. BOTONES FLORALES .....	39
7.2.2. PREPARACIÓN DE LAS FLORES EN ANTESIS .....	40
7.2.3. VIABILIDAD DEL POLEN PARA LA POLINIZACIÓN.....	40
7.2.4. TRATAMIENTOS DE POLINIZACIÓN.....	41
<b>7.3. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS Y ANÁLISIS MICROSCÓPICO.....</b>	<b>42</b>
<b>7.4. TRABAJO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>44</b>
7.4.1. ANÁLISIS ANTES DE LA POLINIZACIÓN.....	45
7.4.2. ANÁLISIS DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN .....	46
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>8.1. DESCRIPCIÓN DE LA FLOR Y SUS PARTES DE POLIANTHES TUBEROSA VAR. SIMPLE .....</b>	<b>47</b>
8.1.1. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LOS ÓVULOS Y SEMILLAS INMADURAS DE POLIANTHES TUBEROSA VAR. SIMPLE.....	48
8.1.2. FORMACIÓN Y DESARROLLO DEL GAMETOFITO FEMENINO .....	50
8.2.2.1. MEGASPOROGÉNESIS .....	50
8.2.2.2. MEGAGAMETOGÉNESIS.....	55
8.2.2.3. CARACTERIZACIÓN DEL SACO EMBRIONARIO MADURO .....	60
8.2.2.3.1. ANTÍPODAS.....	62
8.2.2.3.2. CÉLULA CENTRAL: CARIOGAMIA DE LOS NÚCLEOS POLARES .....	64
8.2.2.3.3. APARATO OVULAR.....	66
8.2.3. LA DOBLE FECUNDACIÓN .....	68
8.2.4. FORMACIÓN DEL CIGOTO Y DESARROLLO DEL EMBRIÓN .....	73
8.2.5. DESARROLLO DEL ENDOSPERMO.....	77
<b>8.3. DESCRIPCIÓN DE LA FLOR Y SUS PARTES DE POLIANTHES TUBEROSA VAR. DOBLE.....</b>	<b>80</b>
8.3.1. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LOS ÓVULOS Y SEMILLAS INMADURAS DE POLIANTHES TUBEROSA VAR. DOBLE .....	81
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>101</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Microsporogénesis .....	6
<b>Figura 2.</b> Microgametogénesis .....	7
<b>Figura 3.</b> Esquema de las partes que componen una flor hermafrodita .....	8
<b>Figura 4.</b> Tipos de óvulos según la posición del micrópilo respecto al funículo.....	11
<b>Figura 5.</b> Diagrama de los principales patrones de desarrollo del saco embrionario encontrados en angiospermas .....	13
<b>Figura 6.</b> Esquema de desarrollo del saco embrionario Monospórico tipo-Polygonum ....	14
<b>Figura 7.</b> Tipos de endospermo .....	19
<b>Figura 8.</b> Esquema abreviado de la metodología a seguir para el análisis del desarrollo del gametofito femenino de <i>Polianthes tuberosa</i> .....	44
<b>Figura 9.</b> Estados de desarrollo correspondientes a las variables utilizadas antes de la polinización .....	45
<b>Figura 10.</b> Estados de desarrollo post-fertilización.....	46
<b>Figura 11.</b> Flor de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple.....	47
<b>Figura 12.</b> Imagen y representación esquemática de las partes que componen el óvulo maduro de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple.....	49
<b>Figura 13.</b> Célula madre de la megaspóra de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple.....	51
<b>Figura 14.</b> Proceso de Megasporogénesis en <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple .....	52
<b>Figura 15.</b> Megagametogénesis en <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple .....	57
<b>Figura 16.</b> Proyección en 3D de un saco embrionario con ocho núcleos de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple .....	59
<b>Figura 17.</b> Saco maduro desarrollado en <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple monospórico tipo-Polygonum.....	60
<b>Figura 18.</b> Malformaciones encontradas en el saco embrionario maduro de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple .....	62
<b>Figura 19.</b> Extremo calazal del saco embrionario de <i>Polianthes tuberosa</i> .....	65
<b>Figura 20.</b> Aparato ovular formado en los sacos embrionarios de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple.....	67
<b>Figura 21.</b> Momento de la doble fecundación del saco embrionario de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple.....	69
<b>Figura 22.</b> Esquema representativo de las primeras etapas de desarrollo en la fecundación de la célula huevo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	70
<b>Figura 23.</b> Reconstrucción en 3D de un saco embrionario fecundado de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple.....	71
<b>Figura 24.</b> Desarrollo embrionario en <i>Polianthes tuberosa</i> variedad Simple.....	75
<b>Figura 25.</b> Formación y desarrollo del endospermo helobial en semillas inmaduras de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple .....	78
<b>Figura 26.</b> Modificaciones del saco embrionario post-fertilización en <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple. En el extremo calazal se observa la formación de dos haustorios divididos por el “postamento”, en el extremo micropilar se observa la formación del haustorio micropilar que alberga al embrión.....	79
<b>Figura 27.</b> Flor de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Doble.....	81



# ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Estudios del desarrollo del gametofito femenino en la Sub-familia Agavoideae.	28
<b>Cuadro 2.</b> Resultados de las autopolinizaciones y polinización cruzada entre las variedades “Simple” y “Doble” de la especie <i>Polianthes tuberosa</i> . Tomado de Shen (1987).	29
<b>Cuadro 3.</b> Observaciones micrométricas durante el desarrollo del fruto en flores de polinización cruzada. Modificado de Krishnamurthy y Srinivas (2005).	30
<b>Cuadro 4.</b> Observaciones micrométricas durante el desarrollo del fruto en flores autopolinizadas. Modificado de Krishnamurthy y Srinivas (2005).	30
<b>Cuadro A5.</b> Dimensiones promedio (largo y ancho) desde la formación de la célula madre de la megaspora hasta el desarrollo del saco embrionario maduro de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple.	101
<b>Cuadro A6.</b> Dimensiones promedio (largo y ancho) de los distintos tipos celulares encontrados en el saco maduro de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple.	102
<b>Cuadro A7.</b> Dimensiones promedio (largo y ancho) del cigoto en distintas etapas de desarrollo de <i>Polianthes tuberosa</i> var. Simple.	102

# RESUMEN

*Polianthes tuberosa* L. es una planta de importancia económica por su uso como ornamental y la extracción de sus aceites para la elaboración de perfumes y esencias. De manera comercial el nardo es propagado vegetativamente lo que ha reducido su variabilidad genética, derivando en un número limitado de formas de flor, tamaños y color, además de volver altamente vulnerables a los cultivos a diversos factores bióticos y abióticos. Los estudios embriológicos permiten comprender los factores que controlan los diversos procesos de desarrollo embrionario a fin de poder manipularlos para aplicaciones prácticas, sin embargo, la información sobre la formación de los gametos y la reproducción sexual de esta especie es escasa, por lo que el presente trabajo tuvo por objetivo el tipificar y caracterizar los procesos de megasporogénesis, megagametogénesis, el proceso de la doble fecundación y el posterior desarrollo del embrión, lo anterior mediante el empleo de técnicas sencillas que permitieron el análisis de un gran número de muestras en un periodo de tiempo relativamente corto.

El desarrollo del saco embrionario en *Polianthes tuberosa* var. Simple es monospórico tipo-Polygonum. Se observaron estructuras típicas de la familia como la formación de un haustorio calazal y de la hipostasa. Se describió la formación del cigoto hasta su transición en embrión globular. La formación del endospermo fue del tipo helobial con el desarrollo de cámaras micropilar y calazales en el saco embrionario de la semilla inmadura.

La información obtenida permitió conocer aspectos básicos del desarrollo embrionario de esta especie los cuales pueden ser útiles en distintos campos de investigación básica. Además de presentarse como una herramienta que aporte información que pueda ser usada en programas de mejoramiento genético del nardo.

## ABSTRACT

*Polianthes tuberosa* L. is a plant of a high economical importance as an ornamental plant and because its essential oils are highly appreciated in the cosmetics industry. This species is commercially produced by means of asexual propagation, and because of this agronomic practice its genetic variability has been reduced, being this the cause of its vulnerability to diverse kinds of biotic and abiotic stress. Embryological studies allow the comprehension of factors that control embryo development with the purpose of manipulating them for practical applications, however, information about gamete and in general sexual reproduction is scarce. The objective of this work was to study of the processes of megasporogenesis and megagametogenesis as well as the process of double fertilization and early embryo development in *Polianthes tuberosa* L.

The embryo sac development in *P. tuberosa* is monosporic of the Polygonum type. Typical female structures of this family (Asparagaceae) such as chalazal haustorium and hypostase were observed. The process of Fertilization and zygote formation through the formation of the globular embryo is described in detail. The formation of endosperm was found to be of the helobial type with the characteristic formation of the micropylar and chalazal chambers in the embryo sac of the immature seed. This study allowed the understanding and comprehension of basic aspects about the embryo sac and embryo development in this species, which are useful in diverse fields of basic plant research. Furthermore, this information may be useful for breeding programs in this species.

# 1. INTRODUCCIÓN

*Polianthes tuberosa* L., es una especie endémica de México, es tanto en su variedad Doble como Simple una planta de importancia económica y comercial por su uso ornamental, así como por la extracción de sus aceites para la elaboración de perfumes y esencias (Benschop, 1993; Sangavai y Chellapandi, 2008; Hodges, 2010; Barba-González y col., 2012). La mayor parte de la producción en México se realiza en los estados de Morelos, Puebla y Estado de México, donde existen aproximadamente 300 ha de superficie cultivada y que generan alrededor de \$6'300,000 dólares al año (Camino y col., 2002).

De manera comercial, el nardo es propagado de forma vegetativa mediante la división de sus bulbos, esto con el propósito de generar plantas uniformes y estables, sin embargo, ello reduce la variabilidad genética del cultivo. Es posiblemente esta forma de reproducción lo que restringe a ambas variedades a un número limitado de formas de flor, tamaños y color entre otras características (Shillo, 1992), además de lo anterior, dicha forma de reproducción vuelve altamente vulnerables a los cultivos a diversos factores bióticos y abióticos (Hernández-Mendoza y col., 2015).

Una alternativa para generar variabilidad en las poblaciones es mediante la práctica sistemática de hibridaciones, sin embargo, la información disponible respecto a la biología reproductiva de la especie es escasa, particularmente para los patrones de formación del gametofito femenino y los procesos de fecundación y desarrollo embrionario que se llevan a cabo dentro del óvulo. Esto, debido a las dificultades para acceder a los tejidos gametofíticos, especialmente en el caso de los óvulos crasinucelados donde la célula madre de la megaspora y el desarrollo subsecuente de la misma se encuentran separados

de la epidermis por una o más capas de células, por lo que se encuentra profundamente embebido dentro del tejido esporofítico (Barrel y Grossniklaus, 2005). En este sentido, resulta necesario el establecimiento y/o adaptación de técnicas sencillas que permitan el análisis de una amplia cantidad de muestras, en un periodo de tiempo corto y sin que los tejidos analizados sean alterados. Información que servirá como base para abrir nuevas vías en la investigación básica en áreas de biología del desarrollo y de la reproducción, además de brindar conocimientos para su mejoramiento genético.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANGIOSPERMAS

#### 2.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ANGIOSPERMAS

En términos taxonómicos, la especie *Polianthes tuberosa* L. es una planta perteneciente a la familia Asparagaceae (sub-familia Agavoideae), la cual se encuentra circunscrita al Orden Asparagales de la clase de las monocotiledóneas dentro del grupo de las angiospermas (APG III, 2009).

Las angiospermas también conocidas como “plantas con flores” conforman uno de los principales grupos de plantas que se reproducen por semillas y son posiblemente uno de los más abundantes y diversos del planeta (Soltis y col., 2004). Se ha descrito un número aproximado de 260,000 especies vivientes de angiospermas (Scotland y Wortley, 2003) las cuales se encuentran clasificadas en 415 familias (APG III, 2009).

Este tipo de plantas están altamente diversificadas en cuanto a su morfología vegetativa y de reproducción, tamaño y organización del genoma, además, componen una gran diversidad de ecosistemas. Cabe señalar, que son indispensables para la existencia humana, ya que la gran mayoría de los cultivos en el mundo son angiospermas; también, son fuente de fibras naturales, poseen principios activos que son aprovechados en la medicina y tienen importancia forestal como fuentes maderables, entre otras (Soltis y Soltis, 2004; Soltis y col., 2004).

A pesar de su gran diversidad, varias características han sido identificadas como sinapomorfias para este grupo, entre las que resaltan algunos rasgos de la formación y desarrollo del saco embrionario, la formación de carpelos como estructuras que contienen o encierran a los óvulos y que posterior a la fertilización dan lugar a las semillas y el fenómeno de la doble fecundación, a partir del cual se genera el cigoto que posteriormente se desarrollará en un embrión y el endospermo (Doyle y Dongue, 1986; Li y Ma, 2002; Soltis y Soltis, 2004; Soltis y col., 2004).

### 2.1.2. FORMACIÓN DE GAMETOS EN ANGIOSPERMAS

El ciclo de vida de las angiospermas es producto de la alternancia de generaciones, y está dividido en dos fases, una esporofítica (diploide) y una fase gametofítica (haploide) (Bruckhin y col., 2005). La fase dominante es la esporofítica e inicia después de la fecundación con la formación del cigoto que posteriormente da lugar a la planta madura, la cual poseerá órganos vegetativos (hojas, tallo y raíces) y flores que contienen a los órganos reproductivos (anteras y óvulos) (Goldberg y col., 1994), siendo en estos últimos donde inicia la fase gametofítica.

Las funciones del gametofito son más cortas y relativamente menos complejas en relación a las del esporofito, su función principal se centra en producir gametos haploides ya sean masculinos (granos de polen) o femeninos (sacos embrionarios) (Yadegari y Drews, 2004; Fan y col., 2008).

### **2.1.2.1. Gametofito masculino**

Los estambres forman en su conjunto (filamentos y anteras) el órgano sexual masculino o androceo. El desarrollo del polen se origina dentro de los sacos polínicos o microsporangios de las anteras (Mascarenhas, 1989), y consiste de dos fases principales, la microsporogénesis y la microgametogénesis.

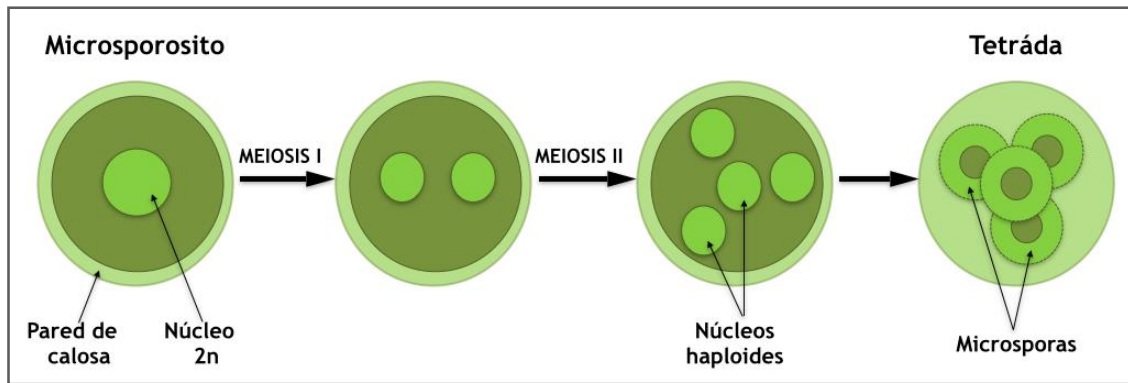
#### **2.1.2.2.1. Microsporogénesis**

La microsporogénesis, o meiosis masculina, es un paso clave en el ciclo de vida de las plantas ya que este proceso conduce a la formación de las microsporas (células haploides) que finalmente dan lugar al gametofito masculino (Nadot y col., 2008).

La microsporogénesis inicia con el arqueosporio consistente en un tejido esporógeno que por mitosis y citocinesis genera las células madre del polen. Estas células diploides son rodeadas por una capa delgada de calosa convirtiéndose en las células madre del polen, las cuales se dividen meióticamente para formar una tétrada de células haploides llamadas microsporas (Bedinger, 1992). Cada uno de los componentes de la tétrada se encuentra rodeado por una segunda pared de calosa que aísla una célula de la otra y que las separa del tejido tapetal circundante (Figura 1).

Las microsporas incrementan rápidamente en volumen, y finalmente la calosa es degradada por medio de la actividad de la enzima calasa, secretada por el tapetum, lo que las libera de la tétrada para posteriormente madurar cada una como un grano de polen individual (Bedinger, 1992; Honys y col., 2006; Li y Ma, 2002).

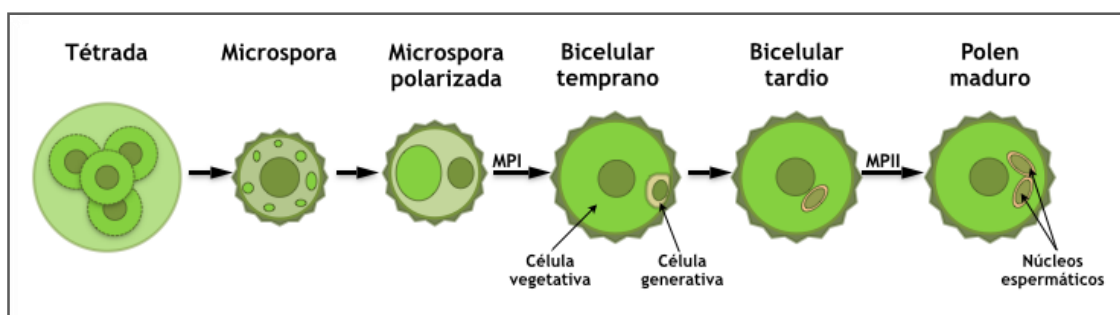




**Figura 1.** Microsporogénesis. El microsporocito o célula madre del polen (diploide) sufre una división meiótica originando una tétrada de microsporas haploides.

### 2.1.2.1.2. Microgametogénesis

La microgametogénesis es el proceso donde el microgametofito se desarrolla en un grano de polen maduro. El desarrollo de las microsporas es acompañado de la biogénesis de la vacuola (Owen y Makaroff 1995; Yamamoto y col., 2003). En asociación con la morfogénesis de la vacuola y la expansión de la microspora, el núcleo de la microspora comienza a polarizarse contra la pared de la misma, una vez polarizada, el núcleo sufre una división mitótica asimétrica, seguida de una citocinesis, originando dos células hijas con estructuras completamente diferentes, una célula vegetativa y una germinativa. La célula generativa posee un núcleo bien condensado y una cantidad reducida de citoplasma en comparación con la célula vegetativa (Figura 2). Durante la fecundación, la célula vegetativa es la encargada de la formación y crecimiento del tubo polínico mientras que la germinativa sufre una segunda división mitótica para formar los núcleos espermáticos que poseen la capacidad de fecundar uno a la célula huevo del gametofito femenino y otro al núcleo de la célula central (McCormick, 1993, 2004).

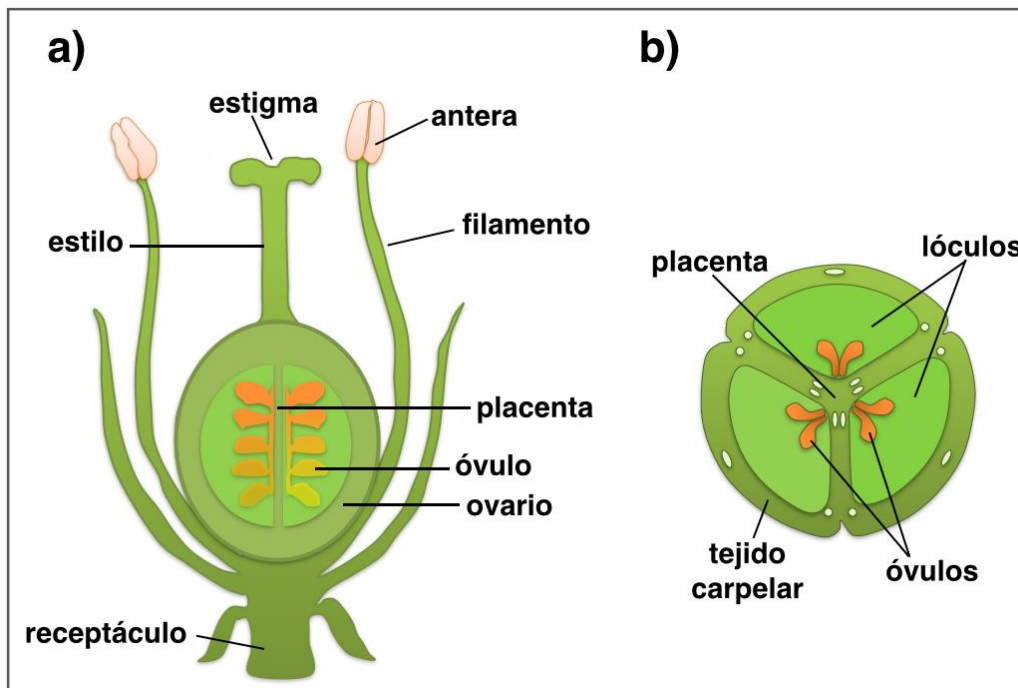


**Figura 2.** Microgametogénesis. Cuando las microsporas (haploides) son liberadas de la tétrada sufren una división mitótica asimétrica lo que genera granos de polen bicelulares con una célula una célula vegetativa (más grande) y una célula generativa (más pequeña) que se somete a una segunda división mitótica dando origen a los núcleos espermáticos. Modificado de: Borg y Twell 2010.

### 2.1.2.2. Gametofito femenino

El gametofito femenino es crucial para muchos pasos en el proceso reproductivo de las angiospermas (Sundaresan y Alandete-Saez, 2010), incluyendo la guía del tubo polínico, la fertilización y el desarrollo de la semilla después de la fertilización (Yadegari y Drews, 2004).

En términos florales y a nivel macroscópico, la estructura reproductiva femenina de una flor es llamada gineceo, y su unidad funcional el carpelo se encuentra constituida de tres elementos principales: el ovario, el estilo y el estigma. Los óvulos (uno o varios) están confinados dentro del ovario y la porción del tejido carpelar por medio del cual se encuentran unidos es la placenta, la cual a su vez se une al funículo de cada óvulo. El megasporangio junto con sus cubiertas protectoras conforman el óvulo (Gutiérrez-Mora y col., 2012). (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de las partes que componen una flor hermafrodita. **a)** Corte longitudinal de una flor. **b)** Corte transversal de un ovario trilobular

#### 2.1.2.2.1 El óvulo

El rudimento seminal, también llamado óvulo es el elemento donde son formados los gametos femeninos. Cada óvulo se encuentra recubierto o protegido por dos capas celulares denominadas tegumentos que lo rodean parcialmente dejando libre la región micropilar. El micrópilo es el paso para la entrada del tubo polínico al interior del óvulo, en el extremo opuesto se encuentra la calaza que representa la parte basal del óvulo, finalmente, en su interior se encuentra una masa de tejido compacta llamada nucela que es el tejido donde se lleva a cabo la formación y desarrollo del saco embrionario (Figura 4) (Bhojwani y Bhatnagar, 1983; Gutiérrez-Mora y col., 2012).

Los óvulos pueden ser clasificados atendiendo a distintos aspectos y estructuras de los mismos, por ejemplo, el grado de curvatura del óvulo, el número de tegumentos y su espesor, el grado de vascularización y otros aspectos de diferenciación histológica (endotecio, hipostasa, postamento) entre otros (Endress, 2011).

Como se comentó anteriormente, la nucela del óvulo es el megasporangio y es aquí donde se diferencia la célula madre de la megáspora. Basados en la cantidad de nucela, los óvulos han sido distinguidos clásicamente como crasinucelados y tenuinucelados (Bhojwani y Bhatnagar, 1983). La estructura nucelar es más fácil de analizar al momento de la profase de la meiosis cuando el tejido nucelar se encuentra intacto ya que en las etapas finales de la meiosis y más adelante en la formación del saco, el tejido adyacente a los elementos gametofíticos es generalmente comprimido lo que hace difícil determinar el número de capas celulares existentes alrededor del saco embrionario (Endress, 2011). Los óvulos crasinucelados son aquellos con una o más capas de tejido hipodérmico entre el meiocito y el ápice de la nucela y se considera

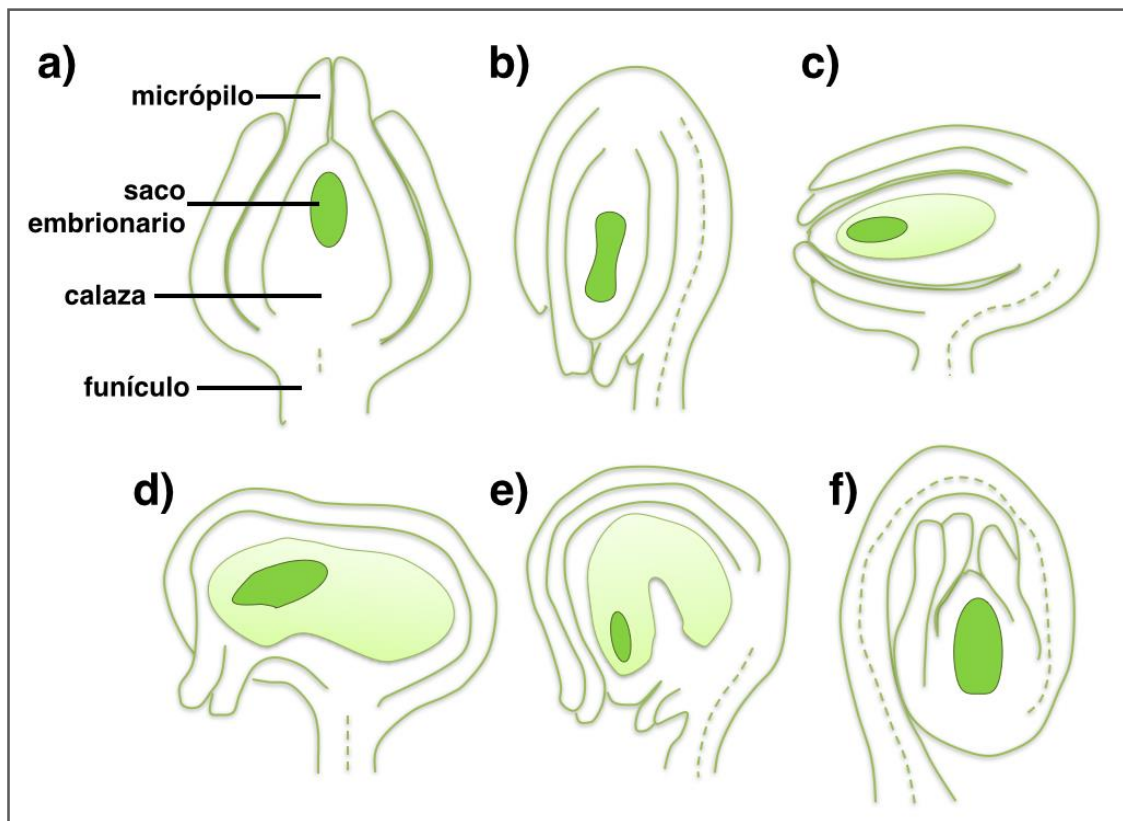
tenuinucelados a los óvulos donde no hay capa celular hipodérmica entre el meiocito y el ápice de la nucela (Reddy y col., 2004; Endress, 2011).

En el caso del número de tegumentos, aquellos con un sólo tegumento son llamados unitégmicos, mientras que los que contienen dos tegumentos son conocidos como bitégmicos y son encontrados en la mayoría de las monocotiledóneas (Bhojwani y Bhatnagar, 1983).

Acerca de la posición del micrópilo respecto al funículo, los óvulos maduros pueden clasificarse en: ortótropos cuando el funículo y el micrópilo se encuentran alineados (Figura 4a), los óvulos donde el micrópilo se sitúa cerca del funículo debido al crecimiento unilateral del mismo se llaman anátropos (Figura 4b), este es el tipo de óvulo más común en las angiospermas y los campilótropos son similares en crecimiento a los anátropos pero la curvatura es menor (Figura 4d). Cuando la curvatura del óvulo afecta también al tejido nucelar tornando al óvulo en la forma de una herradura de caballo es denominado anfítropo (Figura 4e). En los óvulos hemianátropos el funículo se encuentra en ángulo recto a la nucela y los integumentos (Figura 4c). Finalmente, en la familia Cactaceae se presenta un tipo especial de óvulo conocido como circinótropo, donde originalmente la masa nucelar está en línea con el eje y debido a un crecimiento unilateral, el crecimiento primeramente llega a ser anátropo y a medida que la curvatura continua el micrópilo nuevamente apunta hacia arriba cuando el óvulo se encuentra completamente formado (Figura 4f) (Bhojwani y Bhatnagar, 1983; Reddy y col., 2004; Endress, 2011).

#### 2.1.2.2.2. El saco embrionario

El desarrollo del saco embrionario puede ser dividido en dos fases distintas pero conectadas entre sí, la megasporogénesis, que implica la formación y maduración de los productos iniciales de la meiosis, seguido de la megagametogénesis, que inicia con la división mitótica de uno de los productos de la meiosis y continúa con la maduración, celularización y especialización de las células contenidas en el megagametofito (Bhojwani y Bhatnagar, 1983).



**Figura 4.** Tipos de óvulos según la posición del micrópilo respecto al funículo. **a)** Óvulo ortótropo. **b)** Óvulo anátropo. **c)** Óvulo hemianátropo. **d)** Óvulo campilótropo. **e)** Óvulo anfitropo. **f)** Óvulo circinótropo.

#### *2.1.2.2.1. Megasporogénesis*

En el primordio del óvulo una célula somática sub-epidérmica se diferencia y se convierte en la célula madre de la megaspora que es la precursora de los productos meióticos. Durante la megasporogénesis, esta célula madre de la megaspora (diploide) experimenta meiosis dando lugar a cuatro células haploides (García-Campayo y col., 2011).

Las plantas angiospermas exhiben tres patrones principales de megasporogénesis conocidos como tipo monospórico, bispórico y tetraspórico; la diferencia básica entre estos patrones de formación reside en la formación de la pared celular después de las divisiones nucleares lo que determina el número de productos meióticos que contribuirán a la formación del gametofito femenino maduro (Chasan y Walbot, 1993; Li y Ma, 2002).

En el patrón de tipo monospórico, ambas fases de la división meiótica están acompañadas por la formación del plato celular, formando cuatro megasporas uninucleadas. Posteriormente, tres de las megasporas, generalmente las más cercanas al extremo micropilar sufren muerte celular, permaneciendo comúnmente sólo la situada en el extremo calazal. En el modelo bispórico, el plato celular se forma después de la meiosis I pero no después de la meiosis II, generando dos megasporas binucleadas, de las cuales una de ellas degenera, mientras la otra permanece convirtiéndose en la megaspora funcional a partir de la cual se formará el saco embrionario. En el modelo tetraspórico, ningún plato celular es formado después de las dos divisiones meióticas, formando sólo una megaspora con cuatro núcleos. De manera que cada uno de estos patrones da lugar a una sola megaspora funcional la cual puede contener uno, dos o cuatro núcleos (Figura 5) (Yadegari y Drews, 2004).

### 2.1.2.2.2. Megagametogénesis

Durante la megagametogénesis la megaspora funcional da lugar al gametofito femenino maduro. Inicialmente, la megaspora funcional sufre una o más divisiones mitóticas sin citocinesis resultando en un coenocito multinucleado. Posteriormente, las paredes celulares son formadas alrededor de esos núcleos, resultando en un saco embrionario maduro (Yadegari y Drews, 2004).

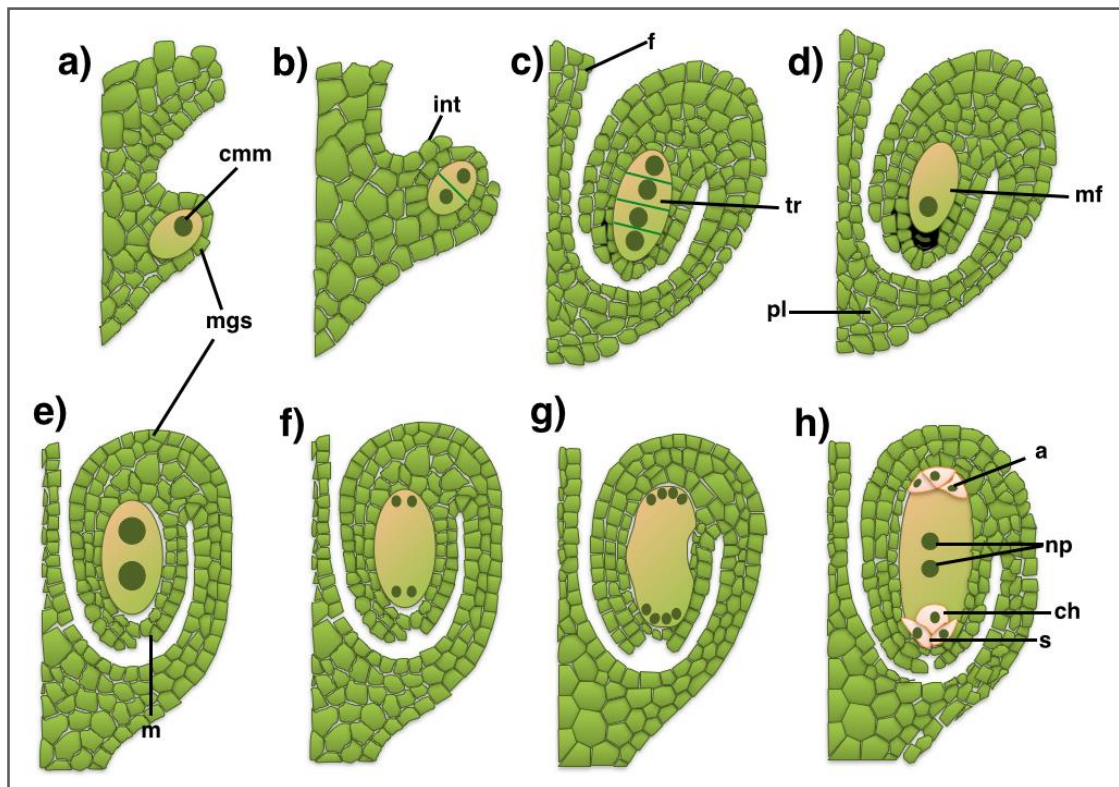
Se han descrito más de 15 tipos diferentes de patrones del desarrollo del saco embrionario, los cuales surgen principalmente de las variaciones en la citocinesis durante la meiosis, así como el número de divisiones mitóticas necesarias para la formación del saco embrionario maduro (Figura 5) (Drews y col., 1998; Yadegari y Drews, 2004).

Tipo	Megasporogénesis				Megagametogénesis			
	mega-sporocito	meiosis I	meiosis II	megaspora funcional	mitosis	mitosis	mitosis	gametófito maduro
Monospórico (Polygonum)								
Monospórico (Oenothera)							—	
Bispórico (Allium)					—			
Tetraspórico (Adoxa)					—	—		

**Figura 5.** Diagrama de los principales patrones de desarrollo del saco embrionario encontrados en angiospermas. Modificado de Reiser y Fischer, 1993.



El patrón de desarrollo más común es el tipo-Polygonum, y es formado mediante tres divisiones mitóticas a partir de la megaspora funcional uninucleada (patrón monospórico) formando así un saco con siete células (ocho núcleos) agrupadas en cuatro tipos celulares de la siguiente forma: tres células antipodales (en el extremo calazal), una célula central formada por los dos núcleos polares (que generalmente migran hacia el centro del saco), dos células sinérgidas y la célula huevo (localizadas en extremo micropilar) (Figura 6) (Maheshwari, 1937; Willemse y van Went, 1984; Dresselhaus, 2006; Yang y col., 2010).



**Figura 6.** Esquema de desarrollo del saco embrionario Monospórico tipo-Polygonum. **a)** Diferenciación de la célula madre de la megaspora de la nucela del óvulo. **b)** Díada, **c)** Tétrada de células haploides. **d)** Megasporas micropilares degradadas y megaspora funcional (extremo calazal). **e)** Primera división mitótica del saco embrionario. **f)** Segunda división mitótica del saco embrionario. **g)** Tercera división mitótica del saco embrionario. **h)** Conformación del saco embrionario maduro compuesto de ocho células tres antípodas (extremo calazal), dos núcleos polares centrales, dos sinérgidas y una célula huevo (extremo micropilar). ccm=célula madre de la megaspora, int=integumentos, f=funículo, tr=tétrada, pl=placenta, mf=megaspora funcional, mgs=megasporangio, m=micrópilo, a=antípodas, np=núcleos polares, ch=célula huevo, s=sinérgidas.

Este tipo de desarrollo es conocido como tipo-Polygonum ya que fue descrito por primera vez en la especie *Polygonum divaricatum* (Maheshwari, 1948). El patrón de desarrollo tipo-Polygonum, está presente en más del 70% de las especies de angiospermas incluyendo *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* (Russell, 1978; Webb y Gunning, 1990).

### 2.1.3. LA DOBLE FECUNDACIÓN

Para que la doble fecundación se lleve a cabo es necesario en primer lugar que un grano de polen maduro llegue al estigma receptivo de una flor, donde es rehidratado y adherido a la superficie en la cual germina y forma el tubo polínico (Yadegari y Drews, 2004; Boavida y col., 2005; Dumas y Rogowsky, 2008). El tubo polínico viaja largas distancias por el estilo de la flor, dirigido primeramente por las señales emitidas por el esporofito y luego por el gametofito femenino (Wetering y Russell, 2004) hasta llegar al micrópilo del óvulo en el ovario donde es guiado por señales de calcio generadas por las células sinérgidas (Tian y Russell, 1997). Al llegar al saco embrionario, el tubo polínico detiene su crecimiento y libera las células espermáticas dentro de una de las sinérgidas (Higashiyama y col., 2000; Yadegari y Drews, 2004). Dos agregados de actina llamados “coronas” son formados, uno en las cercanías del núcleo de la célula huevo y el otro en la interfase de la célula huevo y el núcleo de la célula central; estas coronas parecen estar involucradas en el movimiento de los núcleos espermáticos (los cuales no poseen motilidad propia) a través del saco embrionario (Huang y col., 1993; Huang y Russell, 1992; Russell, 1993; Russell, 1996; Ye y col., 2002; Wetering y Russell, 2004). De esta manera, uno de los núcleos espermáticos fecunda a la célula huevo para dar origen al cigoto (diploide), mientras que el segundo núcleo espermático se fusiona con los núcleos polares de la célula central para dar lugar a la célula madre del

endospermo (triploide) que posteriormente formará el endospermo de la semilla (Berger y col., 2008; Dumas y Rogowsky, 2008).

Este proceso donde de manera casi simultánea un núcleo espermático se une al núcleo de la célula central y el otro al núcleo de la célula huevo es conocido como “doble fecundación” y fue descubierto y descrito por primera vez por los investigadores, Sergius Nawashin (1898) en Rusia en las especies *Lillium martagon* y *Fritillaria tenella* y por León Guignard (1899) en Francia con sus estudios en *L. martagon* y *L. pyrenaicum*.

#### 2.1.4. EMBRIOGÉNESIS

Una vez fecundada la célula huevo, el cigoto que usualmente se encuentra polarizado de la misma forma que la célula huevo con su núcleo hacia el extremo calazal del óvulo (Dumas y Rogowsky, 2008; Lau y col., 2012) pronto adquiere el potencial de desarrollarse en un embrión, primeramente se alarga y se divide simétrica o asimétricamente dependiendo de la especie, generando dos células hijas, la célula más pequeña (apical) generará al embrión mediante una serie de divisiones en distintos planos y la más grande, alargada y vacuolada (la célula basal) (Sivaramakrishna, 1978; Yeung y Meinke, 1993) dará lugar al suspensor extra-embriionario, que conecta al embrión con el tejido materno (Mansfield y Briarty 1991; 1994; Rao, 1996), mediante una serie de divisiones perpendiculares al eje del cigoto. La célula superior del linaje basal, la hipófisis es incorporada en el plano embrional dando lugar al meristemo radicular (Dolan y col., 1993), lo que da origen a un embrión multicelular con un plan corporal bien establecido (Toonen y de Vries, 1996; Gutiérrez-Mora y col., 2004; Rao, 1996).

Los estadios iniciales del embrión son similares en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas hasta la formación del embrión globular, llegado este punto, el embrión dicotiledonar es orientado a lo largo del eje apical-basal y consta de un meristemo apical, situado entre dos cotiledones y el hipocotilo. En contraste, en las especies monocotiledóneas, se desarrollan embriones con una estructura más compleja, el eje embrionario es desplazado lateralmente respecto al escutelo, por lo que el meristemo es establecido en una posición opuesta al escutelo (Steffensen, 1968). El modelo para describir el desarrollo embrionario monocotiledonar está basado en estudios en especies de gramíneas principalmente en *Zea mays* (Jiu-Huan, 2003).

### 2.1.5. EL ENDOSPERMO

El endospermo es producido por la fusión de la célula central con una de las células espermáticas. En la mayoría de las especies de plantas, la célula central hereda dos núcleos haploides del gametofito femenino. Así pues, de manera general el endospermo contiene una dosis doble del genoma materno por una dosis del genoma paterno. Sin embargo, la ploidía del endospermo varía entre las angiospermas, como resultado de distintas dosis de genomas maternos y paternos (Baroux y col., 2002; Li y Berger, 2012).

Después de la fertilización varios cambios se producen en la estructura de la célula central que son indicativos de aumento de la actividad metabólica y la organización de la maquinaria de síntesis de proteínas para la diferenciación de la célula primaria del endospermo. La estructura del saco embrionario y el proceso de doble fertilización proporcionan las bases para el desarrollo del

endospermo, la migración nuclear y la posición relativa de los núcleos que se desarrollan en el sincitio antes de la celularización (Grossniklaus y Schneitz, 1998).

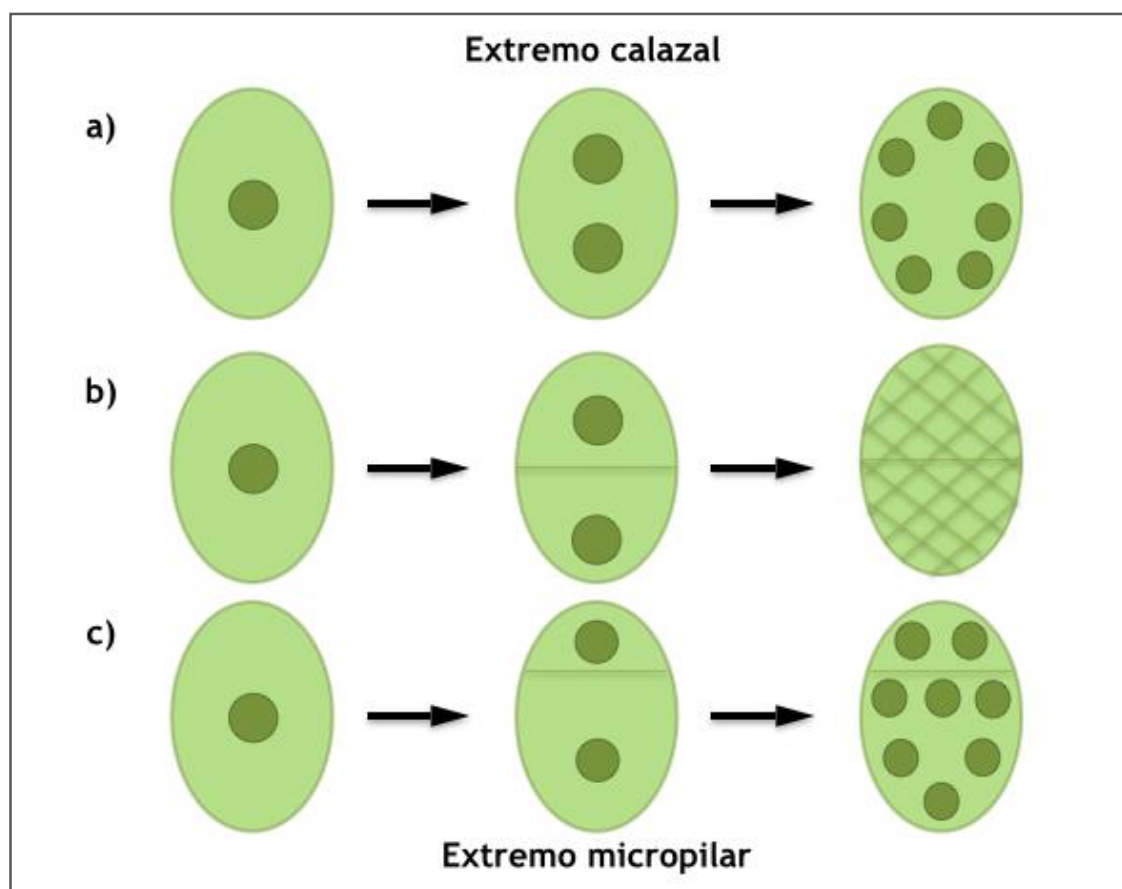
De forma clásica, tres tipos de endospermo han sido reconocidos, dependiendo del modo de desarrollo: nuclear, celular y helobial (Bhojwani y Bhatnagar, 1983; Floyd y Friedman, 2000).

En el endospermo nuclear, la división del núcleo primario del endospermo y algunas de sus divisiones nucleares posteriores no van acompañados de formación de pared celular, lo que resulta en un sincitio donde varios cientos de núcleos quedan suspendidos libremente dentro de la estructura. Dicha condición puede persistir hasta que el endospermo es consumido por el embrión en desarrollo o puede convertirse más tarde en endospermo celular, cuando esto ocurre, la formación de la pared celular es centrípeta, es decir, desde las periferias hacia el centro del saco (Figura 7a) (Bhojwani y Bhatnagar, 1983; Floyd y Friedman, 2000).

El endospermo celular se caracteriza por la ausencia de divisiones nucleares libres. La división del núcleo primario del endospermo y (en ocasiones) algunas pocas divisiones nucleares son seguidas por la formación de pared celular (Figura 7b) (Bhojwani y Bhatnagar, 1983; Floyd y Friedman, 2000).

En el desarrollo del endospermo del tipo helobial el núcleo primario del endospermo se transfiere al extremo calazal del saco embrionario donde se divide formando una gran cámara micropilar y una pequeña cámara en el extremo calazal. Como regla general, en la cámara micropilar las divisiones son nucleares (Figura 7c) (Bhojwani y Bhatnagar, 1983; Floyd y Friedman, 2000).

Según Davis (1966), de las 288 familias de angiospermas estudiadas hasta ese año, 161 familias mostraban endospermo nuclear, 72 celular y sólo 17 endospermo helobial. El endospermo celular se limita en gran medida a las familias del grupo de las dicotiledóneas, del mismo modo, de las 17 familias que mostraron endospermo helobial 14 correspondían a monocotiledóneas (en Bhojwani y Bhatnagar, 1983).



**Figura 7.** Tipos de endospermo. **a)** Endospermo nuclear **b)** Endospermo celular **c)** Endospermo helobial. Modificado de Floyd y Friedman, 2000.

## 2.2. LA EMBRIOLOGÍA DE LAS ANGIOSPERMAS: IMPORTANCIA Y APLICACIONES

### 2.2.1. EMBRIOLOGÍA Y LA TAXONOMÍA

Durante el último siglo datos sobre la anatomía, embriología, palinología, citología y, más recientemente la quimiosistemática y la biología molecular han sido utilizados de manera rentable para ciertas consideraciones taxonómicas a distintos niveles (Bhojwani y Bhatnagar, 1983).

La embriología ha sido un factor importante en el esclarecimiento de las relaciones de los grupos taxonómicos en todos los niveles (Herr, 1984), sin embargo, en comparación con la anatomía y la citología, la participación de la embriología en la taxonomía se ha visto limitada debido al difícil acceso al gametofito femenino y lo laborioso y minucioso que resulta su investigación a fin de describir todas las etapas del desarrollo embrionario (Bhojwani y Bhatnagar, 1983, Tobe, 1989). El embriólogo alemán Schnarf (1929 en Bhojwani Bhatnagar, 1983) fue uno de los precursores del aprovechamiento de la embriología en la taxonomía, desde entonces, mucho trabajo ha sido realizado en este aspecto (ver Maheswari 1950, Johri 1963; Bhojwani Bhatnagar, 1983).

A continuación se enlistan algunos caracteres embriológicos (con enfoque en el gametofito femenino) de utilidad en la clasificación taxonómica (tomado de Bhojwani Bhatnagar, 1983):

1. Desarrollo y estructura del óvulo. Crasinucelado o tenuinucelado; número de tegumentos y los cambios estructurales que suceden durante la formación de la semilla; si el suministro vascular entra en contacto con

los integumentos o la nucela; presencia de arilo y su origen; forma del micrópilo y si está formado por el integumento interior o el tegumento externo o ambos; presencia o ausencia de un obturador, si está presente, el lugar de origen del mismo.

2. Megasporogénesis y el desarrollo del saco embrionario. Forma de la tétrada, posición de la megaspora funcional en la tétrada; el saco embrionario es monospórico, bispórico o tetraspórico; número de divisiones nucleares que intervienen entre la etapa de megaspora y el saco maduro; la fusión nuclear durante el desarrollo del saco embrionario, si lo hubiere.
3. Forma y organización del saco embrionario maduro. Número y disposición de los núcleos y las células contenidas en el saco; persistencia o temprana desaparición de las antípodas, multiplicación de las células antípodas; formación de haustorios en el saco.
4. Fertilización. Camino de entrada del tubo polínico dentro del óvulo; intervalo de tiempo entre la polinización y la fecundación.
5. Endospermo. Nuclear, celular o helobial; presencia o ausencia de haustorios del endospermo y la manera en que se forman cuando están presentes.
6. Embrión. Forma y organización del embrión maduro; presencia o ausencia de haustorios del supensor.
7. Características especiales. Apomixis, poliembrionía, entre otras.



## 2.2.2. EMBRIOLOGÍA EXPERIMENTAL Y APLICADA

La embriología comenzó en gran parte como una ciencia descriptiva, en la que se estudiaban los detalles del desarrollo de las estructuras asociadas a la fecundación y desarrollo embrionario y la semilla (Bhojwani Bhatnagar, 1983; Tobe, 1989). Como se comentó anteriormente, en la última parte del siglo XIX los datos embriológicos comenzaron a utilizarse bajo consideraciones taxonómicas, lo que dio paso a la embriología comparada.

Sin embargo, a partir de 1960 la embriología se ha convertido además en una ciencia experimental. Los dos objetivos principales de la embriología experimental son: comprender los factores que controlan los diversos procesos embriológicos, y manipular dichos procesos alterando las condiciones ambientales de la planta entera o sus partes para aplicaciones prácticas (Bhojwani Bhatnagar, 1983).

El entendimiento cada vez más detallado de la formación y los distintos patrones de microsporogénesis y megagametogénesis, la fecundación y el posterior desarrollo de la semilla así como los avances en el cultivo de tejidos vegetales, han sido de gran utilidad para resolver problemas donde el mejoramiento genético tradicional ha sido difícil.

Entre las diversas aplicaciones de la embriología en el campo experimental se encuentran: el cultivo de embriones y la generación de métodos para el aislamiento y fusión de las células gaméticas tanto masculinas como femeninas y su posterior cultivo *in vitro* para la generación de híbridos difíciles de obtener de manera natural; la formación de embriones haploides para la obtención de plantas homocigotas, la fecundación *in vitro* que permite evitar algunas barreras

de incompatibilidad sexual (Bhojwani Bhatnagar, 1983; Johri y Rao, 1984); el cultivo del endospermo para la obtención de plantas con distintas ploidías (usualmente triploides) y la producción de frutos sin semillas (Hoshino y col., 2011), y más recientemente el estudio, reconocimiento y aprovechamiento de los fenómenos de apomixis para el mantenimiento de líneas híbridas y la transferencia de genes apomícticos a plantas de importancia económica, entre otras (Hanna y Bashaw, 1987).

## 2.3. EL NARDO

### 2.3.1. ORDEN ASPARAGALES

Alrededor de la mitad de las plantas monocotiledóneas están comprendidas dentro del orden Asparagales. Este orden fue propuesto por Huber (1969) basándose principalmente en la estructura y composición de la semilla (presencia de fitomelanina, estructura de la testa y el endospermo y el tamaño y forma del embrión), para incluir (en esa propuesta inicial) un total de 33 familias; posteriormente, el “Angiosperm Phylogeny Group” por sus siglas APG III (2009) propuso que este orden comprende catorce familias, dentro de las cuales se encuentran cinco que son ricas en especies (Orchidaceae con 25,000 especies, Amaryllidaceae con 1,600 especies, Asparagaceae con 2,500 especies, Iridaceae con 1,900 especies y Xanthorrhoeaceae con 850 especies) (Pires y col., 2006). Además, cabe señalar que es el segundo orden económicamente más importante dentro de las monocotiledóneas e incluye plantas como el agave, aloe, nardo, ajo, iris, puerro, cebolla y vainilla entre otras (Kuhl y col., 2004).

#### 2.3.1.1. El género *Polianthes* (Familia Asparagaceae, sub-familia Agavoideae)

La subfamilia Agavoideae (Asparagaceae) conocida hasta hace años como familia Agavaceae (APG III, 2009) incluye plantas con o sin tallos aparentes, con hojas en roseta, suculentas, coriáceas o herbáceas, flores bisexuales y semillas de color negro (Gentry, 1982). A esta sub-familia pertenece el género *Polianthes* el cual fue primeramente descrito por Linneo en 1753 (en Solano y García-Mendoza, 2013).

Este género es endémico de México y se encuentra distribuido al norte en Chihuahua y Tamaulipas y al sur hasta el norte de Oaxaca (Solano y Feria, 2007). El número de especies contenidas en el género es de aproximadamente 14 a 15 especies (Solano y Feria, 2007; García-Mendoza y Galván, 1995). *Polianthes* es dividido a su vez en dos subgéneros: *Polianthes* y *Bravoa*, clasificación que está basada principalmente en las características de sus flores (Solano, 2000).

*Polianthes*, también conocido con el nombre de nardo, amole y omilixochitl (Trueblood, 1973) son plantas herbáceas, perennes, las bases de las hojas inferiores con aspecto bulboso, hojas basales y caulinares, suculentas, planas o acanaladas, de color verde a glauca, las nervaduras lisas o papilosas en la cara exterior, márgenes hialinos, enteros o finamente denticulados; las raíces carnosas-fibrosas y con rizomas cortos. Posee una inflorescencia con 3 a 8 nudos, y cada nudo generalmente con un par de flores, el perianto es hipocrateriforme, blanco, rosado y hasta rojo con la edad. Las flores son ascendentes, difusas o divaricadas, el estigma trilobado, los filamentos se insertan por debajo de los lóbulos del perianto y las flores son fragantes. El ovario es trilocular, con óvulos numerosos, del tipo anátropo, bitégmicos y crasinucelados; el fruto en forma de cápsula con semillas deltoideas, planas y negras (Solano, 2000, 2002; Serrano-Casas 2011).

La gran variedad de colores que poseen algunas de las especies silvestres del género (blancas, amarillas, rojizas, rosadas y anaranjadas) las hace un recurso potencial como plantas ornamentales, sin embargo, es la especie *Polianthes tuberosa* la que ha sido ampliamente cultivada con estos fines.

Además, debido a la alta concentración de saponinas que poseen sus rizomas y raíces tuberosas han sido utilizadas como sustituto de jabón. Es también ampliamente cultivada para la extracción de sus aceites para la elaboración de perfumes y esencias (Benschop, 1993; Hodges, 2010).

#### **2.3.1.1.1. *Polianthes tuberosa* L.**

*Polianthes tuberosa* es nativo de México y fue distribuido a lo largo del mundo durante el siglo XVI, y es conocido mundialmente como una especie ornamental (Barba-González y col., 2012). Se caracteriza por tener flores blancas, con aceites aromáticos. Generalmente posee de 20 a 30 flores en cada inflorescencia. *P. tuberosa* contiene dos cultivares principales, el Doble o también llamado “Perla” que es mayormente utilizado como flor de corte y el Simple o “Mexicano” usado principalmente para la extracción de esencias (Benschop, 1993; Solano, 2000; Barba-González y col., 2012).

La reproducción en las plantas de este género puede darse de manera asexual o sexual. La asexual se realiza mediante la división de sus bulbos, mientras que la sexual se genera a partir de semilla. Sin embargo, de manera comercial la propagación se realiza mediante la división de sus bulbos ya que generalmente la producción de semilla es baja al igual que los porcentajes de germinación (Sheela, 2008; Hodges, 2010). En México se cultivan principalmente para arreglos florales. Los principales estados productores de nardo son Guerrero, Estado de México, Morelos, Puebla y Veracruz (Camino y col., 2002).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. ESTUDIOS DEL DESARROLLO DEL GAMETOFITO FEMENINO EN LA SUB-FAMILIA AGAVOIDEAE

En los estudios realizados en diferentes géneros y especies de la subfamilia Agavoideae respecto al desarrollo del gametofito femenino, la mayoría de los autores reportan el desarrollo de sacos embrionarios del tipo-Polygonum originados a partir de la megaspóra más cercana al extremo calazal del saco, tal es el caso de las especies *Yucca rupicola* (Watkins, 1937); *Y. aloifolia* (Wolf, 1940); *Agave lechuguilla* (Grove, 1941), *A. virginica* (Regen, 1941), *Hesperocallis undulata* y *Leucocrinum montanum* (Cave, 1948), *Comospermum yedoense* (Rudall, 1999), *A. tequilana* (Escobar-Guzmán y col., 2008; González-Gutiérrez y col., 2014) y *Yucca elephantipes* (Cruz-Cruz, 2013); no así en *Yucca filamentosa* donde Reed (1903) menciona que es la segunda megaspóra en el sentido calazal-micropilar la que da origen al saco embrionario.

Por otra parte, Piven y col. (2001) reportaron para las especies *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* un desarrollo del saco embrionario del tipo “bispórico” el cual es más similar al desarrollo del megagametofito que se observa en las especies del género *Allium*.

Respecto a la formación del embrión y el tipo de endospermo la información en la sub-familia es muy limitada, el cuadro 1 resume las características de desarrollo descritas en los estudios antes mencionados:

**Cuadro 1.** Estudios del desarrollo del gametofito femenino en la Sub-familia Agavoideae.

Sub- familia Agavoide Especie	Arreglo de la tétrada	Megasporogénesis	Megagametogénesis	Tipo de endospermo
<i>Yucca rupicola</i> (Watkins 1937)	Linear 50% "T" 50%	Monospórico	Polygonum Antípodas efímeras NCC extremo calazal	?
<i>Yucca aloifolia</i> (Wolf 1940)	Linear 50% "T" 50%	Monospórico	Polygonum Antípodas persistentes NCC extremo calazal	?
<i>Agave virginica</i> (Regen 1941)	Linear, "T" esporádicas	Monospórico	Polygonum Antípodas persistentes Sinérgidas efímeras NP extremo calazal NCC central	Nuclear
<i>Hesperocallis y Leucocrinum</i> (Cave 1948)	"T"	Monospórico	Polygonum Antípodas efímeras NCC extremo calazal	?
	Linear	Monospórico	Polygonum Antípodas persistentes NCC extremo centr	
<i>Agave furcroydes y A. angustifolia</i> (Piven y col. 2001)	Linear	Bispórico	Bispórico tipo Allium	?
<i>Yucca elephantipes</i> (Cruz-Cruz, 2013)	Linear. Presencia de pentadas	Monospórico	Polygonum NCC extremo calazal	?
<i>Agave tequilana</i> (Escobar-Guzmán y col., 2008 González-Gutiérrez y col., 2014)	Linear	Monospórico	Polygonum Antípodas efímeras NCC extremo calazal	Helobial presencia de haustorio micropilar y calazal

Respecto a la especie *Polianthes tuberosa*, estudios para analizar la receptividad del estigma muestran que existe una mayor formación de tubos polínicos en los estigmas de flores que fueron polinizadas tres días después de la antesis, así mismo realizan autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas (recíprocas) entre el cultivar Doble y Simple, los resultados mostraron una nula producción de frutos y semillas en las autopolinizaciones de plantas de ambos cultivares en contraste con las cruza recíprocas donde se reportaron porcentajes de polinización de 15% a 22% obteniendo los valores más altos de polinización y formación de semilla al utilizar la variedad Simple como planta receptora (Cuadro 2) (Shen y col., 1987).

**Cuadro 2.** Resultados de las autopolinizaciones y polinización cruzada entre las variedades “Simple” y “Doble” de la especie *Polianthes tuberosa*. Tomado de Shen (1987).

Receptor	Donador	Número de flores polinizadas	Número de cápsulas formadas	Porcentaje de polinización	Semillas fértiles por cápsula
Simple	Doble	72	16	22.22	15-23
Doble	Doble	65	0	0	0
Simple	Simple	45	7	15.5	19-31
Doble	Simple	42	0	0	0

Por su parte, Krishnamurthy y Srinivas (2005) reportaron las dimensiones (largo y ancho) de algunas estructuras que forman parte de las semillas como lo son nucela, el integumento, epidermis interna y externa, y el mesocarpo en muestras provenientes de polinización cruzada y autopolinización con el fin de relacionar el aumento en el tamaño de dichas estructuras con los fenómenos de esterilidad femenina y autoincompatibilidad. Los datos generados concuerdan con lo observado por Shen y col. (1987) encontrando que los óvulos y semillas de flores autopolinizadas no muestran crecimiento significativo de sus estructuras en comparación con aquellas de polinización cruzada (Cuadros 3 y 4).

Sin embargo, en el género *Polianthes* específicamente en la especie *P. tuberosa* no han sido encontrados estudios previos que contengan información detallada sobre los procesos de formación del gametofito femenino (megasporogénesis y megagametogénesis), así como de los estados y modificaciones del saco post-fertilización, la formación del cigoto y del endospermo.



**Cuadro 3.** Observaciones micrométricas durante el desarrollo del fruto en flores de polinización cruzada. Modificado de Krishnamurthy y Srinivas (2005).

DDA	Semilla		Saco embrionario		Nucela		Integumento	Epidermis externa	Mesocarpo
	L	A	L	A	L	A	G	G	G
D <sub>0</sub>	245	100	65	40	150	120	30	4	160
D <sub>4</sub>	280	160	70	40	200	160	30	3	260
D <sub>10</sub>	180	100	40	35	-	-	-	4.5	170

Medidas en micras  $\mu\text{m}$ , DDA=días después de antesis, D=día, L=largo, A=ancho, G=grueso, ND=sin diferenciar.

**Cuadro 4.** Observaciones micrométricas durante el desarrollo del fruto en flores autopolinizadas. Modificado de Krishnamurthy y Srinivas (2005).

DDA	Semilla		Saco embrionario		Nucela		Embrión		Integumento	Epidermis externa	Mesocarpo
	L	A	L	A	L	A	L	A	G	G	G
D <sub>0</sub>	290	135	60	45	ND	ND	140	100	20	4	150
D <sub>4</sub>	300	220	65	60	ND	ND	190	165	30	6	250
D <sub>10</sub>	460	280	70	50	ND	ND	340	280	40	12	280
D <sub>40</sub>	750	550	500	190	480	170	-	-	-	-	-

Medidas en micras  $\mu\text{m}$ , DDA=días después de antesis, D=día, L=largo, A=ancho, G=grueso, ND=sin diferenciar.

## 3.2. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DEL GAMETOFITO FEMENINO EN ANGIOSPERMAS

El estudio del desarrollo del gametofito femenino y la embriogénesis es obstaculizado debido a la inaccesibilidad de los óvulos dentro del ovario y el grosor de las capas que recubren el gametofito femenino (Schneitz y col., 1995).

Con el propósito de cubrir todos los caracteres embriológicos, una gran cantidad de óvulos y semillas deben ser colectados y fijados (usualmente en fijador FFA), debe hacerse cierto énfasis en los botones florales más pequeños, ya que contienen muchos caracteres importantes que no se pueden observar en las etapas posteriores. Por lo que puede pasar desde un par de meses o incluso un año hasta que se obtiene un juego completo de material. Sin embargo, una vez fijado, el material puede ser estudiado en cualquier momento conveniente (Tobe, 1989).

Tradicionalmente, los estudios citológicos del megagametofito se han llevado a cabo mediante seccionamiento por medio de micrótopo de muestras embebidas en parafina o resinas (Stelly y col., 1984). Sin embargo, en las técnicas de microtomía el posicionamiento de las células en relación a las células vecinas suele perderse y los planos de sección resultantes son difíciles de reconstruir en una sola imagen tridimensional (3D) (Haseloff, 2003; Barrell y Grossniklaus, 2005).

### 3.2.1. TÉCNICAS DE CLARIFICACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE ÓVULOS COMPLETOS

Una alternativa a los métodos de seccionamiento, es proporcionada por una variedad de técnicas de clarificación donde masas gruesas de tejido se hacen translúcidas a través de un tratamiento químico específico (Herr, 1993). Agentes como el xileno y el hidrato de cloral han sido adoptados como sustancias clarificantes, las cuales tienen un alto índice de refracción (similar al del vidrio). Como resultado de estos tratamientos de clarificación, los tejidos generalmente se vuelven transparentes, lo que reduce en gran medida los problemas de dispersión de la luz y aberración esférica, permitiendo una alta resolución de imagen en óvulos completos (Haseloff, 2003).

Las técnicas de clarificación para la observación de muestras completas fue introducida por Herr (1971), esta técnica se basa en una mezcla de ácido láctico, hidrato de cloral, fenol, aceite de clavo (Clove oil), y xileno (2: 2: 2: 2: 1). Debido a las proporciones de los ingredientes, esta mezcla es conocida como Fluido 4 1/2. Este líquido vuelve los tejidos lo suficientemente translúcidos para permitir el análisis de sus características estructurales y de desarrollo mediante el estudio en el microscopio óptico con contraste de fases o Contraste de Interferencia Nomarski (NIC).

Una de las desventajas de algunas de las sustancias mencionadas anteriormente es que la presión que ejerce el cubreobjetos sobre las muestras tratadas con dichas sustancias compacta los tejidos destruyendo la imagen clarificada, esto es especialmente cierto para las muestras tratadas con el Fluido 4 1/2 donde los óvulos se vuelven muy frágiles (Herr, 1992).

En 1978 Crane introdujo el uso del metil salicilato como agente clarificante, teniendo como ventaja ante los anteriores agentes clarificantes que el metil salicilato tiende a endurecer los óvulos (en Her, 1992). Hacia el año de 1984 Stelly y col. retomaron el uso del metil salicilato como clarificante aunado al empleo de un colorante de carácter básico utilizado para teñir el núcleo de las células, la Hematoxilina, lo que aumenta el contraste de las muestras haciéndolas fáciles de observar y analizar en el microscopio óptico sin la necesidad de filtros especiales.

### 3.2.2. ANÁLISIS DEL MEGAGAMETOFITO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

En las técnicas clásicas de observación en microscopía óptica, la luz interacciona con la muestra a distintas profundidades por lo que la imagen observada presenta áreas borrosas debido a la luz procedente de zonas fuera del plano de enfoque, lo que produce una disminución en el contraste y la resolución de la imagen (Duke y Michette, 1990). La microscopía confocal permite observaciones a una mayor resolución, contraste y nitidez que la que se puede obtener con la microscopía óptica convencional.

El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada procedente de los planos fuera de foco, mediante la iluminación de una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores. Para ello, es necesario el uso de una luz monocromática de alta potencia por medio de un láser que aplicado a una longitud de onda determinada en la muestra hace que moléculas excitadas de la misma emitan fluorescencia (autofluorescencia o fluorescencia asociada a fluorocromos artificiales) (Boyde, 1990).

El análisis de muestras por microscopía confocal provee algunas otras ventajas incluyendo la posibilidad de una mejora significativa en la resolución lateral y la capacidad de seccionamiento en serie de especímenes intactos e incluso vivos (Shotton, 1989), además de que estas series de secciones ópticas pueden ser reunidas y utilizadas para hacer reconstrucciones en 3D de las muestras (Haseloff, 2003).

Técnicas de tinción y/o clarificación (con colorantes fluorescentes) también pueden ser usadas para el análisis de especímenes completos por medio del microscopio confocal, donde es posible obtener secciones ópticas de alta resolución en muestras con grosores incluso mayores a 200  $\mu\text{m}$ , lo que permite a su vez la visualización en 3D de los acomodos de las células dentro de los diferentes tejidos de las plantas (Haseloff, 2003).

Algunos ejemplos del uso de dichas técnicas se encuentran en el estudio de Bougourd y col. (2000) donde la tinción con azul de anilina y clarificación con hidrato de cloral permitió el análisis de embriones maduros de *Arabidopsis thaliana*, cada célula dentro del embrión maduro puede ser visualizada con suficiente claridad y resolución para el análisis en 3D de su arquitectura celular. La aplicación de Hoeschst es útil para la visualización de los núcleos que componen en saco embrionario maduro desnudo de *Torenia fournieri* en un estudio para la caracterización de los cambios estructurales durante la doble fecundación (Wallwork y Sedgley, 2000). Barrell y Grossniklaus (2005) describen un protocolo de tinción de Feulgen con reactivo de Schiff (colorante que depende de la hidrólisis ácida del ADN) útil para la observación de todos los estados del desarrollo del gametofito, el cual al arrojar iluminación de fondo al teñir suavemente otras estructuras como vacuolas y paredes celulares genera un contexto que permite la identificación de los distintos tipos celulares desarrollados dentro del saco embrionario.

## 4. JUSTIFICACIÓN

Los datos generados a partir del estudio de la embriogénesis del nardo, más específicamente de la megasporogénesis, la megagametogénesis y el patrón de formación del saco maduro, la descripción de los procesos de fecundación y formación del endospermo, así como las modificaciones que sufre la semilla inmadura serán útiles en campos de investigación básica en las áreas de biología del desarrollo, reproducción, evolución y taxonomía.

Por otra parte, el entendimiento de los tiempos y tipificación del desarrollo normal del gameto femenino complementarán información que permita la detección de anomalías en los procesos de división meiótica (como la detección de gametos no reducidos) y mitótica en la formación del saco embrionario, además de presentarse como una herramienta que aporte información que pueda ser usada en programas de mejoramiento en los procesos de fertilización *in vitro*, obtención de haploides y producción de semilla en cruces difíciles de generar mediante otros métodos. Lo anterior encaminado a proyectos de mejoramiento genético del nardo.

Además, esta información complementará los estudios del gametofito femenino realizados en la sub-familia Agavoideae a la cual pertenecen un gran número de especies de importancia económica en México.

## 5. HIPÓTESIS

La formación del gametofito femenino de *Polianthes tuberosa* L. variedades Doble y Simple sigue el patrón de desarrollo Monospórico del tipo-Polygomun, mientras que las modificaciones del saco post-fecundación así como la formación del cigoto y desarrollo temprano del embrión y del endospermo se dan de manera general a los descritos para las Asparagáceas de la Sub-familia Agavoide, lo que incluye la formación de endospermo de tipo helobial y la formación post-fecundación de haustorios calazales y micropilares en el saco embrionario de la semilla inmadura.



## 6. OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GENERAL

Describir y caracterizar el proceso de formación del gametofito femenino y el desarrollo post-fecundación de dos variedades de *Polianthes tuberosa* L. para determinar el patrón de desarrollo del saco embrionario, la embriogénesis cigótica y el tipo de endospermo.

### 6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir el proceso de megasporogénesis en *Polianthes tuberosa* L. variedades Doble y Simple.
2. Caracterizar el proceso de megagametogénesis en *Polianthes tuberosa* L. variedades Doble y Simple.
3. Describir y caracterizar los cambios del saco embrionario post-fertilización de *Polianthes tuberosa* L. variedades Doble y Simple.
4. Caracterizar el desarrollo temprano del embrión y endospermo de *Polianthes tuberosa* L. variedades Doble y Simple.
5. Adaptar técnica(s) histológica(s) que permita(n) el análisis microscópico de un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo donde las células no pierdan su posición original y los tejidos no sufran daño alguno para el estudio del megagametofito femenino de la especie *Polianthes tuberosa* L. en sus variedades Doble y Simple.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal perteneciente al cultivar Doble fue obtenido en Cuahuchinola en el Municipio de Mazatepec, Morelos, mientras que el material de la variedad Simple fue colectado en Tantoyuca, Veracruz. Los bulbos se cultivaron en contenedores para su cultivo con un sustrato compuesto de turba en descomposición, arena y vermiculita en una proporción 3:2:1, bajo un sistema protegido con malla sombra con los cuidados culturales descritos por Valdivia-Ugalde (2014).

### 7.2. MUESTREO Y COLECTA DE ESPECÍMENES

Se realizaron dos coletas masivas de especímenes a fin de obtener el material suficiente para el análisis de todos los estados de desarrollo del gametofito femenino desde la formación de la célula madre de la megaspora y hasta el estado globular del embrión durante la primavera del 2013 y 2014.

#### 7.2.1. BOTONES FLORALES

Al inicio de la floración se seleccionaron al azar 50 plantas con inflorescencias jóvenes de cada cultivar que contenían botones florales de distintos tamaños para abarcar diferentes estados de desarrollo comprendidos dentro de la megasporogénesis y la megagametogénesis.

Los óvulos de estos botones fueron extraídos del ovario con la ayuda de un microscopio de disección, pinzas finas de relojero y bisturí; se colocaron en tubos Eppendorf® y se fijaron en FAA (10:5:50:35 formol: ácido acético: etanol: agua destilada) durante un periodo de 24 h.

Una vez fijados, los óvulos fueron transferidos a una solución de etanol al 70% donde se conservaron a una temperatura de 5°C hasta el momento de su tinción (Stelly y col. 1984; Palser y col. 1992).

### 7.2.2. PREPARACIÓN DE LAS FLORES EN ANTESIS

Los botones florales restantes se mantuvieron unidos a la inflorescencia para que continuaran su crecimiento. Al momento de la antesis las flores fueron emasculadas y cubiertas con bolsas de papel glassine para evitar la polinización no controlada.

### 7.2.3. VIABILIDAD DEL POLEN PARA LA POLINIZACIÓN

Las anteras una vez extraídas de las flores fueron mantenidas a temperatura ambiente, en un lugar seco y fresco hasta el momento de su dehiscencia, el polen que alcanzó la madurez fue almacenado junto con las anteras a 4°C en cajas petri. Para asegurar que el polen utilizado en las polinizaciones fuera viable se analizó su viabilidad mediante el método para germinación *in vitro* de polen para *A. tequilana* descrito por López-Díaz y Rodríguez-Garay (2008).

#### 7.2.4. TRATAMIENTOS DE POLINIZACIÓN

Cuando los estigmas de las flores previamente emasculadas fueron receptivos, se seleccionaron 50 flores por variedad, y se realizó la extracción y fijación en FAA para ser finalmente almacenados en alcohol al 70% a una temperatura de 5°C.

El resto de las flores en este estado se polinizaron manualmente de la siguiente manera: var. Simple x var. Simple y var. Simple x var. Doble. Los estigmas se consideraron receptivos al mostrar la secreción de un exudado translúcido en su superficie (Tilton, 1978; Shivanna y Sastri, 1981; Edlund y col., 2004).

Después de realizada la polinización y con el fin de dar seguimiento al proceso de fecundación, la formación del cigoto y el endospermo, así como los estados tempranos del embrión, se tomó una serie de frutos inmaduros de cada variedad a distintos días después de la polinización (DDP) (1, 2, 3...19).

### 7.3. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS Y ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Los óvulos y las semillas inmaduras previamente fijados en FAA y mantenidos en etanol al 70% fueron teñidos bajo dos métodos histológicos distintos, el primero un método de tinción-clarificación a base de Hematoxilina de Mayer y metil salicilato propuesto por Stelly y col. (1984) al cual se realizaron pequeñas modificaciones. El procedimiento se describe brevemente a continuación:

Los óvulos y las semillas conservados en etanol al 70% se tiñeron con solución de Hematoxilina de Mayer por un periodo de 3 h a temperatura ambiente y posteriormente se trataron con calor durante 30 min mediante baño maría a una temperatura de 40°C. A fin de eliminar el exceso de colorante se utilizó ácido acético al 2% durante 40 min a 40°C y después con ácido acético al 0.5% durante toda la noche.

Posteriormente, se realizaron varios lavados con bicarbonato de sodio al 0.1% hasta que la solución se observó cristalina, después de lo cual se renovó la solución y se dejaron reposar durante 24 h. Finalmente, las muestras fueron sometidas a una serie de deshidratación en etanol: 25%, 50%, 70%, 85% 95% y 100% por 15 min y etanol al 100% durante 2 h. La clarificación se llevó a cabo mediante series de solución de metil salicilato-etanol 3:1, 1:1, 1:3 por periodos de una hora en cada serie (en esta última solución las muestras pueden ser almacenadas por un periodo de 6 meses o más a 5°C).

Para su observación, los óvulos fueron montados en solución de metil salicilato 100% y las preparaciones analizadas con un microscopio Leica® DMR (Wetzlar, Alemania) acoplado a una cámara fotográfica EvolutionQEi® (Media-Cybernetics, Bethesda, EUA).

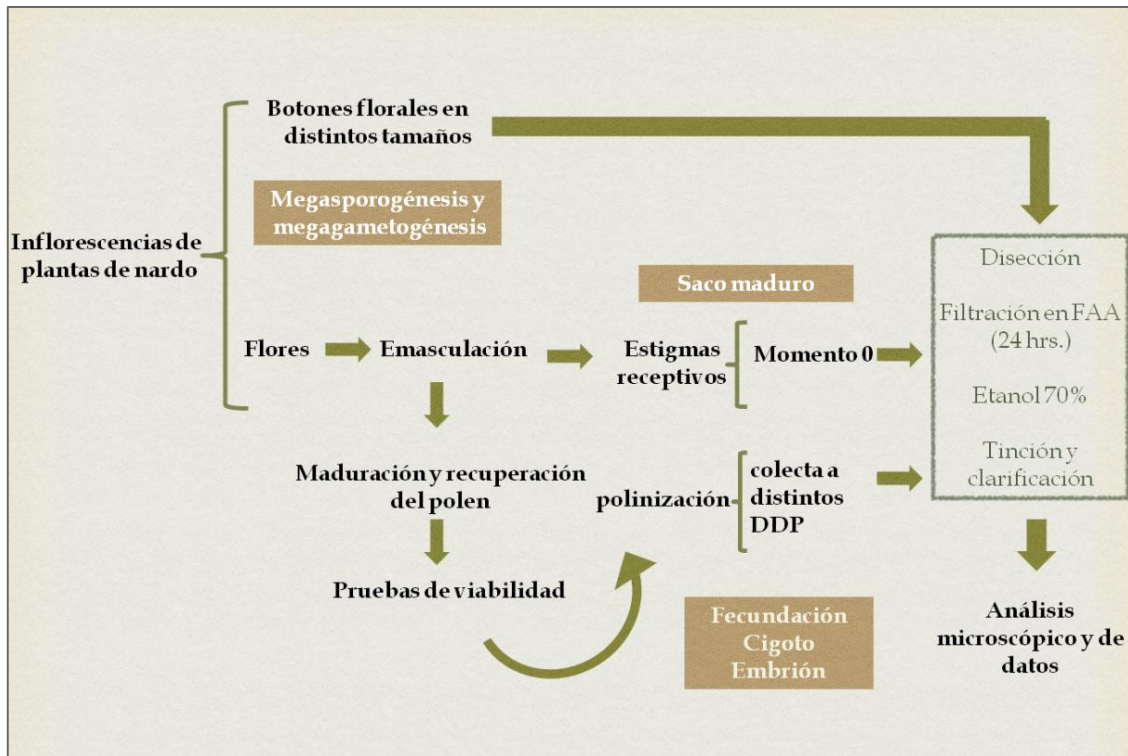
Las imágenes fueron manejadas con el software Image-Pro® (Media-Cybernetics, Bethesda, EUA) y tratadas para mejorar el contraste con el Software Adobe® Photoshop versión CS6.

El segundo método utilizado fue la Tinción de Feulgen, procedimiento que permite el análisis de óvulos completos en el microscopio confocal. La Tinción de Feulgen consiste de los siguientes pasos (Barrell y Grossniklaus, 2005): Los óvulos fueron tratados con HCl 1M durante 1:30h, HCl 5.8M durante 2 h y nuevamente HCl 1M por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente los óvulos fueron lavados tres veces con agua destilada y teñidos con Solución de Schiff por 3 h a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Completado este tiempo de reposo, los óvulos fueron deshidratados en alcohol al 30%, 50%, 70%, 90% y 95% durante 30 min cada una y dos veces en alcohol al 100%. Finalmente, los óvulos se dejaron reposar durante una noche en una solución compuesta de 50% de etanol y 50% de aceite de inmersión Leica Tipo F (Cat. Leica No. 11 513 859).

Los óvulos fueron montados en aceite de inmersión 100% para su observación microscópica. El análisis del megagametofito se realizó en un microscopio confocal Leica modelo TCS SPE, utilizando un láser de excitación de 532nm y una ventana de detección entre 555-700 nm. Las imágenes fueron capturadas y manejadas a través del software LAS X® (Leica Microsystems) con un formato de 2048x2048 pxs. Y finalmente editadas con el Software Adobe® Photoshop versión CS6.

La tinción con Hematoxilina de Mayer fue utilizada como un método masivo para el análisis de la gran cantidad de óvulos y semillas inmaduras que requirió el experimento, utilizando la técnica de tinción de Feulgen para análisis mediante microscopíaconfocal sólo para registrar imágenes de aquellos estados

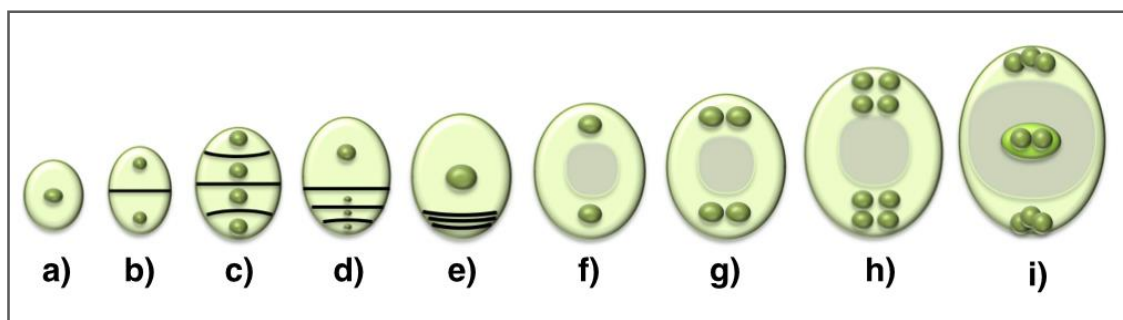
de desarrollo donde las estructuras de interés se encontraban en planos focales distintos aprovechando la herramienta del software proyección máxima y la proyección en 3D de series tomadas en “z” de ciertas etapas de desarrollo del gametofito femenino.



**Figura 8.** Esquema abreviado de la metodología a seguir para el análisis del desarrollo del gametofito femenino de *Polianthes tuberosa*.

## 7.4. TRABAJO EXPERIMENTAL

Con el fin de comprobar la hipótesis planteada para este trabajo con respecto al patrón de desarrollo del saco embrionario (SE) y la embriogénesis cigótica, se estudiaron 50 plantas de la variedad Simple y 50 de la variedad Doble. Se tomaron entre 50 y 100 mediciones (largo y ancho) de las estructuras mostradas en las figuras 9 y 10 correspondientes a los estados de desarrollo del saco embrionario antes y después de la polinización, y que constituyeron las variables de respuesta. Las dimensiones se realizaron mediante el software Image-Pro® (Media- Cybernetics, Bethesda, EUA).



**Figura 9.** Estados de desarrollo correspondientes a las variables utilizadas antes de la polinización. **a)** Célula madre de la megaspora. **b)** Primera división meiótica para formar una díada. **c)** Producto de la segunda división meiótica formando una tétrada. **d)** Degradación de tres de las megasporas permaneciendo sólo la megaspora funcional (MF). **f)** Primera división mitótica de la MF formando un saco embrionario binucleado. **g)** Resultado de la segunda división mitótica generando un saco con cuatro núcleos. **h)** Tercera división mitótica de la MF resultando en un coenocito de ocho núcleos. **i)** Celularización del saco maduro conteniendo siete células.

Por otra parte, en base a otros trabajos similares realizados con otros géneros y especies, así como por experiencia propia, se consideró como desarrollo “normal” Monospórico tipo-Polygonum cuando un 80% de las observaciones para cada uno de los estadios correspondió precisamente a las etapas y formas descritas por Maheshwari (1937, 1948, 1950) correspondientes a dicho patrón de desarrollo.

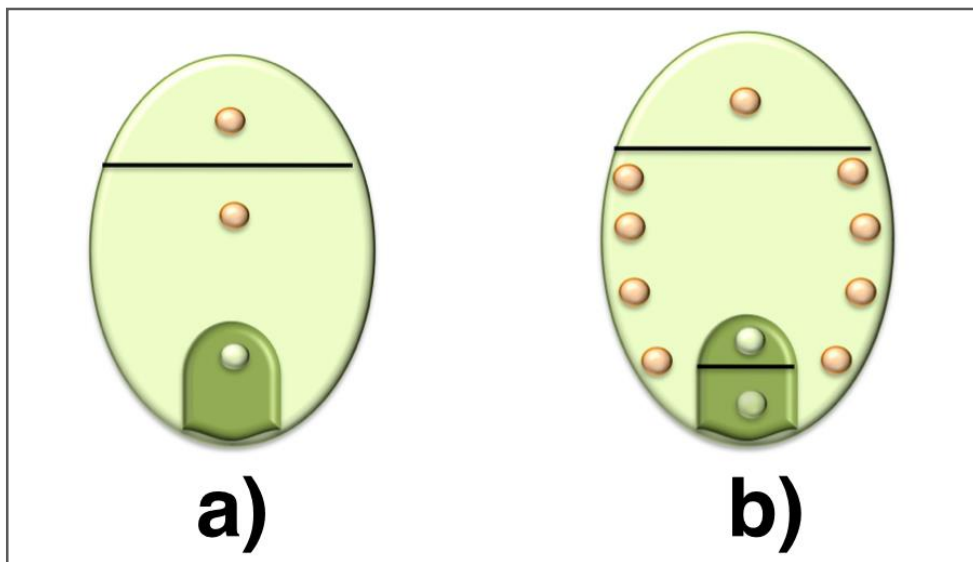
#### 7.4.1. ANÁLISIS ANTES DE LA POLINIZACIÓN

Para analizar la formación de los estadios de desarrollo correspondientes a: célula madre de la megaspora (CCM), primera división meiótica de la CCM (forma de díada), segunda división meiótica de la CCM (forma de tétrada), megaspora funcional (MF), primera división mitótica de la MF, segunda división mitótica de la MF, tercera división mitótica de la MF y saco maduro (Figura 9) se tomaron diez óvulos al azar correspondientes al ovario de una sola flor y analizando diez ovarios de 50 plantas distintas para el cultivar Simple y 50 para el cultivar Doble.



## 7.4.2. ANÁLISIS DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN

Para las variables estudiadas después de la polinización se analizaron los estados de formación y desarrollo del cigoto y la formación y tipo de endospermo, así como las divisiones del embrión hasta su estado globular, para lo cual se colectó un ovario por planta de 50 plantas correspondientes a los tratamientos de polinización var. Simple x Simple, var. Simple x Doble, y se examinaron diez semillas inmaduras tomadas al azar de cada fruto, analizando diez frutos por planta (Figura 10).

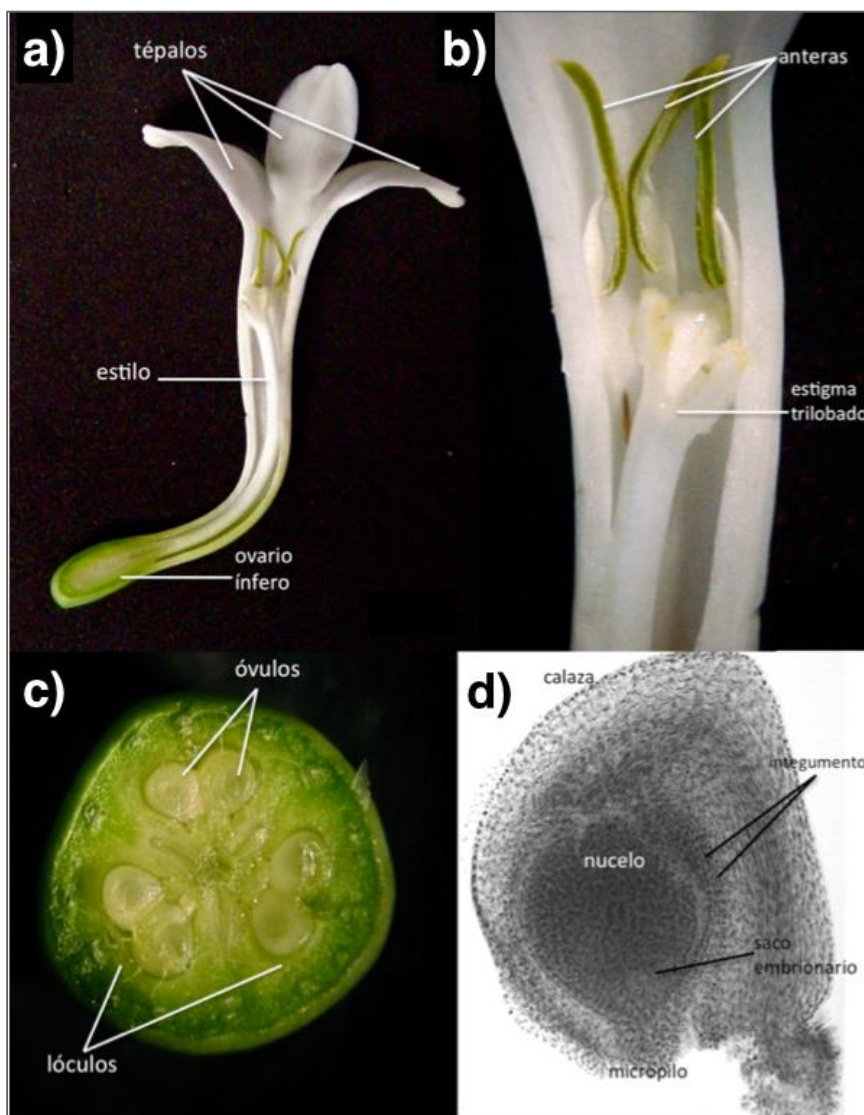


**Figura 10.** Estados de desarrollo post-fertilización. **a)** Formación del cigoto con núcleo polarizado al extremo calazal y primera división de la célula madre del endospermo. **b)** Primera división del embrión y formación de endospermo putativamente del tipo helobial.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. DESCRIPCIÓN DE LA FLOR Y SUS PARTES DE *POLIANTHES TUBEROSA* VAR. SIMPLE

Las flores de *Polianthes tuberosa* var. Simple son hermafroditas, esto es, son flores que poseen ambas estructuras reproductivas, masculina y femenina, se componen de un ovario ínfero, seis tépalos y seis estambres incluidos con inserción en la base de los segmentos o en el tubo (Solano, 2000). El gineceo tiene tres carpelos y un ovario trilobular, cada lóculo posee dos hileras de numerosos óvulos anátropos de placentación axilar (Figura 11) y en total cada ovario posee entre 66 y 72 óvulos.



### 8.1.1. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LOS ÓVULOS Y SEMILLAS INMADURAS DE *POLIANTHES TUBEROSA* VAR. SIMPLE

Se realizaron disecciones de botones florales de distintos tamaños, flores en estado de antesis y frutos inmaduros colectados desde el día 1 DDP y hasta el día 16 DDP donde pudieron ser encontrados los estados de desarrollo que comprenden desde la diferenciación de la célula madre de la megaspora del megasporangio y hasta el estado globular del embrión.

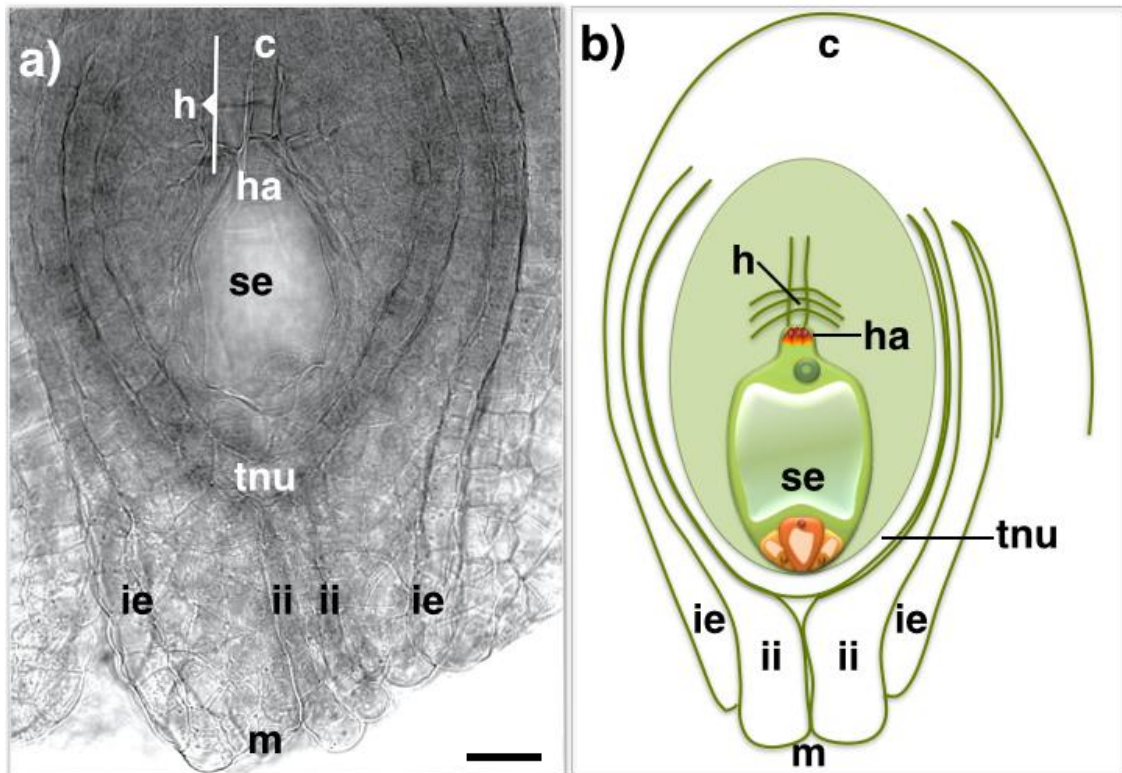
Los óvulos de *Polianthes tuberosa* var. Simple son anátropos, bitégmicos y crasinucelados. El desarrollo del saco embrionario tiene un origen Monospórico con formación de tétradas principalmente lineales (aunque otras formaciones fueron observadas), donde la célula calazal da lugar a un saco de ocho núcleos lo que lo tipifica como tipo-Polygonum con algunas variantes como la posición calazal del núcleo de la célula central y la permanencia o no permanencia de las antípodas en el saco maduro y hasta el momento de la fecundación, además de la formación de estructuras típicas de la familia como lo son la formación de un haustorio calazal y de la hipostasa (Figura 12).

El momento de la fecundación se observa al 6 DDP. A partir del 7 DDP la formación y el alargamiento del cigoto pueden ser observados, la primera división del cigoto fue encontrada en las muestras colectadas a 8 DDP. A partir del día ocho después de la polinización, una serie de divisiones en distintos planos genera un embrión globular el cual se observó a partir del día 16 DDP.

Las divisiones de la célula madre del endospermo se dan de manera precoz a las mostradas por el embrión. La formación del endospermo es del tipo helobial con el desarrollo de cámaras micropilar y calazales en el saco embrionario de la semilla inmadura.

A partir del día 17 DDP las muestras no pudieron ser analizadas ya que el tamaño de la semilla y lo denso de las capas que la cubren impedía su análisis bajo el microscopio tanto óptico como confocal.

Las dimensiones del saco embrionario en cada estado de desarrollo y el número de especímenes medidos se encuentran anexos al final del documento (Anexo A). Todos los estados de desarrollo resumidos arriba se describen a detalle a continuación.



**Figura 12.** a) Imagen y b) Representación esquemática de las partes que componen el óvulo maduro de *Polianthes tuberosa* var. Simple. c=calaza, m=micrópilo, ie=integumento externo, ii=integumento interno, tnu=tejido nucelar unicelular, se=saco embrionario, h=hipostasa, ha=haustorio. Barra en a=20  $\mu$ m

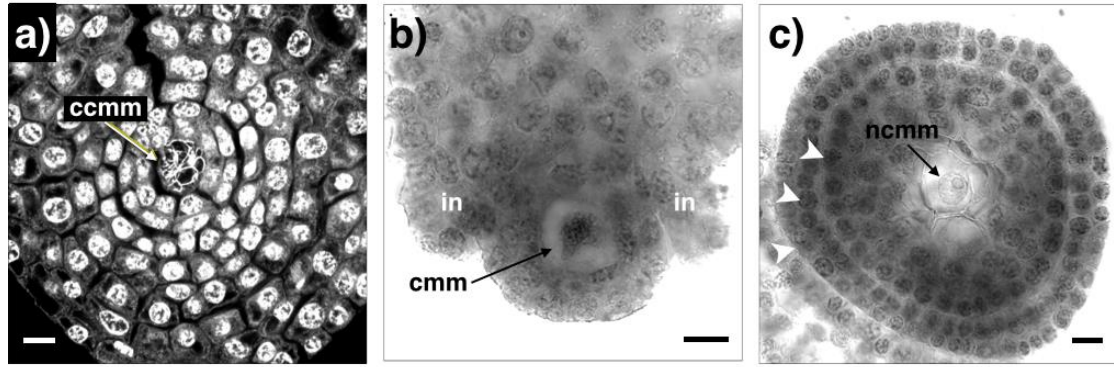
## 8.1.2. FORMACIÓN Y DESARROLLO DEL GAMETOFITO FEMENINO

Los estados de desarrollo que corresponden desde la diferenciación de la célula madre de la megaspora y hasta la tercera división mitótica del saco embrionario pudieron ser observados en los distintos tamaños de botones florales colectados, la cariogamia de los núcleos polares fue encontrada en las muestras analizadas a partir de flores recién abiertas, finalmente, las observaciones correspondientes a los sacos maduros donde el núcleo de la célula central ya está completamente integrado se observó en las flores con estigmas receptivos, de la misma manera a lo reportado en manzana por Carlone (1962) y en *Agave tequilana* por González-Gutiérrez y col. (2014) donde la receptividad del estigma de las flores se encuentra íntimamente relacionado con la madurez de los sacos embrionarios de las mismas.

### 8.2.2.1. Megasporogénesis

La megasporogénesis inicia con la diferenciación de una sola célula arqueosporial que se convierte en la célula madre de la megaspora (CMM) la cual se distingue de las demás células del tejido del primordio del óvulo ya que posee un mayor tamaño a las células circundantes, su forma es de semicircular a circular con un diámetro promedio de  $18.69 \pm 2.33 \mu\text{m}$ , su núcleo es denso y bien delimitado, en ocasiones es posible observar la cromatina desorganizada en el núcleo a manera de filamentos (Figura 13a).

La CMM se encuentra profundamente embebida en el tejido nucelar por lo que para su observación en el microscopio confocal fue necesario retirar las capas sub-epidérmicas que le cubrían (Figura 13a). La CMM comienza a aumentar de tamaño y se observa desplazada hacia el extremo micropilar del óvulo. En esta etapa de formación comienzan a diferenciarse los integumentos (Figs. 13b y c).

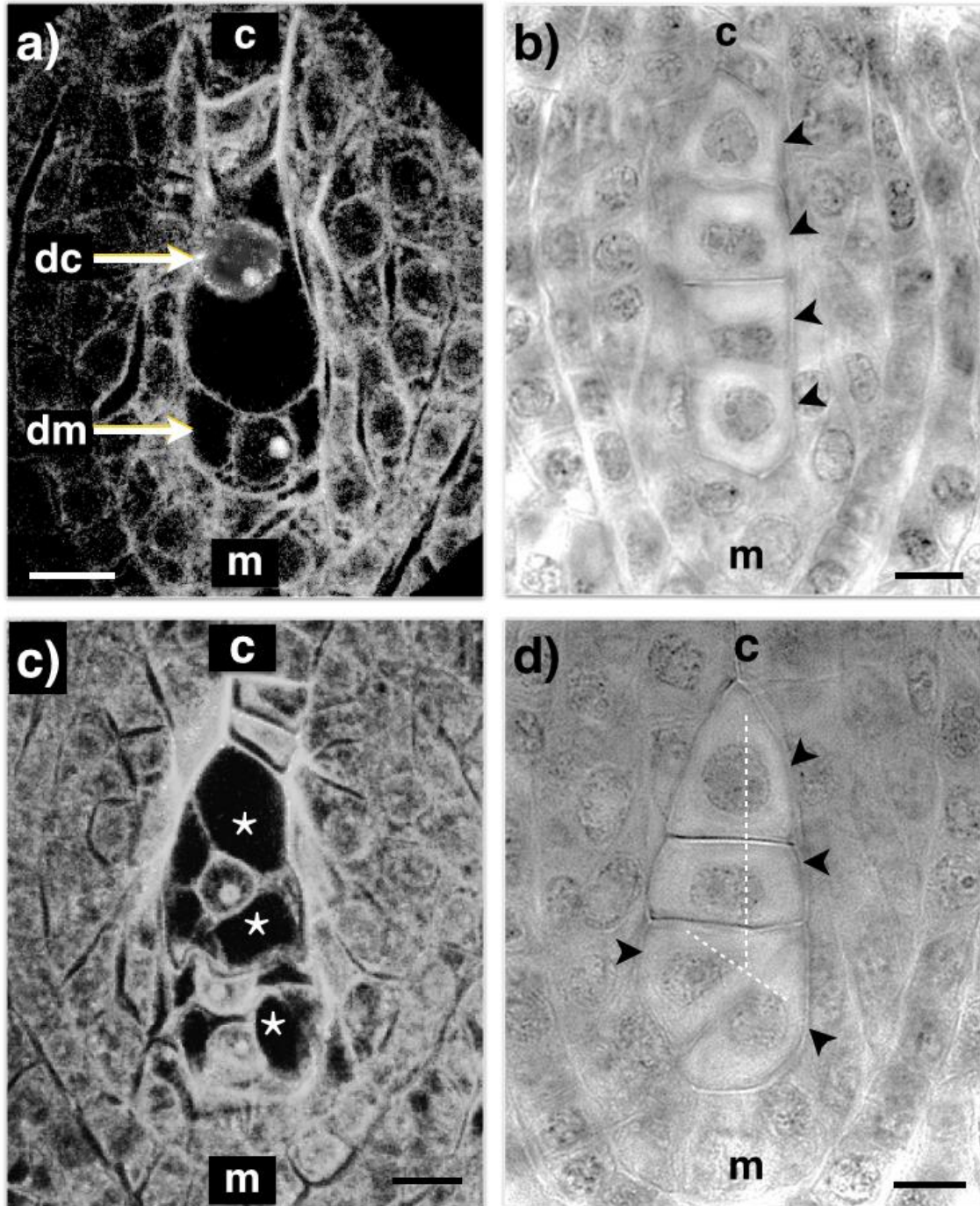


**Figura 13.** Célula madre de la megaspóra de *Polianthes tuberosa* var. Simple. **a)** Cromatina condensándose en el núcleo de la célula madre de la megaspóra (CCMM). **b)** Célula madre de la megaspóra situada en el extremo micropilar del saco (CMM), se observa el inicio de la formación de los integumentos del óvulo. **c)** Corte transversal de un óvulo mostrando las capas de células sub-epidérmicas que cubren la CMM. ccmm=cromatina de la célula madre de la megaspóra, ncmm=núcleo de la célula madre de la megaspóra, cmm=Célula madre de la megaspóra, in=integumentos, cabeza de flecha=células sub-epidérmicas del óvulo. Barras=10  $\mu\text{m}$ .

La CMM (diploide) se divide por meiosis generando en la Meiosis I una díada de células haploides de tamaño similar entre ellas o siendo la célula calazal ligeramente más grande que la célula micropilar (Figura 14a), la Meiosis II da lugar a una tétrada de células comúnmente de forma linear paralelas al eje calazal-micropilar (Figura 14b), el tamaño promedio de la tétrada es de  $52.95 \pm 3.89 \mu\text{m}$  de largo y  $19.07 \pm 1.45 \mu\text{m}$  de ancho. Ambos integumentos continúan su crecimiento rodeando al óvulo y acercándose cada vez más a la región micropilar.

Del total de observaciones realizadas en este estado el 73.68% de las tétradas poseían una conformación linear (Figura 14b), sin embargo, se pudo observar la presencia de otras formas en el arreglo de la tétrada, en el 21.05% de las observaciones restantes pudo ser observada la formación de tétradas en forma de "T" donde las dos megasporas micropilares se encuentran una al lado de la otra o en una forma intermedia donde las dos megasporas más cercanas al micrópilo están separadas por una división oblicua en lugar de una división completamente transversal (Figura 14d).





**Figura 14.** Proceso de Megasporogénesis en *Polianthes tuberosa* var. Simple. **a)** Díada. **b)** Tétrada lineal. **c)** Tríada. **d)** Tétrada con forma intermedia entre “T” y lineal donde las dos megasporas más cercanas al micrópilo están separadas por una división oblicua al eje calazal-micropilar. c=calaza, m=micrópilo, d=díada, asteriscos=megasporas que conforman la tríada, cabezas de flecha=megasporas que componen la tétrada, líneas punteadas en (d) marcan la formación en “T” de la tétrada. Barras=10  $\mu$ m.

El arreglo linear de la tétrada ha sido reportado como el patrón común en diversas especies del orden Aparagales tal es el caso de *Agave fourcroydes* y *A. angustifolia* (Piven y col., 2001), *A. tequilana* (Escobar-Guzmán y col., 2008; González-Gutiérrez y col., 2014) *Scilla greilhuberi* y *S. puschkinoides* (Svoma y Greilhuber, 1987), *Triteleia* (Berg, 2003), *Hymenocallis caribaea* (Raymúndez y col., 2008) e *Iris mandshurica* (Zhang y col., 2011) entre otras. Algunas autores reportan la formación de tétradas lineares y en forma de "T" por igual, tal es el caso de *A. virginica* (Regen, 1941), *A. lechuguilla* (Grove, 1941) y *Yucca aloifolia* (Wolf, 1940). Watkins (1937) reportó para *Yucca rupicola* la formación frecuente de la forma intermedia entre linear y "T" similar a la reportada en el presente estudio para *Polianthes tuberosa* var. Simple.

Por otra parte, en algunas observaciones aisladas (5.26%) se encontró la formación de tríadas en lugar de tétradas (Figura 14c), eventos observados de igual manera por Regen (1941) en *Agave virginica* quien interpreta la presencia de tríadas como la posible no división de una de las megasporas de la díada al entrar a la meiosis II. Gómez-Rodríguez y col. (2012) observaron la formación de tríadas en la microsporogénesis del polen de *Agave tequilana* y *A. angustifolia* las cuales se formaban mediante un mecanismo donde una falla en la meiosis II en una de las células de la díada impedía la formación de pared celular en los núcleos hijos, los cuales finalmente se restituyen, dando lugar a la formación de una microspora  $2n$  y dos microsporas  $n$ .

En la gametogénesis femenina, si el origen de la megaspora funcional fuera  $2n$  daría lugar a la formación de gametos no reducidos, esto es, células huevo con la misma ploidía que las células del esporofito. La formación de gametos no reducidos tanto masculinos como femeninos ha sido de gran utilidad para la generación de plantas poliploides en cultivos de interés tales como alfalfa (Tavoletti, 1994).



En el desarrollo normal de la tétrada, tres de las megasporas, las más cercanas al extremo micropilar se degradan mientras que la célula calazal permanece intacta, siendo ésta la responsable de la formación del saco embrionario, por lo cual, el patrón de megagametogénesis en *Polianthes tuberosa* var. Simple se puede tipificar como del tipo-Monospórico. Este proceso donde sólo sobrevive la megaspora del extremo calazal se da de manera semejante en la gran mayoría de las angiospermas incluyendo a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y en una de las plantas monocotiledóneas más representativa en los estudios embriológicos: *Zea mays* (Yang y col., 2010). Dentro de la familia, este fenómeno se presenta en *Scilla greilhuberi* y *S. puschkinoides* (Svoma y Greilhuber, 1987), *Yucca aloifolia* (Wolf, 1940), *Agave virginica* (Regen, 1941), *Agave tequilana* (Escobar-Gúzman, 2008; González-Gutiérrez y col., 2014); mientras que en la especie *Y. filamentosa* Reed (1903) reportó que es la segunda megaspora en el sentido calazal-micropilar la que permanece intacta mientras las otras tres megasporas se degradan. Por su parte, Piven y col. (2001) mencionan que en las especies *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* el desarrollo del saco se da a partir de dos de las megasporas más cercanas al extremo calazal; este patrón de desarrollo es denominado Bispórico del tipo *Allium*, desarrollo similar al que presentan otras especies representantes de la familia Asparagaceae como *Scilla pérsica* (Svoma y Greilhuber, 1987).

Los restos de las megasporas degradadas pueden observarse como manchas intensamente teñidas en el extremo micropilar del saco embrionario y se mantienen detectables hasta la primera división mitótica de la megaspora funcional (MF) (Figuras 15 b y c), hecho similar a lo reportado por Wolf (1940) en *Yucca aloifolia* y Regen (1941) en *Agave virginica* donde mencionan que los restos de las megasporas degradadas se observaron hasta el estado desarrollo del saco embrionario de cuatro núcleos.

### 8.2.2.2. Megagametogénesis

El proceso de la megagametogénesis inicia con un aumento en tamaño de la megaspóra que se mantiene viable ( $47.64 \pm 5.48 \mu\text{m}$  de largo por  $27.99 \pm 3.55 \mu\text{m}$ ) convirtiéndose así en la megaspóra funcional (MF) (Figura 15a) (Yang y col. 2010; González-Gutiérrez y col., 2014). LA MF posee un núcleo grande y bien definido el cual suele localizarse en el primero o segundo tercio del saco embrionario en desarrollo (sentido calazal-micropilar) (Figura 15b).

Los integumentos completan su desarrollo, el integumento interno rodea por completo la región micropilar del óvulo dejando libre sólo un pequeño espacio al centro del micrópilo. Se observa además de ambos integumentos una línea uniseriada de células de origen nucelar que rodea la totalidad del saco embrionario, esta estructura es similar a la observada por Tilton y Mogensen (1980) en *Agave parryi*.

Por otra parte, en esta etapa comienza a ser evidente la formación de la hipostasa, un tejido que se forma inmediatamente arriba de la MF la cual está al parecer formada por un grupo de células con paredes celulares bastante engrosadas que son fácilmente detectadas tanto en el microscopio óptico como en el confocal debido a que se tiñen de manera más intensa que el resto de las células, dicha formación de células parece estar conectada a través del tejido nucelar del óvulo a los haces vasculares del mismo.

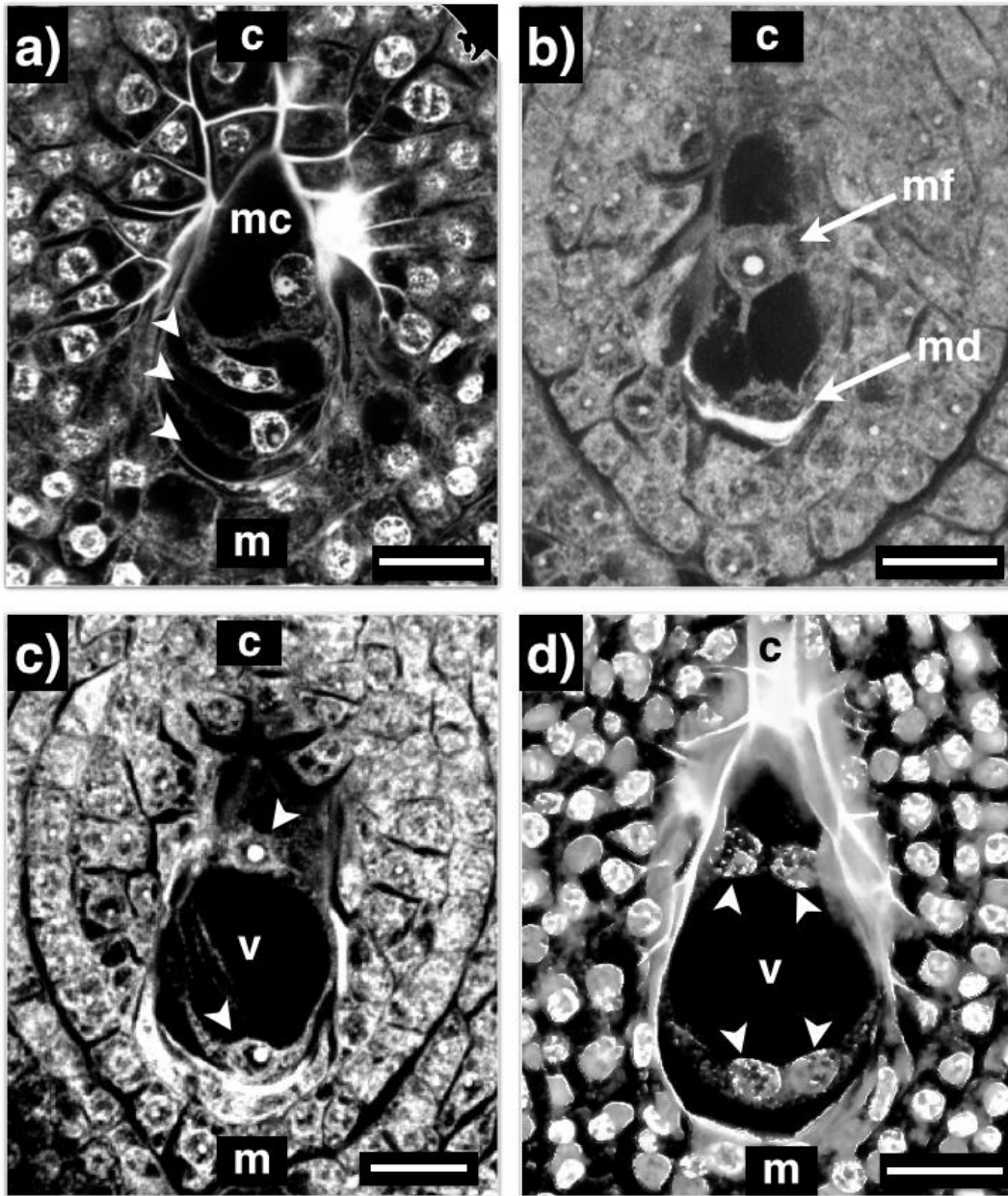
Según Tilton (1980) la formación de la hipostasa ocurre durante la interfase meiótica-mitótica de la MF, donde al igual que en el presente estudio las células nucleares cercanas a la parte inferior de la calaza son teñidas más densamente que las células vecinas, Tilton propone que la función principal de dicha estructura se centra en la translocación de nutrientes al interior del saco embrionario tanto antes como después de la fertilización.

La formación de la hipostasa está reportada como un carácter frecuente entre las agaváceas (ahora sub-familia Agavoideae) (Tilton y Mogensen, 1980) y otras familias de la clase de las monocotiledóneas (Rudall 1997).

La MF sufre una primera división mitótica formando un saco binucleado ( $62.42 \pm 6.90 \mu\text{m}$  de largo por  $39.11 \pm 5.40 \mu\text{m}$ ), los núcleos recién formados migran uno hacia el extremo micropilar y el otro al extremo calazal del saco, donde son divididos por una amplia vacuola central (Figura 15c), una vez situados en los extremos, una segunda división mitótica genera un saco con cuatro núcleos (dos en cada extremo), los cuales se mantienen muy cerca de la paredes del saco embrionario y que continúan separados mediante la vacuola central la cual al igual que el saco muestran un aumento continuo de tamaño midiendo  $77.31 \pm 5.96 \mu\text{m}$  de largo por  $54.62 \pm 5.98 \mu\text{m}$  (Figura 15d).

La división mitótica de los núcleos se da de forma sincrónica en ambos polos del saco de la misma forma que se da en *Agave tequilana* (González-Gutiérrez y col., 2014) y *Zea mays* (Huang y Sheridan, 1994) y de forma contraria a lo reportado por Grove (1941) donde la división mitótica ocurre primero en los núcleos del extremo micropilar del saco embrionario.

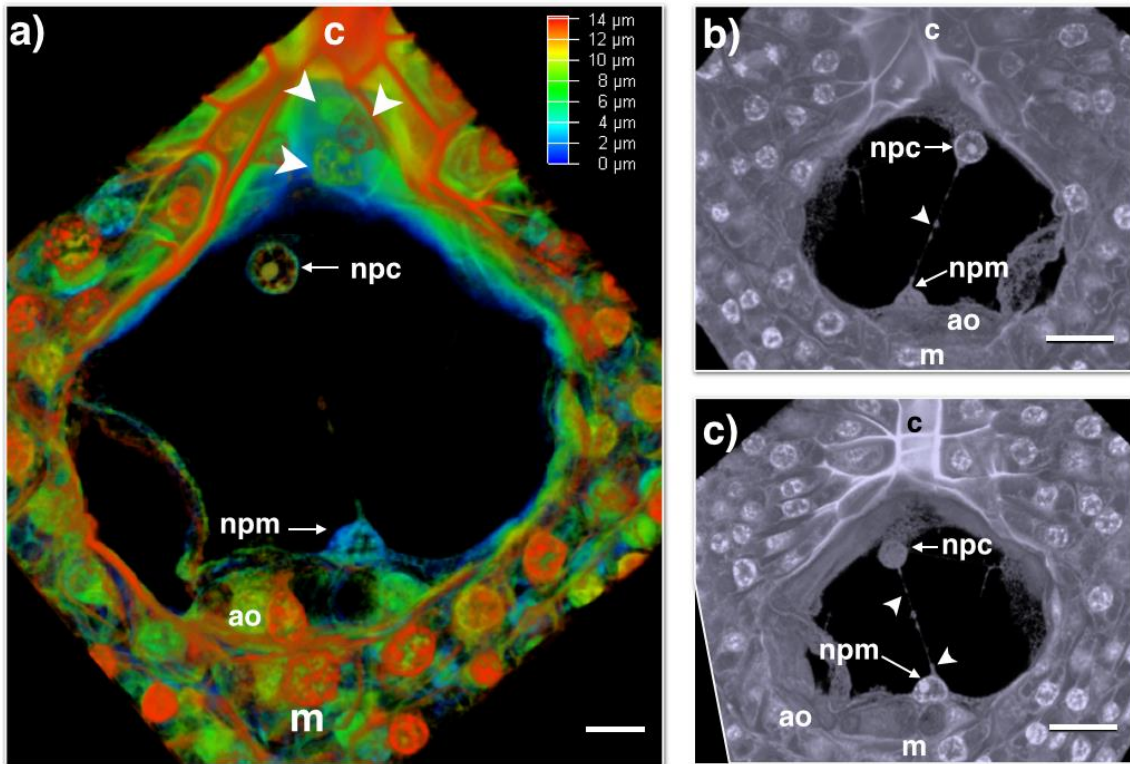
Hasta esta etapa del desarrollo, el saco exhibe una forma de ovoide a piriforme siendo más estrecho en su extremo calazal y más ancho hacia su extremo micropilar. En el extremo calazal se observa el desarrollo de un tubo estrecho llamado tubo haustorial el cual es similar al reportado por Tilton (1978) en *Ornithogalum caudatum* donde la hipostasa se encuentra rodeando el tubo haustorial calazal. El tubo haustorial se observa como una invaginación hacia el tejido nucelar del óvulo por lo que diversos autores le atribuyen funciones de nutrición hacia el saco embrionario (Reed, 1903; Watkins, 1937; Wolf, 1940; Rudall, 1997).



**Figura 15.** Megagametogénesis en *Polianthes tuberosa* var. Simple. **a)** Tétrada lineal, se observan las tres células más próximas al extremo micropilar en proceso de desintegración mientras la más cercana al extremo calazal del saco incrementa su tamaño. **b)** Megaspóra funcional y restos de las megasporas degradadas en la parte inferior de la misma. **c)** Primera división mitótica del saco embrionario mostrando dos núcleos divididos por una vacuola central. **d)** Saco embrionario con cuatro núcleos, dos en cada extremo del saco (eje calazal-micropilar). c=calaza, m=micrópilo, mc=megaspóra calazal, mf=megaspóra funcional, md=megasporas degradadas, v=vacuola central, cabezas de flecha en a=megasporas en proceso de degradación, cabezas de flecha en c=núcleos calazal y micropilar primarios, cabezas de flecha en d=núcleos producto de la segunda división meiótica del saco embrionario. Barras=20  $\mu\text{m}$ .

Una tercera división mitótica origina un saco embrionario con ocho núcleos, cuatro en cada extremo del saco y que al igual que en la segunda división mitótica suceden de forma sincrónica. En este momento el extremo calazal del saco el tubo haustorial se hace más evidente y es donde se sitúan tres de los cuatro núcleos recién formados, el núcleo restante se sitúa inmediatamente debajo de ellos. En el extremo calazal los cuatro núcleos se encuentran alineados a la pared micropilar del saco embrionario (Figura 16).

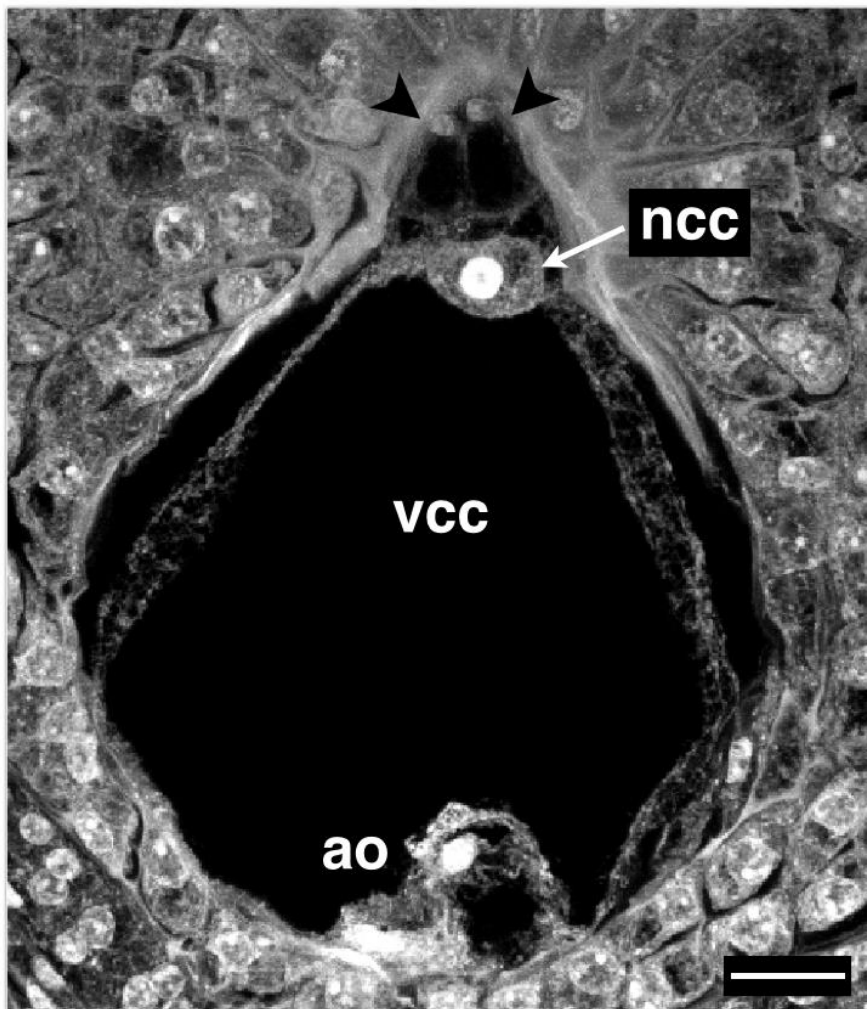
Finalmente, uno de los cuatro núcleos del extremo micropilar que se convertirá en el núcleo polar micropilar comienza a migrar a través de la vacuola central hacia el extremo calazal del saco hasta encontrarse con el único núcleo que se observa fuera del tubo haustorial, dicho núcleo se convertirá en el núcleo polar micropilar. Al realizar una reconstrucción en 3D se pueden observar filamentos delgados que conectan a ambos núcleos polares (Figura 16b y c). Según Tilton y Lersten (1980) dichos filamentos están formados de citoplasma y proporcionan el vehículo por el cual los núcleos polares pueden unirse. Ikeda (1902 en Tilton y Lersten, 1980) sostiene la hipótesis que estas conexiones citoplasmáticas que se encuentran entre los distintos tipos celulares del saco embrionario proporcionan los medios por los cuales las antípodas, la célula central y el aparato ovular se mantienen en contacto.



**Figura 16.** Proyección en 3D de un saco embrionario con ocho núcleos de *Polianthes tuberosa* var. Simple. **a)** La proyección muestra en distintos colores la profundidad en la que cada estructura y núcleo se encuentran situados. **b)** y **c)** Se observa la formación de un “filamento de citoplasma” que une al núcleo polar micropilar con el calazal. c=calaza, m=micrópilo, ao=aparato ovular, npc=núcleo polar calazal, npm=núcleo polar micropilar, cabezas de flecha en a=antípodas, cabezas de flecha en b y c=“filamentos de citoplasma” que conectan a los núcleos polares entre sí. Barras=20  $\mu$ m.

### 8.2.2.3. Caracterización del saco embrionario maduro

Con la migración de uno de los núcleos micropilares al extremo calazal, el saco embrionario pronto adquiere su conformación final y sus núcleos se celularizan; siendo las tres células contenidas en el tubo haustorial las antípodas, los núcleos situados debajo del tubo haustorial los núcleos polares contenidos en la célula central y las tres células del extremo micropilar el aparato ovular por lo que el desarrollo normal del saco embrionario de *Polianthes tuberosa* var. Simple es en el presente trabajo clasificado como Monospórico del tipo-Polygonum (Figura 17) descrito por Maheswari (1937; 1948).



**Figura 17.** Saco maduro desarrollado en *Polianthes tuberosa* var. Simple monospórico tipo-Polygonum. ncc=núcleo de la célula central, vcc=vacuola de la célula central, ao=aparato ovular, cabezas de flecha=antípodas. Barra=20  $\mu$ m.

Del total de muestras analizadas es en este estado de desarrollo el 81.66% de las observaciones correspondieron a dicho patrón, el tamaño promedio del saco maduro fue de  $152.02 \pm 5.54 \mu\text{m}$  de largo por  $129.74 \pm 5.41 \mu\text{m}$ , en el resto de las observaciones se detectó la presencia de malformaciones y/o anormalidades en el desarrollo del saco embrionario. Estas anormalidades fueron clasificadas en tres grupos principales:

a) Sacos embrionarios en estados de desarrollo atrasados, es decir, sacos embrionarios que no correspondían al estado de desarrollo encontrado en el resto de óvulos de un mismo ovario en este caso al estado de saco maduro y/o con sus núcleos fuera de posición (Figura 18a) y que correspondieron al 1.66% de las muestras estudiadas.

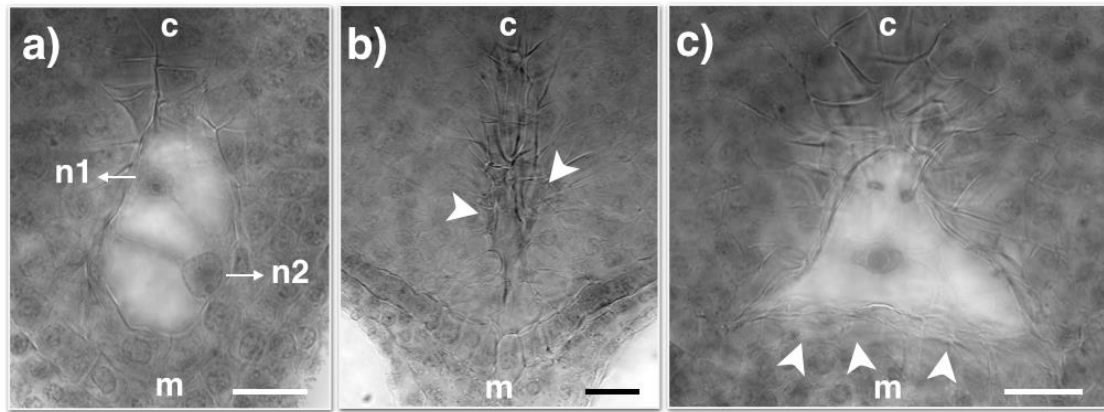
b) Sacos embrionarios colapsados donde se observa la degradación de los sacos embrionarios contenidos en los óvulos y el crecimiento del tejido nucelar hacia este espacio (Figura 18b) (10%).

c) Sacos embrionarios donde no se observó la formación del aparato ovular debido a un engrosamiento anormal de la capa de tejido unicelular nucelar que recubre el óvulo en su extremo micropilar. Estos sacos embrionarios usualmente pierden su forma piriforme mostrando una forma de media luna (Figura 18c). A este grupo correspondieron 6.66% de los especímenes analizados.

Regen (1941) describió en *Agave virginica* la presencia de una gran cantidad de óvulos “improductivos” donde las células reproductivas no eran formadas debido a la degeneración del tejido nucelar y esporógeno.



Por su parte, Cappeletti (1927 en Regen 1941) refiere la presencia de una breve hipertrofia de los núcleos nucleares seguida de la degeneración celular de este tejido finalizando en el colapso o descomposición del saco embrionario.



**Figura 18.** Malformaciones encontradas en el saco embrionario maduro de *Polianthes tuberosa* var. Simple. **a)** Saco embrionario en un estado de desarrollo atrasado con sólo dos núcleos en su interior. **b)** Saco embrionario colapsado con alargamiento del tejido nucelar hacia dicha zona. **c)** Saco embrionario con ausencia de aparato ovular y un crecimiento anormal del tejido nucelar uniseriado. c=calaza, m=micropilo, n1=núcleo uno, n2=núcleo dos, cabezas de flecha en b=colapsamiento del saco, cabezas de flecha en c=crecimiento anormal del tejido nucelar uniseriado. Barras=20  $\mu$ m.

#### 8.2.2.3.1. Antípodas

Las antípodas se observaron como tres células de menor tamaño que el resto de las células del saco embrionario maduro ( $7.68 \pm 0.34 \mu\text{m}$  de largo por  $6.46 \pm 0.43 \mu\text{m}$  de ancho). Éstas se encuentran localizadas dentro del tubo haustorial y presentan una morfología triangular por lo regular con su núcleo polarizado hacia el extremo calazal (Figuras 17 y 19a).

El arreglo de las antípodas dentro del tubo haustorial es diverso pudiéndose observar todas en un mismo plano dispuestas en forma de pirámide, en un acomodo linear paralelo al eje calazal-micropilar o situándose una detrás de la otra en distintos planos focales en el eje "z".

En ocasiones no fue posible detectar la presencia de las antípodas por lo que su comportamiento dentro del saco parece ser variable pudiéndose desintegrar antes de la cariogamia de los núcleos polares (Figura 19b) o permaneciendo intactas incluso hasta el momento de la doble fecundación. Según Tilton (1978), las antípodas son las células que más varían en su comportamiento dentro del gametofito femenino maduro, el único rasgo que comparten entre sí es su ubicación en el extremo calazal del saco; las antípodas pueden ser efímeras, desintegrándose poco después de su formación como en el caso de *Agave virginica* (Regen, 1941), *Glycine max* (Kennell y Horner, 1985), *Scilla persica* y *S. fuseorum* (Svoma y Greilhuber, 1987), *Triticum aestivum* (Whei-cheng y col., 1988; Li-Hua y Rui-Lin, 2004), *Passiflora edulis* (Magalhães de Souza y col., 2002), *Sargentodoxa cuneata* (Wang y col., 2009) y *Cichorium intybus* (Chehregani y col., 2011) o persistir incluso después del evento de fecundación (Williams y Friedman, 2004). En *Tofieldia glutinosa*, las antípodas incluso proliferan en la etapa de maduración del saco embrionario, encontrándose hasta ocho núcleos antipodales (Holloway y Friedman, 2008); otro ejemplo de ello se observa en la mayor parte de los miembros de la familia Poaceae donde el número de antípodas varía entre seis y 300 (Anton y Cocucci, 1984).

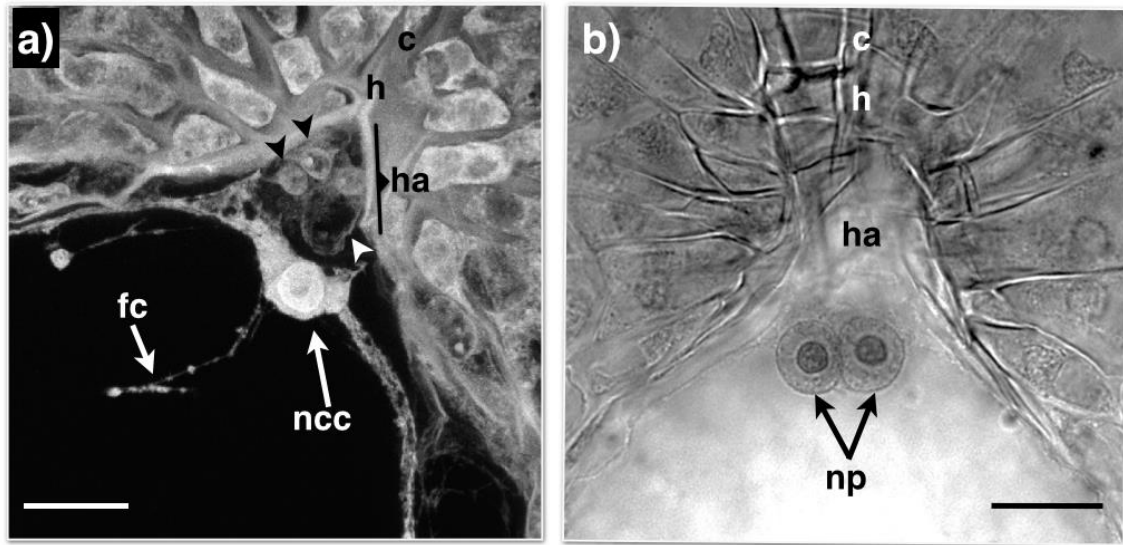
Por otro lado, malas interpretaciones en la tipificación del gametofito femenino de algunas especies se han dado debido a la dificultad para visualizar las antípodas mediante su análisis bajo el microscopio óptico, debido principalmente a su posición calazal en el saco embrionario sobre todo cuando se encuentran contenidas dentro de estructuras como los haustorios (Maheswari, 1948, 1950).

El saco embrionario de *Arabidopsis thaliana* (Murguía y col., 1993) había sido considerado en su madurez como un saco tetra-nucleado comprendiendo sólo dos sinérgidas, la célula huevo y la célula central. Sin embargo, recientemente Son y col., (2014) confirmaron mediante la expresión por fluorescencia de genes reporteros que dichas células antípodas permanecen en el saco hasta su madurez.

#### **8.2.2.3.2. Célula central: cariogamia de los núcleos polares**

Los núcleos polares son muy similares entre sí, poseen una forma esférica a semiesférica y un tamaño aproximado de  $10.17 \pm 1.48 \mu\text{m}$  de diámetro, según Tilton (1981), ambos núcleos poseen un tamaño y morfología similar de tal manera que es difícil distinguir uno del otro (Figura 19b), sin embargo, Maheshwari (1941) considera que el núcleo originario del extremo micropilar puede llegar a ser más grande que el núcleo polar calazal, si llega a existir alguna diferencia en tamaño.

La distancia entre los núcleos polares es cada vez más reducida observándose uno a un lado del otro, sus membranas entran en contacto fusionándose, pudiéndose observar en ocasiones un sólo núcleo con dos protonúcleos en su interior. Finalmente, como resultado de la cariogamia de los núcleos polares se genera el núcleo de la célula central (Figura 19a). El núcleo de la célula central posee una forma semicircular u ovoide con un tamaño promedio de  $15.85 \pm 1.11 \mu\text{m}$  de largo por  $16.41 \pm 1.21 \mu\text{m}$  de ancho.



**Figura 19.** Extremo calazal del saco embrionario de *Polianthes tuberosa* var. Simple. a) Células antipodales presentes en el tubo haustorial después de la fusión de los núcleos polares formando el núcleo de la célula central. b) Núcleos polares momentos antes de la cariogamia. c=calaza, ha=tubo haustorial, h=hipostasa, fc=filamentos de citoplasma, np=núcleos polares, cabezas de flecha=células antipodales. Barras=20 µm.

El núcleo de la célula central al igual que los núcleos polares conserva su polaridad hacia el extremo calazal del saco (Figura 19a), esta polaridad es observada de manera similar en *Yucca rupicola* (Watkins, 1937), *Hemiphylacus alatostylus* (Rudall y col., 1997) y *Tofieldia glutinosa* (Holloway y Friedman, 2008). Sin embargo, según Tilton (Tilton 1978; 1981) los núcleos polares de la célula central de la mayor parte de las angiospermas migran hacia el centro del saco para formar el núcleo de la célula central, tal es el caso del maíz (Huang y Sheridan, 1994) y *Arabidopsis thaliana* (Olsen, 2004). Dentro de las agavaceas se puede encontrar esta formación en *Agave fourcroydes* y *A. angustifolia* (Piven y col., 2001) así como en *A. lechuguilla* (Grove, 1941). Según Maheswari (1950), la posición del núcleo de la célula central cargada hacia el extremo calazal del saco embrionario es un indicativo de que se desarrollará endospermo de tipo helobial una vez efectuada la fecundación.

### 8.2.2.3.3. Aparato ovular

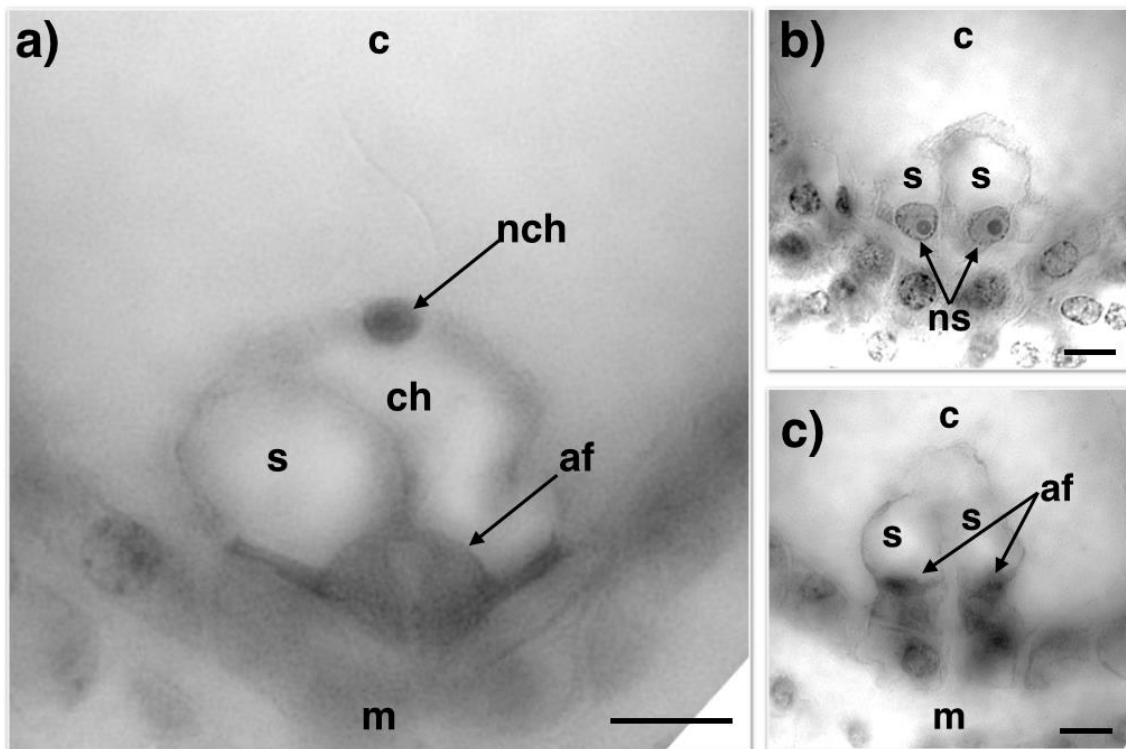
El aparato ovular se sitúa en el extremo micropilar del saco embrionario y está compuesto de tres células, dos sinérgidas y la célula huevo. El arreglo del aparato ovular es diverso por lo que fue posible observar las dos sinérgidas una al lado de la otra en un mismo plano focal, mientras la célula huevo se encontraba en medio de las dos sinérgidas en un plano focal distinto, en otras ocasiones las tres células se observaron en un mismo plano focal encontrándose a la célula huevo en uno de los extremos del aparato ovular o estando una sinérgida detrás de la otra y la célula huevo compartiendo el plano focal con una de ellas situándose al lado de la misma.

Las sinérgidas poseen una forma muy similar entre ellas, sus núcleos se encuentran altamente polarizados hacia el extremo micropilar del saco, observándose una vacuola hacia el extremo calazal (Figura 20b). Una de sus paredes se encuentra en contacto con el borde del saco embrionario, sin embargo, se encuentran separadas entre ellas por un pequeño espacio (Figura 20c). En la base de ambas sinérgidas fue posible apreciar el aparato filiforme (Figura 20a y c); el tamaño promedio de las sinérgidas es de  $16.76 \pm 0.30 \mu\text{m}$  de largo y  $12.92 \pm 0.47 \mu\text{m}$  de ancho.

La célula huevo se observó con muy variadas morfologías, sin embargo, siempre altamente polarizada con un núcleo denso hacia el extremo calazal y la vacuola hacia el extremo micropilar (Figura 20a).

Esta polaridad se presenta de manera general en la mayoría de las angiospermas pudiéndose observar el núcleo en el extremo calazal de la célula con una sola vacuola de gran tamaño en el extremo contrario, como el caso de *Nicotiana tabacum* (Mogensen y Sutar, 1979; Tian y col., 2005) o situándose en ocasiones en el segundo tercio de la célula huevo con un gran número de pequeñas vacuolas que se distribuyen a su alrededor (Russell, 1993).

Las dimensiones de la célula huevo son de  $25.96 \pm 1.60 \mu\text{m}$  de largo y  $22.89 \pm 1.59 \mu\text{m}$  de ancho.



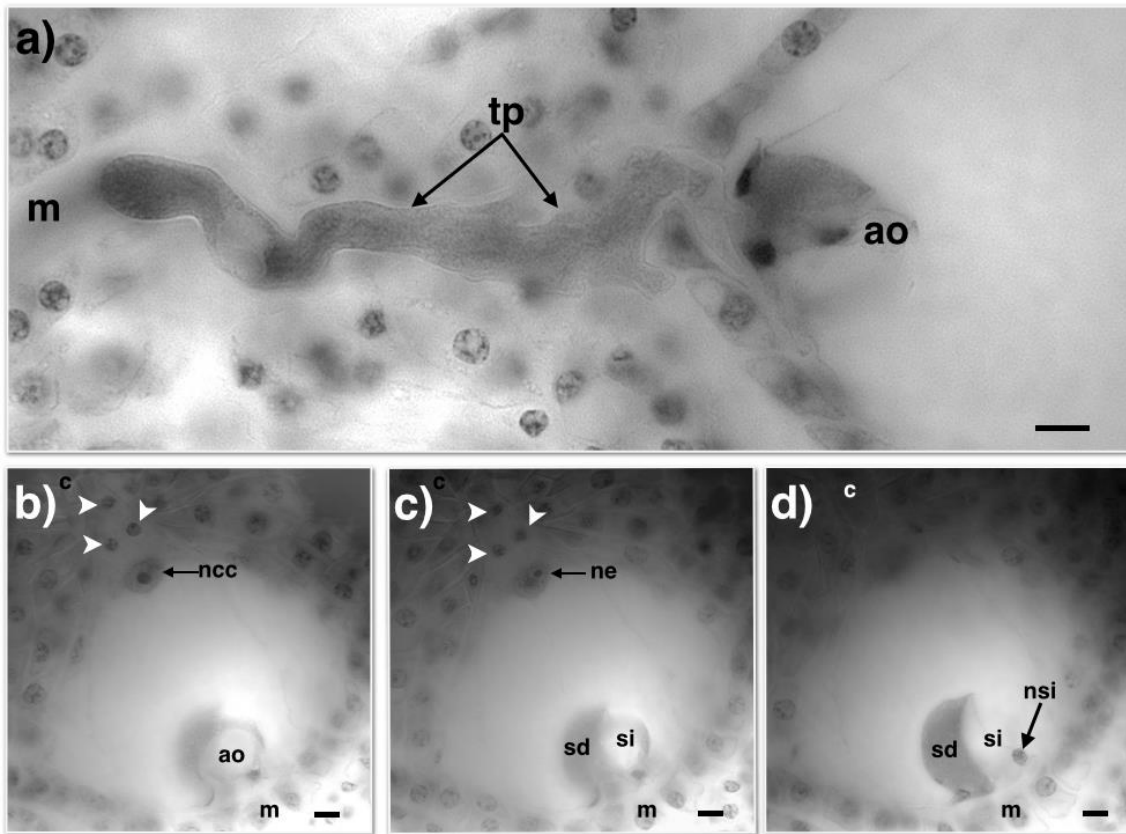
**Figura 20.** Aparato ovular formado en los saco embrionarios de *Polianthes tuberosa* var. Simple. **a)** Aparato ovular conformado por la célula huevo con su núcleo polarizado hacia el extremo calazal y dos células sinérgidas en un segundo plano donde se observa la formación del aparato filiforme. **b)** Sinérgidas con sus núcleos polarizados hacia el extremo micropilar del saco y el espacio vacuolado hacia el extremo calazal del mismo. **c)** Aparato filiforme de las sinérgidas. Barras=10  $\mu\text{m}$ .

### 8.2.3. LA DOBLE FECUNDACIÓN

El proceso de la doble fecundación fue observado en las muestras de óvulos colectados el día 6 DDP. En el extremo micropilar del saco embrionario de los óvulos fecundados es posible apreciar parte del tubo polínico el cual permanece sujeto a los integumentos del óvulo. El tubo polínico se abre paso a través de los integumentos exterior e interior y posteriormente entra en contacto con el extremo micropilar del saco embrionario a través de las células del tejido nucelar uniseriado hasta hacer contacto con las células del aparato ovular al interior del saco embrionario (Figura 21a).

Al parecer los núcleos espermáticos son descargados en una de las sinérgidas la cual se observa en las preparaciones como una media luna teñida en su totalidad de un color intenso (Figura 21c y d), esto debido probablemente a la ruptura o desintegración del núcleo de la sinérgida el cual libera su contenido hacia el espacio vacuolado de la misma, sin embargo, no está claro si la desintegración de dicha sinérgida se debe a un efecto mecánico ejercido sobre la misma por la llegada del tubo polínico o si esta desintegración es causada por señales emitidas por el tubo polínico a la sinérgida previo a su llegada (Russell, 1992; Punwuani y Drews, 2008).

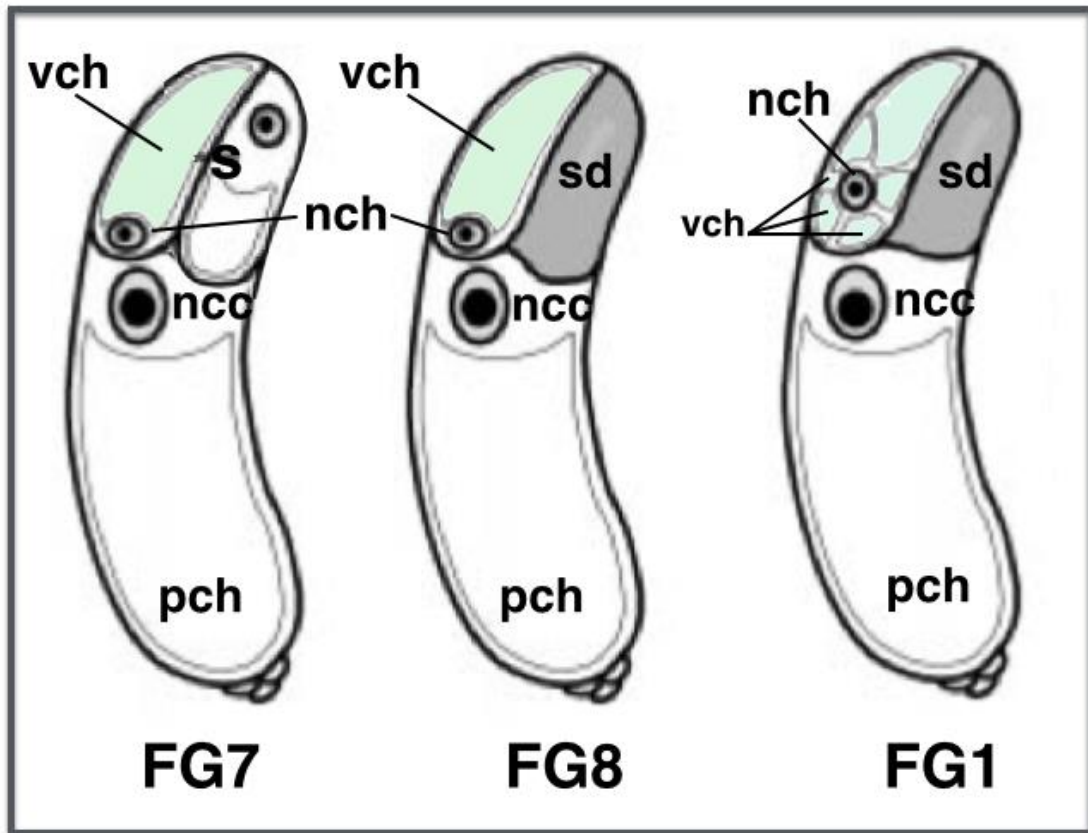
Así mismo, la célula huevo se observa en un plano focal distinto, esta célula se encuentra intacta (Figura 21a), sin embargo, no es posible observar la posición en que se encuentra su núcleo, adyacente a la sinérgida que se desintegra se encuentra la otra sinérgida intacta con su núcleo polarizado hacia el extremo micropilar y la vacuola polarizada hacia el extremo calazal del saco (Figura 21d), esto es similar a lo mostrado por Higashiyama y col. (1997) en las observaciones *in vivo* realizadas al momento de la fecundación del saco “desnudo” de *Torenia fourneri*.



**Figura 21.** Momento de la doble fecundación del saco embrionario de *Polianthes tuberosa* var. Simple. **a)** Entrada del tubo polínico al saco embrionario **b) c) y d)** Secuencia del paso de los núcleos espermáticos a través de una de las sinérgidas en el aparato ovular y la posterior llegada del segundo núcleo espermático al núcleo de la célula central. m=micropilo, pt=tubo polínico, ao=aparato ovular, ncc=núcleo de la célula central, sd=sinérgida desintegrada, si=sinérgida intacta, ne=núcleo espermático, nsi=núcleo de la sinérgida intacta, cabezas de flecha=antípodas. Barras=10  $\mu$ m.

Como se comentó anteriormente, en los análisis realizados mediante el microscópico óptico no fue posible detectar de manera clara el núcleo de la célula huevo, sin embargo, al analizar las muestras fecundadas por medio del microscopio confocal fue posible observar la célula huevo en un plano inferior a las sinérgidas al parecer ahora con su polaridad invertida mostrando su núcleo en una posición media o hacia el extremo micropilar del saco (Figura 23c). Este cambio en la polaridad del núcleo de la célula huevo al momento de la fecundación ha sido reportado previamente en *Arabidopsis thaliana* donde muchas pequeñas vacuolas se forman en el espacio entre el núcleo y la membrana plasmática a la célula huevo (Figura 22) (Faure y col., 2002).

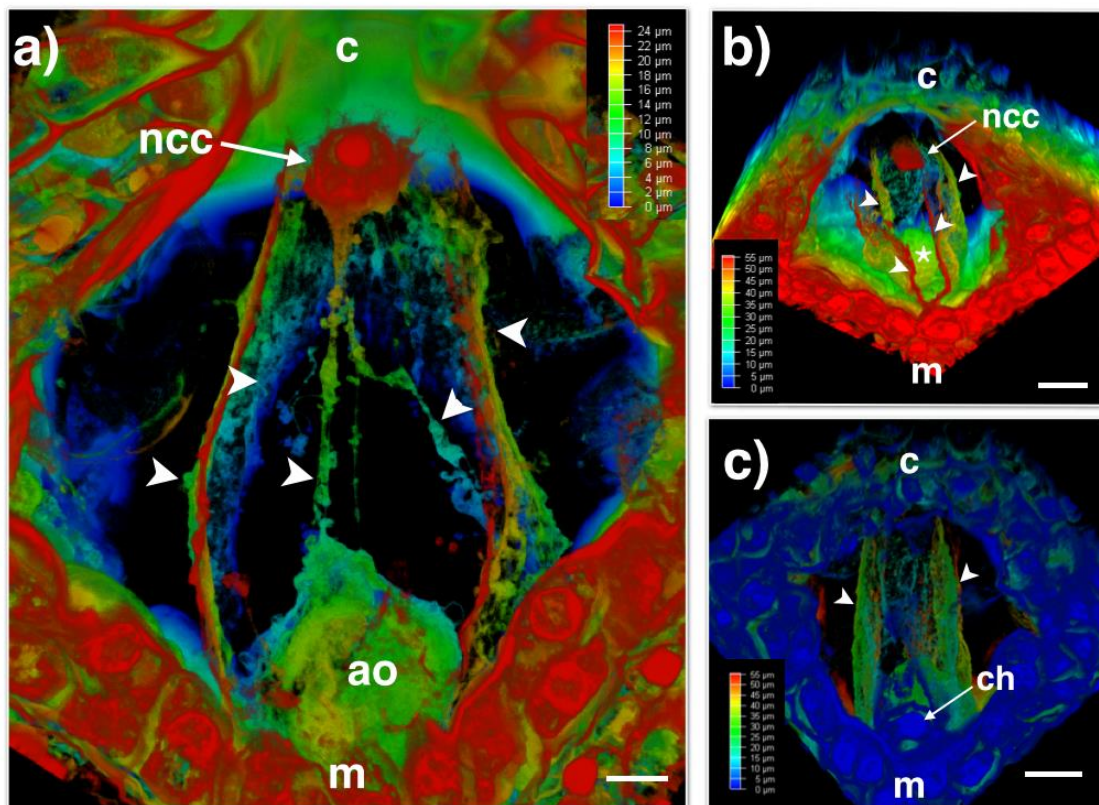




**Figura 22.** Esquema representativo de las primeras etapas de desarrollo en la fecundación de la célula huevo de *Arabidopsis thaliana*. **FG7** Saco maduro tetranucleado sin fecundar, **FG8** Saco embrionario con una sinérgida degradada. **FG1** Saco embrionario con la polaridad de la célula huevo modificada. pch=polo calazal, ncc=núcleo de la célula central, s=sinérgida intacta antes de la llegada de los núcleos espermáticos, sd=sinérgida desintegrada, nch=núcleo de la célula huevo, vch=vacuola de la célula huevo. Modificado de Faure y col., 2002.

De la misma manera, al realizar una reconstrucción en 3D los filamentos putativamente compuestos de citoplasma se observan a manera de un “tubo” que conecta al aparato ovular, más precisamente a la célula huevo con el núcleo de la célula central (Figura 23). De forma similar, Higashiyama y col. 1997 mencionan que una hebra gruesa de citoplasma comienza a aparecer arriba del aparato ovular aproximadamente 15 h después de la polinización y cinco horas después de la cariogamia de uno de los núcleos espermáticos con el núcleo de la célula huevo.

Como se mencionó anteriormente, estas hebras de citoplasma parecen mantener en comunicación a las células del saco embrionario ayudando a la movilidad de las mismas (Ikeda, 1902 en Tilton y Lersten, 1980), sin embargo, el papel que estos pudieran desempeñar en la fecundación y más específicamente en el movimiento de los núcleos espermáticos para encontrar a los núcleos de la células huevo y central a través del saco embrionario no han sido dilucidados.



**Figura 23.** Reconstrucción en 3D de un saco embrionario fecundado de *Polianthes tuberosa* var. Simple. **a) b) y c)** Secuencia que muestra la formación de filamentos putativamente de citoplasma a manera de tubo conectando el aparato ovular con el núcleo de la célula central, el núcleo de la célula huevo se encuentra polarizado hacia el extremo micropilar del saco. ncc=núcleo de la célula central, ao=aparato ovular, m=micrópilo, c=calaza, ch= célula huevo, asterisco=sinérgida desintegrada, cabezas de flecha=túnel citoplasmático. Barras=20  $\mu$ m.

A este respecto, dos principales hipótesis han sido propuestas: la primera plantea que una vez liberados los núcleos espermáticos dentro de la sinérgida degradada estos son transportados a los sitios de fusión de los gametos mediante un mecanismo activo que involucra al citoesqueleto, como formación

de microtúbulos (Huang y Russell 1994) y la generación de coronas de actina (Huang y Sheridan, 1998). La segunda hipótesis postula que los dos núcleos espermáticos son transportados de manera pasiva por la corriente de citoplasma del tubo polínico generada entre la sinérgida y la célula huevo (Hamamura y col., 2011).

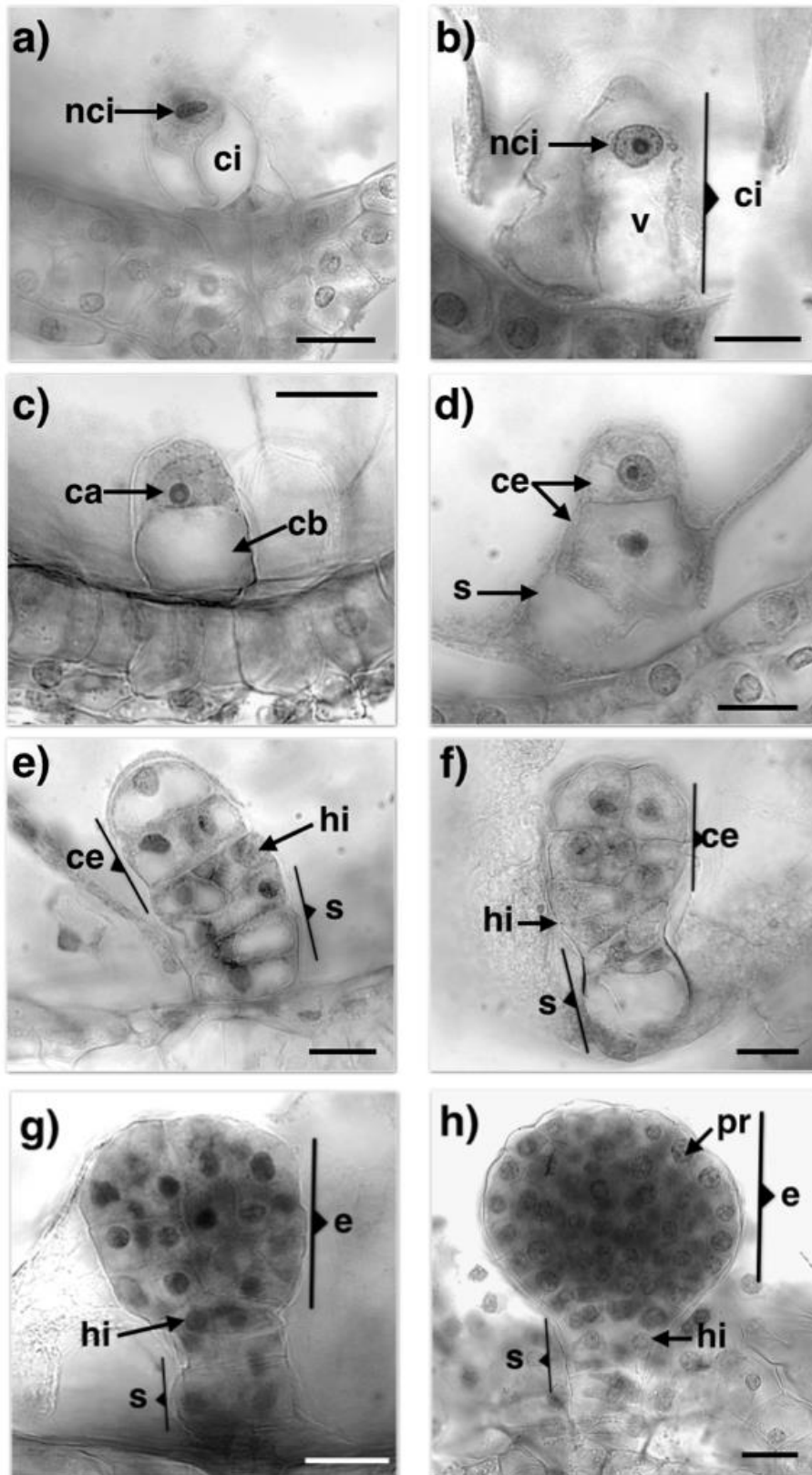
#### 8.2.4. FORMACIÓN DEL CIGOTO Y DESARROLLO DEL EMBRIÓN

Como resultado de la fecundación de la célula huevo por uno de los núcleos espermáticos al día 7 DDP es posible observar la formación del cigoto (Figura 24a). El cigoto presenta una forma semi-esférica, se observa un aumento en tamaño en relación al mostrado en la célula huevo antes del momento de la fecundación: las dimensiones del cigoto son de  $44.33 \pm 1.28 \mu\text{m}$  de largo por  $38.48 \pm 1.33 \mu\text{m}$  de ancho. El núcleo del cigoto regresa a su posición en el extremo calazal de la célula asemejándose al expuesto por la célula huevo. Esta polaridad mostrada por el cigoto en el nardo es similar a la reportada en los estudios realizados en la planta modelo para la embriogénesis cigótica *Capsella bursa-pastoris* (Schulz y Jensen, 1968), *Nicotiana tabacum* (Mogensen y Suthar, 1979) y *Arabidopsis thaliana* (Mansfield y Briarty, 1991; Mansfield y col., 1991).

En las muestras analizadas 7 DDP también fue posible observar cómo el cigoto comienza a alargarse por lo que cambia de forma semi-esférica a ovalada (Figura 24b), el ancho del cigoto permanece constante ( $38.85 \pm 0.82 \mu\text{m}$ ), sin embargo, sus dimensiones a lo largo aumentan a  $55.80 \pm 1.15 \mu\text{m}$ . La polaridad de su núcleo se mantiene orientada hacia el extremo calazal de la célula. Este alargamiento del cigoto se observa como una característica común en las angiospermas el cual prepara al embrión para su primera división. En el caso de *Arabidopsis thaliana* (Mansfield, 1991) el cigoto muestra una elongación de aproximadamente tres veces su tamaño (en sentido apical-basal) antes de dividirse por primera vez, en el caso de *Agave tequilana* este aumento es de una tercera parte del tamaño original de cigoto (González-Gutiérrez y col., 2014).

Una vez que la célula que forma al cigoto se alarga, ésta se divide de forma transversal al eje calazal-micropilar dando lugar a dos células, la célula apical y la célula basal (8 DDP). La división del cigoto en sentido transversal observada en *Polianthes tuberosa* var. Simple se da de forma similar a lo observado en la gran mayoría de las angiospermas (Rodríguez-Garay y col. 2000; Lau y col., 2012), sin embargo, dicha división se puede dar de forma longitudinal (Johri, 1984) u oblicua como en el caso del trigo (Batygina, 1978).

Esta primera división del cigoto se da de forma asimétrica por lo que la célula apical suele ser de menor tamaño ( $19.81 \pm 0.65 \mu\text{m}$  de largo por  $23.79 \pm 1.80 \mu\text{m}$ ) que la célula basal ( $38.94 \pm 2.11 \mu\text{m}$  de largo por  $29.83 \pm 2.85 \mu\text{m}$  de ancho). La célula apical muestra un núcleo grande y altamente condensado mientras que en la célula basal se observa un espacio vacuolado que abarca prácticamente todo el espacio de la célula (Figura 24c). Esta división del cigoto puede darse de forma simétrica generando dos células del mismo tamaño como en el caso del trigo (Kumlen y col., 1999) o de forma asimétrica formando una célula de mayor tamaño que la otra. En *Agave tequilana* (González-Gutiérrez y col., 2014) y en *Arabidopsis thaliana* (Mansfield y Briarty, 1991) el lugar de la formación del plato celular ocasiona que la célula apical sea de menor tamaño que la célula basal al igual que lo observado en el presente estudio.



**Figura 24.** Desarrollo embrionario en *Polianthes tuberosa* variedad Simple. **a)** Cigoto. **b)** Alargamiento del cigoto. **c)** Primera división del cigoto. **d)** Primera división de la cabeza embrionaria. **e)** Segunda división de la cabeza embrionaria. **f)** Embrión de ocho células. **g)** Estado globular temprano del embrión. **h)** Embrión globular. ci=cigoto, nci=núcleo del cigoto, v=vacuola, ca=célula apical, cb=célula basal, c=cabeza embrionaria, s=suspensor, hi=hipófisis, pr=protodermo, e=embrión. Barras=20  $\mu$ m.

En las muestras analizadas 8 DDP se observó la primera división de la célula basal que formará la cabeza embrionaria, esta división al igual que la primera división del cigoto se da de forma transversal, contrario a lo reportado en *Arabidopsis thaliana* donde dicha división se forma en sentido longitudinal (Mansfield y Briarty, 1991; Capron y col., 2009). La célula apical continúa dividiéndose, generando mediante una división longitudinal un embrión de cuatro células, la célula basal a través de una serie de divisiones en forma transversal al eje calazal-micropilar forma el suspensor embrionario pudiéndose diferenciar en esta etapa de desarrollo la formación de la hipófisis a partir de la primera división de la célula basal (9 y 10 DDP) (Figura 24e).

Hacia los días 10 y 11 DDP las muestras estudiadas mostraron la formación de embriones de ocho células (Figura 24f), similares a los descritos por Batygina (1978), donde no sólo la primera división del cigoto, sino todas las divisiones subsecuentes del embrión se dan de forma oblicua al eje calazal-micropilar. La divisiones del embrión continúan hasta llegar al estado de embrión globular temprano (12 y 13 DDP) de 16 células aproximadamente (Figura 24g) y finalmente la formación de embriones globulares de probablemente 64 células o más, etapa a partir de la cual es posible observar la diferenciación del protodermo (16 DDP) (Figura 24h).

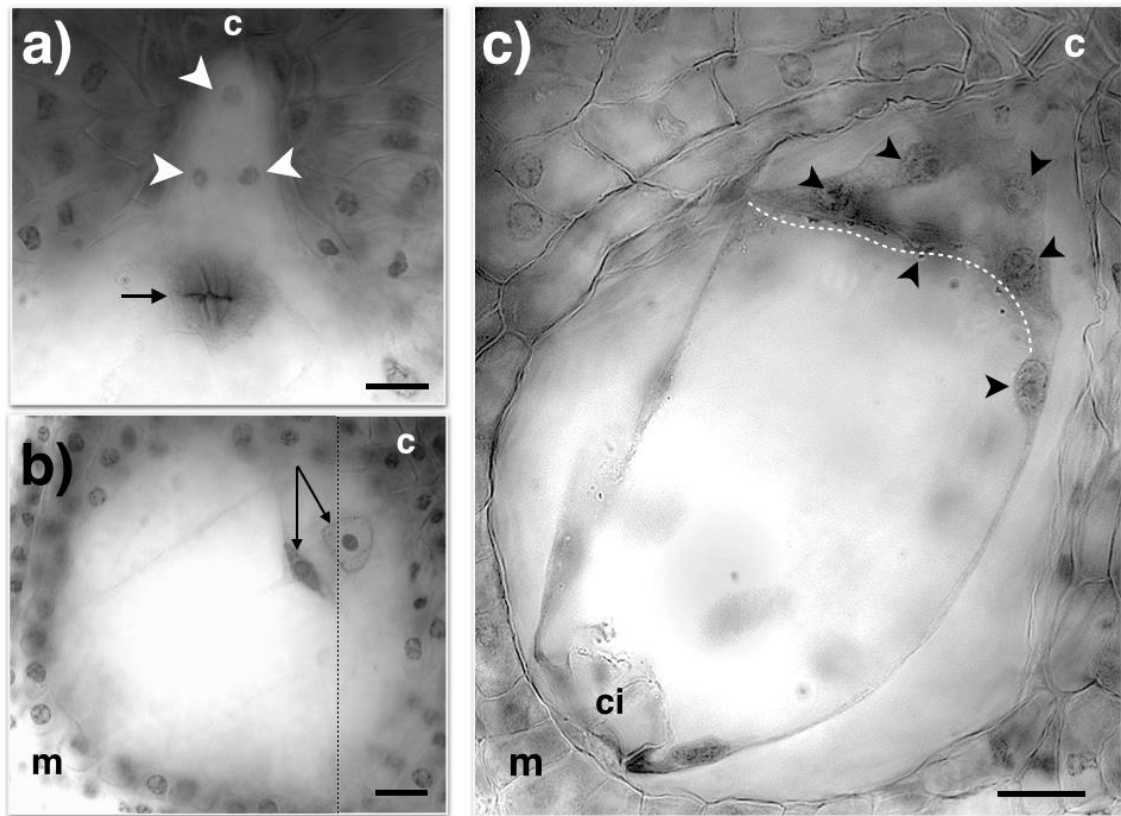
## 8.2.5. DESARROLLO DEL ENDOSPERMO

A la par de los cambios presentados en el cigoto, como consecuencia de la fecundación de la célula central por el segundo núcleo espermático, se genera la célula madre del endospermo, la cual realiza una primera división transversal al eje calazal-micropilar formando dos células, una confinada al área del haustorio calazal y la segunda que se sitúa a todo lo largo del saco embrionario en los últimos dos tercios del mismo. La célula calazal entonces sigue una serie de divisiones primero de tipo nuclear y después de tipo celular formando una pequeña cámara calazal, por su parte el núcleo micropilar genera una segunda cámara micropilar la cual posee un mayor tamaño y donde las divisiones del endospermo se dan de manera nuclear encontrando la mayor parte de los núcleos del endospermo en la periferia del saco embrionario (7 DDP).

La formación de dichas cámaras con el desarrollo de endospermo tipo nuclear en la cámara micropilar (Bhojwani y Bhatnagar, 1983; Floyd y Friedman, 2000), así como la ya mencionada posición calazal del núcleo de la célula central en el saco embrionario son características típicas del endospermo de tipo helobial (Maheswari, 1950), por lo que el endospermo desarrollado en *Polianthes tuberosa* var. Simple fue clasificado como de tipo helobial, al igual que lo reportado en las especies *Hesperocallis undulata* (Cave, 1948) y *Agave tequilana* (González-Gutiérrez y col., 2014).

El desarrollo del endospermo se observa precoz al del cigoto por lo que es posible observar varias divisiones del mismo antes de que la primera división del cigoto se efectúe de manera similar a lo que ocurre en *Amaranthus hypocondriacus* (Coimbra y Salema, 1999), *Tofieldia glutinosa* (Holloway y Friedman, 2008) y *Agave tequilana* (González-Gutiérrez y col., 2014).



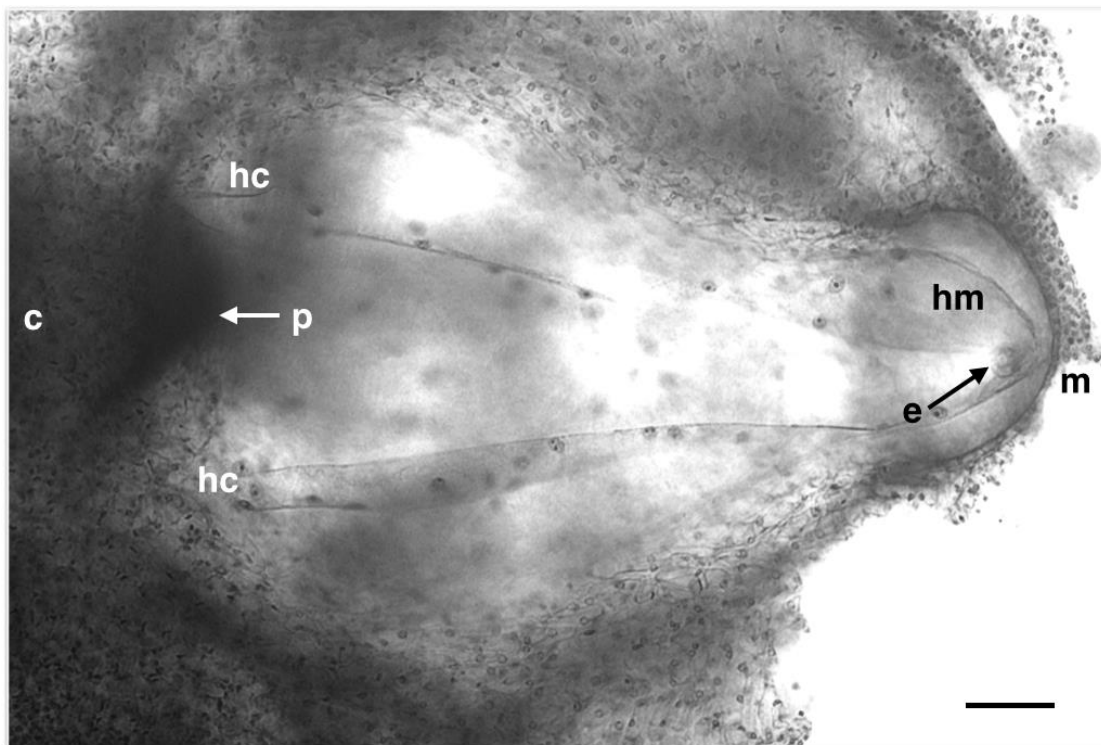


**Figura 25.** Formación y desarrollo del endospermo helobial en semillas inmaduras de *Polianthes tuberosa* var. Simple. **a)** Primera división mitótica de la célula madre del endospermo (CME) en etapa de anafase temprana, se observan en el tubo haustorial calazal las células antípodas. **b)** Resultado de la primera división de la célula madre del endospermo se generan dos células de endospermo en el extremo calazal del saco. **c)** Formación de las cámaras calazal (más pequeña) y micropilar (más grande) del endospermo. c=calaza, m=micrópilo, cabezas de flecha en c=antípodas, flecha en a=anafase temprana en la división mitótica de la CME, flechas en b=resultado de la primera división de la CME, ci=cigoto, cabezas de flecha en c=divisiones celulares y nucleares de las células de endospermo en la cámara calzal del saco embrionario, línea punteada en c=formación de la pared celular que divide las cámaras calazal y micropilar del saco embrionario. \*La línea punteada en b indica la superposición de dos imágenes tomadas en distintos planos del mismo espécimen analizado. Barras=20  $\mu\text{m}$ .

La forma general del saco comienza a cambiar, las paredes del saco comienzan a recorrerse hacia el tejido nucelar perdiendo su aspecto piriforme, y tomando una forma ovoide ligeramente más estrecha en el extremo calazal donde se situaba originalmente el tubo haustorial calazal (Figura 26c). El saco embrionario continúa modificando su forma como consecuencia de su aumento en volumen y a las divisiones de las células del endospermo dentro del mismo, las paredes calazales del saco embrionario empujan el tejido nucelar de la calaza generando dos nuevos haustorios los cuales se encuentran divididos por

el postamento, que es un tejido que contiene a su vez al conjunto de células engrosadas que conformaban la hipostasa en el óvulo sin fecundar. Un tercer haustorio se forma en el área micropilar del saco embrionario donde se desarrolla el embrión, estas modificaciones comienzan a observarse a partir del 8 DDP.

El desarrollo de haustorios tanto calazales como micropilares después de la fecundación son características que se observan comúnmente en distintas especies del orden Asparagales, aquí el desarrollo del endospermo invade las secciones laterales a la nucela proximal, lo que destruye el tejido lateral dejando libre al “postamento”, que es un remanente del tejido que originalmente formaba la hipostasa del óvulo en desarrollo (Rudall, 1997).

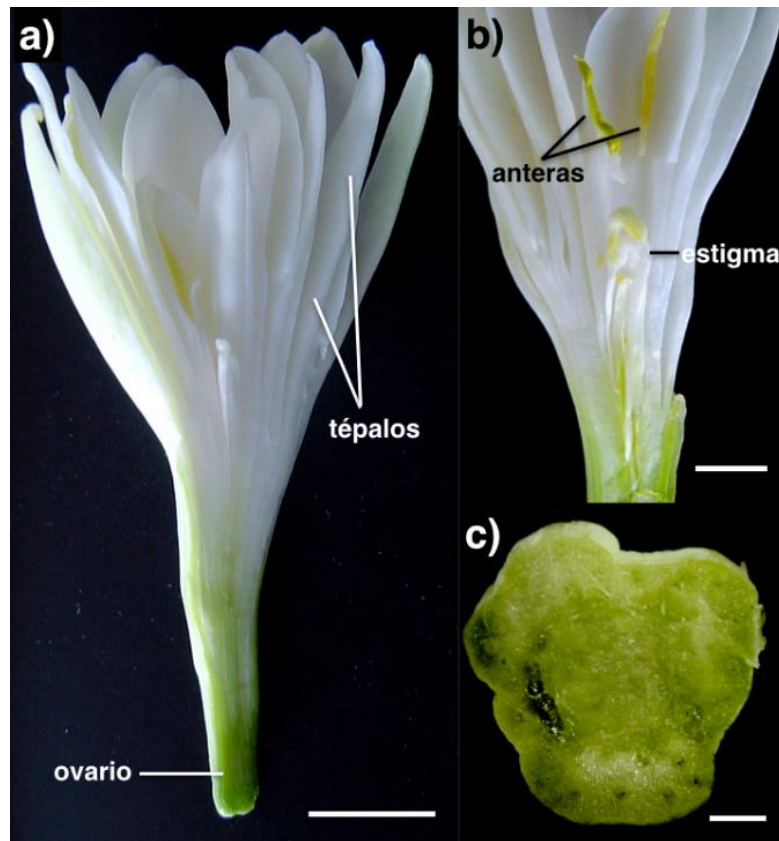


**Figura 26.** Modificaciones del saco embrionario post-fertilización en *Polianthes tuberosa* var. Simple. En el extremo calazal se observa la formación de dos haustorios divididos por el “postamento”, en el extremo micropilar se observa la formación del haustorio micropilar que alberga al embrión. c=calaza, m=micrópilo, hc=haustorio calazal, hm=haustorio micropilar, p=postamento, e=embrión. Barras=100  $\mu$ m.

### 8.3. DESCRIPCIÓN DE LA FLOR Y SUS PARTES DE *POLIANTHES TUBEROSA* VAR. DOBLE

*Polianthes tuberosa* var. Doble posee flores con el tubo del perianto de erguido a ligeramente inclinado de color blanco. Solano (2000) menciona que los verticilos florales se encuentran en dos series, sin embargo, el número de verticilos en las muestras colectadas para el presente estudio varió entre dos y cuatro.

Según Solano (2000), es frecuente encontrar segmentos florales petaloides y estambres convertidos en estaminoidios, estas características se deben probablemente al proceso de selección que ha sufrido para su uso comercial y a la propagación vegetativa utilizada por los horticultores, por lo que la mayoría de los individuos bajo cultivo son estériles. Las colectas del material vegetal para el presente estudio confirman lo descrito anteriormente por lo que fue posible observar la formación de anteras fusionadas a segmentos de “pétalo” de las flores y estigmas atrofiados. No obstante, fue posible obtener polen viable de dichas flores y el cual se utilizó como donador en los tratamientos de polinización. De forma contraria al androceo, al realizar la disección de las partes que componen el gineceo no fue posible observar el desarrollo de estigmas funcionales ni la formación de óvulos en el ovario de la flor.



**Figura 27.** Flor de *Polianthes tuberosa* var. Doble. **a** y **b**) Partes que componen la flor, con el desarrollo de etambres estaminoideos y estigma atrofiado. **c**) Corte transversal del ovario donde se puede apreciar la ausencia de óvulos dentro del mismo. Barra en a=1cm, barra en b=5 mm, barra en c=2 mm.

### 8.3.1. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LOS ÓVULOS Y SEMILLAS INMADURAS DE *POLIANTHES TUBEROSA* VAR. DOBLE

El 100% de las flores colectadas para este estudio presentaron ovarios no funcionales donde no se observa la formación de óvulos por lo que no fue posible realizar el análisis microscópico del gametofito femenino de *Polianthes tuberosa* var. Doble.

## CONCLUSIONES

El desarrollo normal del saco embrionario de *Polianthes tuberosa* var. Simple sigue de manera general el patrón monospórico de tipo-Polygonum. El saco embrionario se desarrolla a partir de la megaspora del extremo calazal del saco y mediante tres divisiones mitóticas forma un coenocito octanucleado. En su madurez, el saco embrionario presenta una forma “piriforme” con un tubo haustorial calazal donde se encuentran las antípodas, inmediatamente arriba del cual se encuentra la hipostasa que conecta al saco embrionario con el tejido nucelar del óvulo. El núcleo de la célula central presenta una alta polaridad al extremo calazal del saco por lo que al momento de la fecundación el segundo núcleo espermático debe viajar largas distancias para poder fusionarse con él. Por esta razón, este arreglo de las células en el saco embrionario de *Polianthes tuberosa* var. Simple podría ser de utilidad en estudios más específicos sobre la doble fecundación, el movimiento de los núcleos espermáticos y la segregación de proteínas como la actina implicadas en el movimiento de los núcleos espermáticos a través del saco embrionario.

Se logró realizar una descripción cronológica de los eventos que suceden a partir del momento de la fecundación y el desarrollo del embrión hasta su estado globular y el desarrollo inicial del endospermo el cual se tipificó como de tipo Helobial.

Las técnicas de tinción-clarificación usadas tanto para los análisis en microscopía óptica como microscopía confocal permiten el análisis de un gran número de muestras en periodos de tiempo relativamente cortos y con un gran detalle de las estructuras analizadas. Por lo que dichas técnicas se muestran como herramientas eficaces para el análisis sistemático de especímenes útiles en clasificación taxonómica y para la detección de anomalías en el proceso de formación del gametofito femenino y el desarrollo embriológico.

## LITERATURA CITADA

- Angiosperm Phylogeny Group (APG III). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
- Anton, A. y A. E. Cocucci. 1984. The grass megagametophyte and its possible phylogenetic implications. *Plant Systematic and Evolution* 146:117-121.
- Barba-González, B., J. M. Rodríguez-Domínguez, M. C. Castañeda-Saucedo, A. Rodríguez, J. M. van Tuyl y E. Tapia-Campos. 2012. Mexican geophytes I. The genus *Polianthes*. Global cScience Books pp.1-6.
- Baroux C., C. Spillane y U. Grossniklaus. 2002. Evolutionary origins of the endosperm in flowering plants. *Genome Biology* 3: 9.
- Barrell P. J. y U. Grossniklaus. 2005. Confocal microscopy of whole ovules for analysis of reproductive development: the elongate1 mutant affects meiosis II. *The Plant Journal* 43: 309-320.
- Batygina, T. B. 1978. Embryology of wheat. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 44: 13-29.
- Bedinger, P. 1992. The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* 4: 879-887.
- Benschop, M. 1993. *Polianthes*. pp. 589-602. En: *The Physiology of flower bulbs*. Hertog, A. y Le Nard, M. (Eds). Elsevier, Amsterdam.
- Berg, R. F. 2003. Development of ovule, embryo sac, and endosperm in *Triteleia* (Themidaceae) relative to taxonomy. *Botany* 90: 937-948.

- Berger, F., Y. Hamamura, M. Ingouff y T. Higashiyama. 2008. Double fertilization-caught in the act. *Trends in Plant Science* 13: 437-443.
- Bhojwani S.S. y S. P. Bhatnagar. 1983. The embryology of angiosperms. Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, India.
- Boavida, L. C., A. M. Vieira, J. D. Becker y J. A. Feijó. 2005. Gametophyte interaction and sexual reproduction: how plants make a zygote. *International Journal of Developmental Biology* 49: 615-632.
- Borg M. y D. Twell. 2010. Life after meiosis: patterning the angiosperm male gametophyte. *Biochemical Society Transactions* 38: 577-582.
- Bougourd, S., J. Marrison y J. Haseloff. 2000. An aniline blue staining procedure for confocal microscopy and 3D imaging of normal and perturbed cellular phenotypes in mature *Arabidopsis embryos*. *The Plant Journal* 24: 543-550.
- Boyde, A. 1990. Confocal optical microscopy. pp: 185-204. En: *Modern Microscopies*. Techniques and applications. Duke, P.G y Michette, A. G. (eds.). Springer, USA.
- Brukhin, V., M. D. Curtis y U. Grossniklaus. 2005. The angiosperm female gametophyte: no longer the forgotten generation. *Current Science* 89: 1844-1852.
- Camino, L. M., G. V. R. Castrejón, B. R. Figueroa, L. L. Aldana y E. M. E. Valdes. 2002 *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) attacking *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae) in Morelos, Mexico. *Florida Entomologist* 85: 392-393.

- Capron A., S. Chatfield, N. Provart y T. Berleth. 2009. Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologist* 7: e0126.
- Carlone, R. 1962. Research on the synchronism between the receptivity of the stigma and the macrosporogenesis in Golden delicious Apple. *Allitonia* 8: 1-18.
- Cave, M. S. 1948. Sporogenesis and embryo sac development of *Hesperocallis* and *Leucocrinum* in relation to their systematic position. *American Journal of Botany* 35: 343-349.
- Chasan, R. y V. Walbot. 1993. Mechanisms of plant reproduction: Questions and approaches. *Plant Cell* 5: 1139-1146.
- Chehregani, A., F. Mohsenzade y M. Ghanad. 2011. Male and female gametophyte development in *Cichorium intybus*. *International Journal of Agriculture and Biology* 13: 603-606.
- Coimbra, S y R. Salerma. 1999. Ultrastructure of the developing and fertilized embryo sac of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Annals of Botany* 84: 781-789.
- Cruz-Cruz F. J. 2013. Megasporogénesis y megagametogénesis en *Yucca elephantipes* Regel. Tesis de licenciatura. Universidad tecnológica de la Selva, Chiapas.
- Dolan, L., K. Janmaat, V. Willemsen, P. Linstead, S. Poethig, K. Roberts y B. Scheres. 1993. Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71- 84.
- Doyle, J. A. y M. J. Donoghue. 1986. Seed plant phylogeny and the origin of the angiosperms: an experimental cladistic approach. *Botanical Review* 52: 321-431.



- Dresselhaus, T. 2006. Cell-cell communication during double fertilization. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 41-47.
- Drews, G., D. Lee y C. A. Christensen. 1998. Genetic analysis of female gametophyte development. *Plant Cell* 10: 5-17.
- Duke, P. G. y A. G. Michette. 1990. Modern microscopy. pp:1-7. En: *Modern Microscopies. Techniques and applications*. Duke, P.G y Michette, A. G. (eds.). Springer, USA.
- Dumas, C. y P. Rogowsky. 2008. Fertilization and early seed formation. *Comptes Rendus Biologies* 10: 715-725.
- Edlund, A. F., R. Swanson y D. Preuss. 2004. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant Cell* 16: S84-S97.
- Endress, K. 2011. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Annals of Botany* 107: 1465-1489.
- Escobar-Guzmán, R. E., F. Zamudio-Hernández, K. Gil-Vega y J. Simpson. 2008. Seed production and gametophyte formation in *Agave tequilana* and *Agave americana*. *Botany* 86: 1343-1353.
- Fan, Y. F., L. Jiang, H. Q. Gong y C. M. Liu. 2008. Sexual reproduction in higher plants I: Fertilization and the initiation of zygotic program. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 860-867.
- Faure J. E., N. Rotman, P. Fortuné y C. Dumas. 2002. Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: developmental stages and time course. *Plant Journal* 30: 481-488.
- Floyd S. K. y W. E. Friedman. 2000. Evolution of endosperm developmental patterns among basal flowering plants. *International Journal of Plant Sciences* 161: S57-S81.

- García-Campayo, V., E. Demesa-Arévalo, W. Huanca-Mamani y J.-P. Vielle-Calzada. 2011. Female gametogenesis and early seed formation in plants. pp.93-111. En: *Topics in animal and plant development: from cell differentiation to morphogenesis*. J. Chimal-Monroy (ed.). Transworld Research Network, Kerala, India.
- García-Mendoza, A. y R. Galván. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56: 7-24.
- Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. University of Arizona. Press. Tucson Arizona.
- Goldberg, R. B., G. de Paiva, R. Yadegari. 2004. Plant Embriogenesis: zygote to seed. *Science, New series* 266: 605-614.
- Gómez-Rodríguez, V. M., B. Rodríguez-Garay y R. Barba-González. 2012. Meiotic restitution mechanisms involved in the formation of 2n pollen in *Agave tequilana* Weber and *Agave angustifolia* Haw. *Springer Plus* 1: 7.
- González-Gutiérrez A. G., A. Gutiérrez-Mora y B. Rodríguez-Garay. 2014. Embryo sac formation and early embryo development in *Agave tequilana* (Asparagaceae). *Springer Plus* 3: 575.
- Grossniklaus U, K. Schneitz. 1998. The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9: 227-38.
- Grove, A. R. 1941. Morphological study of *Agave lechuguilla*. *Botanical Gazette* 103: 354-365.
- Guignard, M. L. 1899. Sur les anthérozoïdes et la double copulation sexuelle chez les végétaux angiospermes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 128: 864-871.

- Gutiérrez-Mora, A., D. Ruvalcaba-Ruíz, J. M. Rodríguez-Domínguez, M. M. Loera- Quezada y B. Rodríguez-Garay. 2004. Recent advances in the biotechnology of *Agave*: A cell approach. pp.17-36. En: *Recent Research Developments in Cell Biology*. S.G. Pandalai (ed.). Transworld Research Network, Kerala, India.
- Gutiérrez-Mora, A., A. G. González-Gutiérrez, B. Rodríguez-Garay, A. Ascencio-Cabral y L. Li-Wei. 2012. Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations. En: *Embryogenesis*, Ken-ichi Sato (ed.). InTech. Disponible en línea en: <http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/somatic-embryogenesis-some-useful-considerations>.
- Hamamura, Y., C. Saito, C. Awai, D. Kurihara, A. Miyawaki, T. Nakagawa, M. M. Kanaoka, N. Sasaki, A. Nakano, F. Berger y T. Higashiyama. 2011. Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 21: 497-502.
- Hanna W.W y E. C. Bashaw. 1987. Apomixis: Its identification and use in plant breeding. *Crop Science* 27: 1136-1139.
- Haseloff, J. 2003. Old botanical techniques for new microscopes. *Bio Techniques* 34: 1174- 1182.
- Hernández-Mendoza, F., G. Carrillo-Castañeda, M. E. Pedraza-Santos, E. de la Cruz-Torres y M. del C. Mendoza-Castillo. 2015. Regeneración *in vitro* de brotes de *Polianthes tuberosa* L. a partir de yemas vegetativas de la inflorescencia y de tejido de cormo. *Nova scientia* 7: 32-47.
- Herr, J. M. Jr. 1971. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperm. *American Journal of Botany* 58: 785-790.

- Herr, J. M. Jr. 1984. Embryology and Taxonomy. pp: 647-691. En: *Embryology of Angiosperms*. Johri B. M. (ed.). Springer-Verlag, New York.
- Herr, J. M. Jr. 1992. Recent advances in clearing techniques for study of ovule and female gametophyte development. pp: 149-154. En: *Angiosperm pollen and ovules*. E. Ottaviano, M. Sari Gorla, D. L. Mulcahy y G. Bergamini Mulcahy (eds.). Springer-Verlag, New York.
- Herr, J. M. Jr. 1993. Clearing techniques for the study of vascular plant tissues in whole structures and thick sections. pp.63-84. En: *Tested studies for laboratory teaching, Volumen 5*. C. A. Goldman, P. L. Hauta, M. A. O'Donnell, S. E. Andrews y R. van der Heiden (eds.). Proceedings of the 5th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE).
- Higashiyama, T., H. Kuroiwa, S. Kawano y T. Kuroiwa. 1997. Kinetics of double fertilization in *Torenia fournieri* based on direct observations of the naked embryo sac. *Planta* 203: 101-110.
- Higashiyama, T., H. Kuroiwa, S. Kawano y T. Kuroiwa. 2000. Explosive discharge of pollen tube contents in *Torenia fournieri*. *Plant Physiology* 122: 11-13.
- Hodges, L. 2010. Tuberose as a cut flower. *The cut flower* 22:55-59.
- Holloway, S. J. y W. E. Friedman. 2008. Embriological features of *Tofieldia glutinosa* and their bearing on the early diversification of monocotyledonous plants. *Annals of Botany* 102: 167-182.
- Honys, D., D. Renák y D. Twell. 2006. Male gametophyte development and function. pp: 76-87. En: *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*. Teixeira da Silva J. (ed.), 1ra edición. Global Science Books, Londres.

- Hoshino Y., T. Miyashita y T. D. Thomas. 2011. *In vitro* culture of endosperm and its application in plant breeding: approaches to polyploidy breeding. *Scientia Horticulturae* 130: 1-8.
- Huang, B.-Q., y S.D. Russell. 1992. Female germ unit: organization, isolation, and function. *International Review of Cytology* 140:233-292.
- Huang, B.-Q. y S. D. Russell. 1994. Fertilization in *Nicotiana tabacum*: Cytoskeletal modifications in the embryo sac during synergid degeneration. A hypothesis for short-distance transport of sperm cells prior to gamete fusion. *Planta* 195: 200-214.
- Huang, B.-Q., E. S. Pierson, S. D. Russell, A. Tiezzi y M. Cresti. 1993. Cytoskeletal organization and modification during pollen tube arrival, gamete delivery and fertilization in *Plumbago zeylanica*. *Zigote* 1: 143-154.
- Huang, B.-Q y W. F. Sheridan. 1994. Female gametophyte development in maize: microtubular organization and embryo sac polarity. *Plant Cell* 6: 845-861.
- Huang B. Q. y W. F. Sheridan. 1998. Action coronas in normal and indeterminate gametophyte1 embryo sacs of maize. *Sex Plant Reproduction* 11:257-264.
- Huber, H. 1969. Die Samenkornmerkmale und Verwandtschaftsverhältnisse der Liliifloren. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 8: 219-538.
- Jiu-Huan, F., X. Xue-Bin, L. Xian-Dong, Z. Chong-Ling, L. Xiu-Lan y W. Wan-Chun. 2003. Embryogenesis, Germination, Structure and Cotyledon Dimorphism of *Zea mays* embryo. *Acta Botanica Sinica* 45: 712-723.

- Johri. B. M. 1963. Embryology and taxonomy. pp: 395-444. En: *Recent advances in the embryology of angiosperms*. Maheshwari P. (ed.). International Society of Plant Morphologists, University Delhi, Delhi.
- Johri B. M. y P. S. Rao. 1984. Experimental Embryology. pp: 735-802. En: *Embryology of Angiosperms*. Johri B. M. (ed.). Springer-Verlag, New York.
- Kennell, J. C. y H. T. Horner. 1985. Megasporogenesis and megagametogenesis in soybean, *Glycine max*. *American Journal of Botany* 72: 1553-1564.
- Krishnamurthy, K. B. y M. Srinivas. 2005. Histological and histochemical studies of ovule development in tuberose (*Polianthes tuberosa* Linn.). *Journal of Ornamental Horticulture* 8: 81-85.
- Kuhl, J. C., F. Cheung, Q. Yuan, W. Martin, Y. Zewdie, J. Mc Callum, A. Catanach, P. Rutherford, K. C. Sink, M. Jenderek, J. P. Prince, C. D. Town y M. J. Havey. 2004. A unique set of 11,008 Onion expressed sequence tags reveals expressed sequence and genomic differences between the monocot orders Asparagales and Poales. *Plant Cell* 16: 114-125.
- Lau, S., D. Slane, O. Herud, J. Kong y G. Jürgens. 2012. Early embriogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern. *Annual Review of Plant Biology* 63: 483- 506.
- Li, W. y H. Ma. 2002. Gametophyte development. *Current Biology* 12: R718-R721. Mc Cormick, S. 1993. Male gametophyte development. *Plant Cell* 5: 1265-1275.
- Li-Hua, A. y Y. Rui-Lin. 2004. Studies on nuclear degeneration programmed cell death of synergid and antipodal cells in *Triticum aestivum*. *Sexual Plant Reproduction* 17: 195-201.

- Li, J. y F. Berger. 2012. Endosperm: food for humankind and fodder for scientific discoveries. *New Phytologist* 195: 290-305.
- López-Díaz, S. y B. Rodríguez-Garay. 2008. Simple methods for *in vitro* pollen germination and pollen preservation of selected species of the genus *Agave*. *e-Gnosis* 6: 1-7.
- Magalhães de Souza, M., T. Santana-Pereira, M. Hoffmann, E. J. T. de Melo y R. Pereira- Louro. 2002. Embryo sac development in yellow passion fruit *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology* 25: 471-475.
- Maheshwari, P. 1937. A critical review of the types of embryo sacs in angiosperms. *New Phytologist* 36: 359-417.
- Maheshwari, P. 1941. Recent work on the types of embryo sacs in angiosperms. *Journal of the Indian Botanical Society* 20: 229-261.
- Maheshwari, P. 1948. The angiosperm embryo sac. *Botanical Review* 14: 1-56.
- Maheshwari, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. McGraw-Hill, New York, pp: 65-67.
- Mansfield, S. G., L. G. Briarty y S. Erni. 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac. *Canadian Journal of Botany* 69: 447-460.
- Mansfield, S. G. y L. G. Briarty. 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Canadian Journal of Botany* 69: 461-476.
- Mansfield, S. G., L. G. Briarty. 1994. Endosperm development. En: *Arabidopsis, an Atlas of Morphology and Development*. Bowman J. (ed.). Springer-Verlag, New York.

- Mascarenhas, J. P. 1989. The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell* 1: 657-664.
- Mc Cormick, S. 1993. Male gametophyte development. *Plant Cell* 5: 1265-1275.
- Mc Cormick, S. 2004. Control of male gametophyte development. *Plant Cell* 16: S142- S153.
- Mogensen, H. L. y H. K. Suthar. 1979. Ultrastructure of the egg apparatus of *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) before and after fertilization. *Botanical Gazette* 140: 168–179.
- Murguia, M., B.-Q. Huang, S. C. Tucker y M. E. Musgrave. 1993. Embryo sac lacking antipodal cells in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 80: 824- 838.
- Nadot S., C. A. Furness, J. Sannier, L. Penet, S. Triki-Teurtroy, B. Albert y A. Ressayre. 2008. Phylogenetic comparative analysis of microsporogenesis in angiosperms with a focus on monocots. *American Journal of Botany* 95: 1426-1436.
- Nawashin, S. G. 1898. Resultate einer revision der befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella*. *Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de St-Petersbourg* 9: 377-382.
- Olsen, O-A. 2004. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: S214-S227.
- Owen H.A. y C.A. Makaroff. 1995. Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewkija (Brassicaceae). *Protoplasma* 185: 7-21.



- Palser, B. F., J.L. Rouse y E. G. Williams. 1992. Techniques for clearing ovules for studies of megagametophyte and early postfertilization development in *Rhododendron*. *Biotechnic and Histochemistry* 67: 207-218.
- Pires, J. C., I. J. Maureira, T. J. Givnish, K. J. Sytsma, O. Seberg, G. Petersen, J. I. Davis, D. W. Stevenson, P. J. Rudall, M. F. Fay y M. W. Chase. 2006. Phylogeny, genome size and chromosome evolution of Asparagales. *Aliso* 22: 287-304.
- Piven, N. M., F. Barredo-Pool, I. C. Borges-Argáez, M. A. Herrera-Alamillo, A. Mayo- Mosqueda, J. L. Herrera-Herrera y M. L. Robert. 2001. Reproductive biology of Henequén (*Agave furcroydes*) and its wild antecesor *Agave angustifolia* (Agavaceae). I Gametophyte development. *American Journal of Botany* 88: 1966- 1976.
- Punwani, J. A. y G. N. Drews. 2008. Development and function of the synergic cell. *Sex Plant Reproduction* 21: 7-15.
- Rao, K. S. 1996. Embryogenesis in flowering plants: recent approaches and prospects. *Journal of Biosciences* 21: 827-841.
- Raymúndez, M. B., M. Escala y N. Xena de Enrech. 2008. Megasporogénesis y megagametogénesis en *Hymenocallis caribaeae* (L.) Herb. (Amaryllidaceae) y algunas características de su desarrollo seminal. *Acta Botánica Venezuelica* 31: 435- 460.
- Reddy S. M., M. Madhusudana Rao, A. Srinivas reddy, M. Mehender Reddy y S. Janardhana Chary. 2004. University Botany III: angiosperms, plant embryology and plant physiology. New Age International, New Dehli.
- Reed, H. S. 1903. The development of the macrosporangium of *Yucca filamentosa*. *Botanical Gazette* 35: 209-214.

- Regen, L. 1941. The Development of the embryo sac in *Agave virginica*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 68: 229-236.
- Reiser, L. y R. L. Fischer. 1993. The ovule and the embryo sac. *Plant Cell* 5:1291-1301.
- Rodríguez-Garay, B., F. Santacruz-Ruvalcaba, M. M. Loera-Quezada y A. Gutiérrez-Mora. 2000. Embriogénesis sexual y somática en plantas. *Horticultura Mexicana* 8: 104-113.
- Rudall, P. J. 1997. The nucellus and chalaza in monocotyledons: structure and systematics. *Botanical Review* 63: 140-181.
- Rudall, P. J. 1999. Flower anatomy and systematics of *Comospermum* (Asparagales). *Systematics and Geography of Plants* 68: 195-202.
- Russell, S. D. 1978. Fine structure of megagametophyte development in *Zea mays*. *Canadian Journal of Botany* 57: 1093-1110.
- Russell, S. D. 1992. Double fertilization. *International Review of Cytology* 140: 357-388.
- Russell, S. D. 1993. The egg cell: Development and role in fertilization and early embryogenesis. *Plant Cell* 5: 1349-1359.
- Russell, S. D. 1996. Attraction and transport of the male gametes for fertilization. *Sexual Plant Reproduction* 9: 337-342.
- Sangavai, C. y Chellapandi P. 2008. *In vitro* propagation of a tuberose plant (*Polianthes tuberosa* L.). *Electronic Journal of Biology* 4: 98-101.
- Shillo, R. 1992. The cuber community holds the answer to flowering problems in *Polianthes tuberosa*. *Acta Horticulturae* 325:139-364.

- Schneitz K., M. Hüiskamp y R. E. Pruitt. 1995. Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant Journal* 7: 731-749.
- Schulz, R. y W. A. Jensen. 1968. *Capsella* embryogenesis: the egg, zygote, and young embryo. *American Journal of Botany* 55: 07-19
- Scotland R. W. y A. H. Wortley. 2003. How Many Species of Seed Plants Are There? *Taxon* 52: 101-104.
- Serrano-Casas, H., E. Solano C. y T. Terrazas. 2011. Anatomía floral comparativa del género *Polianthes* (Agavaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 145-152.
- Sheela, V. L. 2008. Flowers for trade. Pp. 369. En: *Horticultural Science Series 10*, Peter, K. V. (ed). New India Publishing Agency, New Delhi, India.
- Shen T. M., K. L. Huang y T. S. Huang. 1987. Study of Tuberoses Hybridization. *Acta Horticulturae* 205: 71-74.
- Shivanna, K. R. y D. C. Sastri. 1981. Stigma-surface esterase activity and stigma receptivity in some taxa characterized by wet stigmas. *Annals of Botany* 47: 53-64.
- Shotton, D. M. 1989. Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. *Journal of Cell Science* 94: 175-206.
- Sivaramakrishna, D. 1978. Size relationships of apical cell and basal cell in two-celled embryos in angiosperms. *Canadian Journal of Botany* 56: 1434-38.
- Steffensen, D. M. 1968. A reconstruction of cell development in the shoot apex of maize. *American Journal of Botany* 55: 354-36.

- Stelly, D. M., S. J. Peloquin, R. G. Palmer y C. F Crane. 1984. Mayer's Hemalum-Methyl Salicylate: A stain-clearing technique for observations within whole ovules. *Biotechnic and Histochemistry* 59: 155-161.
- Solano C. E. 2000. Sistemática del género *Polianthes* L. (Agavaceae). Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, División de Estudios de Posgrado, UNAM, México, DF.
- Solano, C. E. 2002. Sistemática del género *Polianthes* L. (Agavaceae). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. H230. México, D.F.
- Solano, C. E. y T. P Feria. 2007. Ecological Niche modeling and Geographic distribution of the genus *Polianthes* L. (Agavaceae) in Mexico: using Niche modeling to improve assessments of risk status. *Biodiversity and Conservation* 16: 1885-1900.
- Solano, C. E. y A. García-Mendoza. 2013. Neotipificación y reconocimiento de *Polianthes geminiflora* (Lex.) Rose (Agavaceae). *Acta Botánica Mexicana* 104: 1-18.
- Soltis, P. S. y D. E. Soltis. 2004. The origin and diversification of angiosperms. *American Journal of Botany* 91: 1614-1626.
- Soltis, P. S., D. E. Soltis, M. W. Chase, P. K. Endress y P. R. Crane. 2004. The diversification of flowering plants. En: *Assembling the tree of life*, J. Crandall y M. J. Donoghue (eds.). Oxford, University Press.
- Son, X., L. Yuan y V. Sundaresan. 2014. Antipodal cells persist through fertilization in the female gametophyte of *Arabidopsis*. *Plant Reproduction* 27:197-203.

- Sundaesan V. y M. Alandete-Saez. 2010. Pattern formation in miniature: the female gametophyte of flowering plants. *Development* 137: 179-189.
- Svoma, E. y J. Greilhuber. 1987. Studies on systematic embryology in *Scilla* (Hyacinthaceae). *Plant Systematics and Evolution* 161: 169-181.
- Tavoletti, S. 1994. Cytological mechanisms of 2n egg formation in a diploid genotype of *Medicago sativa* subsp. *falcata*. *Euphytica* 75: 1-8.
- Tian, H. Q. y S. D. Russell. 1997. Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 202: 93-105.
- Tian, H. Q., T. Yuan y S. D. Russell. 2005. Relationship between double fertilization and the cell cycle in male and female gametes of tobacco. *Sexual Plant Reproduction* 17: 243-252.
- Tilton, V. R. 1978. A developmental and histochemical study of the female reproductive system in *Ornithogalum caudatum* Ait. using an electron microscopy. Tesis Doctoral. Iowa State University. Ames, Iowa.
- Tilton, V. R. 1980. Hypostase development in *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and notes on other types of modifications in the chalaza of angiosperm ovules. *Canadian Journal of Botany* 58: 2059-2066.
- Tilton, V. R. y N. R. Lersten. 1981. Ovule development in *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) with a review of selected papers on angiosperm reproduction. III. Nucellus and megagametophyte. *New Phytologist* 88: 477-504.
- Tilton, V. R. y H. L. Mogensen. 1980. Ultrastructural aspects of the ovule of *Agave parryi* before fertilization. *Phytomorphology* 29: 338-50.







- Tobe H. 1989. The embryology of Angiosperms: Its broad application to systematic and evolutionary study. *Botanical Magazine Tokyo* 102: 351-367.
- Toonen, M. A. J. y S. C. de Vries, 1996. Initiation of somatic embryos from single cells. pp. 173-189. En: *Embryogenesis: the generation of a plant*. T.L. Wang, y A. Cuming (eds.). Bios Scientific Oxford, Oxford, United Kingdom.
- Trueblood, E. 1973. "Omilxochitl" the tuberose (*Polianthes tuberosa*). *Economic Botany* 27:157-173.
- Valdivia-Ugalde, A. 2014. Compatibilidad reproductiva en cruzamientos interespecíficos e intergenéricos en el género *Polianthes* L. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara, México.
- Wallwork, M. A. B. y M. Sedgley. 2000. Early events in the penetration of the embryo sac in *Torenia fournieri* (Lind.). *Annals of Botany* 85: 447-454.
- Wang, H. F., B. K. Kirchoff, H. N. Qin y Z. X. Zhu. 2009. Reproductive morphology of *Sargentodoxa cuneata* (Lardizabalaceae) and its systematic implications. *Plant Systematics Evolution* 280: 207-217.
- Watkins, G. M. 1937. Embryo-sac development in *Yucca Rupicola*. *American Journal of Botany* 24: 481-484.
- Webb, M. C. y B. E. S. Gunning 1990. Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*: Megasporogenesis, including the microtubular cytoskeleton. *Sexual Plant Reproduction* 3: 244-256.
- Wei-cheng, Z., Y. Wen-mei y L. Cheng-hou. 1988. The structural changes during the degeneration process of antipodal complex and its function to endosperm formation in wheat caryopsis. *Acta Botanica Sinica* 30: 457-462.
- Wetering, K. y S. D. Russell. 2004. Experimental analysis of the fertilization process. *Plant Cell* 16: S107-S118.

- Willemse M. T. M. y J. L. van Went. 1984. The female gametophyte. En: *Embryology of Angiosperms*. B. M. Johri (ed.). Springer-Verlag, Berlin.
- Williams, J. H. y W. E. Friedman. 2004. The four-celled female gametophyte of *Illicium* (Illiciaceae; Austrobaileyales): implications for understanding the origin and early evolution of monocots, eumagnoliids, and eudicots. *American Journal of Botany* 91: 332-351.
- Wolf, F. T. 1940. Macrosporogenesis and the development of the embryo sac in *Yucca aloifolia*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 67: 755-761.
- Yadegari, R. y G. N. Drews. 2004. Female gametophyte development. *Plant Cell* 16: S133-S141.
- Yamamoto Y., M. Nishimura, I. Hara-Nishimura y T. Noguchi. 2003. Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 44: 1192-1201.
- Yang, W. C., D. Q. Shi, y Y. H. Chen. 2010. Female gametophyte development in flowering plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 89-108.
- Ye, X.-L., E. C. Yeung y S.-Y. Zee. 2002. Sperm movement during double fertilization of a flowering plant, *Phaius tankervilleae*. *Planta* 215: 60-66.
- Yeung, E. C. y D. W. Meinke. 1993. Embryogenesis in Angiosperms: development of the suspensor. *Plant Cell* 5: 1371-1381.
- Zhang, D., L. Wang y L. Zhuo. 2011. Embryology of *Iris mandshurica* Maxim. (Iridaceae) and it 's systematic relationships. *Plant Systematic Evolution* 293: 43-52.

## ANEXOS

**Anexo A. Mediciones (largo y ancho) de las estructuras mostradas en las figuras 9 y 10 correspondientes a los estados de desarrollo del saco embrionario antes y después de la polinización.**

**Cuadro A5.** Dimensiones promedio (largo y ancho) desde la formación de la célula madre de la megaspora hasta el desarrollo del saco embrionario maduro de *Polianthes tuberosa* var. Simple.

Etapas de desarrollo	Número de óvulos observado	Tamaño promedio $\pm$ D.E. ( $\mu\text{m}$ )	
		Largo	Ancho
 <b>Célula madre de la megaspora</b>	65	$18.69 \pm 2.33$	$18.69 \pm 2.33$
 <b>Tétrada</b>	100	$52.95 \pm 3.89$	$19.07 \pm 1.45$
 <b>Megaspora funcional</b>	100	$47.64 \pm 5.48$	$27.99 \pm 3.58$
 <b>Saco embrionario dos núcleos</b>	100	$62.41 \pm 6.90$	$39.11 \pm 5.40$
 <b>Saco embrionario cuatro núcleos</b>	100	$77.31 \pm 5.96$	$54.62 \pm 5.98$
 <b>Saco embrionario maduro</b>	100	$152.02 \pm 5.54$	$129.74 \pm 5.41$



**Cuadro A6.** Dimensiones promedio (largo y ancho) de los distintos tipos celulares encontrados en el saco maduro de *Polianthes tuberosa* var. Simple.

Tipos celulares en el saco maduro	Número de óvulos observado	Tamaño promedio $\pm$ D.E. ( $\mu\text{m}$ )	
		Largo	Ancho
Antípoda	50	7.68 $\pm$ 0.34	6.46 $\pm$ 0.43
Sinérgida	50	16.76 $\pm$ 0.30	12.92 $\pm$ 0.47
Núcleos polares	50	10.17 $\pm$ 1.48 diámetro	
Núcleo de la célula central	100	15.85 $\pm$ 1.11	16.41 $\pm$ 1.21
Célula huevo	60	25.96 $\pm$ 1.60	22.89 $\pm$ 1.59

**Cuadro A7.** Dimensiones promedio (largo y ancho) del cigoto en distintas etapas de desarrollo de *Polianthes tuberosa* var. Simple.

Etapas de desarrollo	Número de semillas observado	Tamaño promedio $\pm$ D.E. ( $\mu\text{m}$ )	
		Largo	Ancho
Cigoto	50	44.33 $\pm$ 1.28	34.48 $\pm$ 1.33
Alargamiento del cigoto	50	50.80 $\pm$ 1.15	38.85 $\pm$ 0.82
Primera división del cigoto	50	ca 19.81 $\pm$ 0.65	ca 22.79 $\pm$ 1.80
		cb 38.94 $\pm$ 2.11	cb 29.83 $\pm$ 2.85

ca=célula apical, cb=célula basal