

## CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. DEFINICIÓN DEL PROYECTO .....	4
3. JUSTIFICACIÓN.....	5
4. OBJETIVOS.....	6
4.1 Objetivo general.....	6
4.2 Objetivos específicos .....	6
5. ANTECEDENTES.....	7
5.1 Las angiospermas y el <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul .....	7
5.2 Evolución de las angiospermas.....	8
5.3 Evolución de las monocotiledóneas.....	9
5.4 Evolución del género <i>Agave</i> .....	10
5.5 La reproducción sexual en las angiospermas.....	11
5.6 La reproducción sexual en el género <i>Agave</i> y en la especie <i>A. tequilana</i> Weber var. Azul	16
5.7 Apomixis y la reproducción asexual en las angiospermas.....	21
5.8 La poliembrionía en los seres vivos y en las angiospermas .....	24
5.9 El desarrollo embrionario en angiospermas.....	30
5.10 El desarrollo embrionario en <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul.....	39
5.11 El desarrollo de cotiledones en angiospermas y los estados monocotiledonar y dicotiledonar .....	42
6. MÉTODOLÓGÍA .....	50
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
7.1 Poliembrionía.....	52

7.2	Embriones dicotiledonares, fusionados y monocotiledonares .....	60
8	CONCLUSIONES .....	77
9.	RECOMENDACIONES .....	79
10.	LITERATURA CITADA .....	80
11.	GLOSARIO .....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formación del saco embrionario tipo <i>Polygonum</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> Formación de saco embrionario .....	15
<b>Figura 3.</b> Vías posibles de formación de varios embriones en una misma semilla .....	27
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de los estadios del desarrollo embrionario en <i>Arabidopsis</i> .....	34
<b>Figura 5.</b> Modelos de desarrollo embrionario .....	36
<b>Figura 6.</b> Secciones longitudinales de cariopses de maíz .....	38
<b>Figura 7.</b> Primera división del cigoto en la especie <i>A. tequilana</i> .....	40
<b>Figura 8.</b> Etapas tempranas de embriogénesis somática en <i>A. tequilana</i> .....	41
<b>Figura 9.</b> Transporte de auxinas relacionado con eventos tempranos .....	45
<b>Figura 10.</b> Partición del dominio apical en el meristemo apical de brote y los cotiledones ....	47
<b>Figura 11.</b> Modelo de la distribución de la auxina y su transporte en embriones de trigo .....	49
<b>Figura 12.</b> Poliembriones en semillas de <i>A. tequilana</i> .....	53
<b>Figura 13.</b> Embrión adventicio .....	54
<b>Figura 14.</b> Poliembriones .....	55
<b>Figura 15.</b> Poliembriones de <i>A. tequilana</i> por fisión monocigótica .....	56
<b>Figura 16.</b> Poliembriones .....	57
<b>Figura 17.</b> Poliembriones .....	58
<b>Figura 18.</b> Embrión y plántula con meristemas adventicios .....	59
<b>Figura 19.</b> Embriones con dos meristemas radiculares .....	60
<b>Figura 20.</b> Embriones monocotiledonares y dicotiledonares en <i>A. tequilana</i> .....	61
<b>Figura 21.</b> Embriones monocotiledonares, fusionados y dicotiledonares en <i>A. tequilana</i> .....	62

<b>Figura 22.</b> Estadios en embriones monocotiledonares de <i>A. tequilana</i> .....	63
<b>Figura 23.</b> Embriones monocotiledonares de la especie <i>A. tequilana</i> .....	64
<b>Figura 24.</b> Embriones de <i>A. tequilana</i> presentando dos cotiledones .....	65
<b>Figura 25.</b> Embriones en <i>Agave tequilana</i> .....	66
<b>Figura 26.</b> Embrión monocotiledonar de <i>A. tequilana</i> clarificado .....	67
<b>Figura 27.</b> Ilustraciones comparativas de los estadios embrionarios .....	74
<b>Figura 28.</b> Embriones dicotiledonares de la especie monocotiledónea <i>A. tequilana</i> .....	75
<b>Figura 29.</b> Propuesta hipotética del movimiento polar de auxinas en <i>A. tequilana</i> .....	77

## RESUMEN

*Agave tequilana* Weber var. Azul es una planta monocotiledónea. Las angiospermas eran divididas, hace algunas décadas, en los grupos: dicotiledóneas y monocotiledóneas. Esta agrupación se realizaba en parte por la presencia de dos cotiledones en los embriones de las dicotiledóneas y un cotiledón en las monocotiledóneas. De manera normal, las angiospermas producen solo un embrión sexual en cada semilla. A la ocurrencia de varios embriones dentro de una semilla se le denomina poliembrionía. El presente trabajo tuvo como objetivo demostrar la existencia de embriones con dos cotiledones y poliembriones en la especie *Agave tequilana* Weber var. Azul mediante la extracción de embriones sexuales y la observación de su morfología. Se pudo confirmar la presencia de embriones con dos cotiledones y poliembriones en esta especie. Los resultados sugirieron que para la especie *A. tequilana* Weber var. Azul la presencia de dos cotiledones se debe al fenómeno conocido como sincotilia y que la presencia de poliembriones se vinculó con el desarrollo de embriones por fisión monocigótica, embrión secundaria a partir de suspensor, desarrollo de sinérgidas, antípodas y células de la nucela.

## ABSTRACT

*Agave tequilana* Weber var. Azul is a monocot plant. Decades ago, angiosperms were divided in the groups: dicots and monocots. These groups were assigned, in part, by the presence of two cotyledons for dicots and one cotyledon for monocots. Normally, angiosperms produce only one sexual embryo inside each seed. The occurrence of several embryos inside one seed is called polyembryony. The objective of this work was to demonstrate the presence of dicotylous embryos and polyembryony in the species *Agave tequilana* Weber var. Azul by the extraction of sexual embryos and the observation of their morphology. The presence of dycotylous embryos and polyembryony was confirmed for this species. Results suggested that for the species *A. tequilana* Weber var. Azul, the presence of two cotyledons was due to the phenomenon named syncotyly and that the presence of polyembryony was linked to the development of embryos by monozygotic cleavage, secondary embryony from the suspensor, the development of synergids, antipodals, and cells from the nucellus.

## 1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó a partir del descubrimiento de dos fenómenos inesperados en los embriones sexuales o cigóticos de *Agave tequilana* Weber variedad Azul, los cuales fueron: i) la ocurrencia de embriones con dos cotiledones cuando por definición solamente deberían presentar un solo cotiledón y ii) la ocurrencia de varios embriones en una semilla, cuando lo normal es solamente uno. Estos fenómenos provocaron que se volcara el interés en tratar de elucidar qué procesos originaban su ocurrencia y conocer más a fondo los mecanismos embrionarios en esta especie. Este descubrimiento ocurrió en el laboratorio de biotecnología vegetal del CIATEJ cuando se estaban extrayendo embriones de las semillas maduras de *A. tequilana* para su cultivo *in vitro*. Al momento de este descubrimiento no se encontraron reportes de estos fenómenos para esta especie.

## **2. DEFINICIÓN DEL PROYECTO**

La presente tesis se centra en el análisis de la presencia de los fenómenos de la poliembrionía y el desarrollo de dos cotiledones en la especie monocotiledónea *A. tequilana* Weber var. Azul, al igual que en la determinación de los posibles mecanismos que originan a ambos fenómenos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El estudio de los fenómenos embriológicos son de gran utilidad en el ámbito biotecnológico, el entendimiento de los mecanismos que ocurren durante el desarrollo embrionario pueden permitir mejorar las condiciones del cultivo *in vitro* de especies vegetales de importancia económica como lo es *A. tequilana* Weber var. Azul

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Demostrar la existencia de poliembriones y embriones dicotiledonares en la especie monocotiledónea *Agave tequilana* Weber var. Azul.

### **4.2 Objetivos específicos**

4.2.1 Estudiar y describir la morfología de embriones dicotiledonares de *Agave tequilana* Weber var. Azul.

4.2.2 Estudiar y describir la poliembrionía en *Agave tequilana* Weber var. Azul.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Las angiospermas y el *Agave tequilana* Weber var. Azul

En términos taxonómicos, la especie *Agave tequilana* Weber var. Azul es una planta perteneciente a la familia Agavaceae, se encuentra clasificada en el orden Asparagales de la clase monocotiledónea dentro del grupo de las angiospermas. A las angiospermas se les conoce como “plantas con flor” y es uno de los cinco grupos de plantas con semillas que existen en la actualidad, el cual representa al grupo más grande de plantas terrestres (Soltis y Soltis, 2004).

Las plantas con flor o angiospermas representan la mayoría de las plantas actuales (Wikström y col., 2001). Son un grupo muy diverso en aspectos químicos, reproductivos, morfológicos y en el tamaño y organización de su genoma, esta diversidad no tiene igual en ningún otro grupo dentro del reino vegetal (Soltis y Soltis, 2004). A pesar de esta diversidad, el grupo se encuentra unido por una serie de sinapomorfías (*e.g.*, características compartidas y derivadas) (Soltis y Soltis, 2004).

El género *Agave* pertenece a la familia Agavaceae. Todas las especies de esta familia son nativas de América y se considera a la región central de México como el centro de origen de esta familia (Eguiarte y col., 2000). *Agave* es un género joven, que data de los 7.8 a los 10.1 millones de años de edad y la edad estimada para la familia se encuentra entre los 20 y los 26 millones de años (Good-Avila y col., 2006).

De manera tradicional, las angiospermas se dividían en dos grandes grupos: las monocotiledóneas (Liliopsida) y las dicotiledóneas (Magnoliopsida). Estos grupos se caracterizaban, entre otras cosas, por presentar diferencias en el número de cotiledones presentes en sus embriones, uno para el caso de las monocotiledóneas y dos para el caso de las

dicotiledóneas. Diversos estudios filogenéticos, realizados en los años 1990s y 2000s, han descartado esta antigua clasificación llegando al establecimiento de: un grupo monofilético llamado monocotiledóneas, otro grupo llamado eudicotiledóneas (el cual abarca a la mayoría de las especies que eran consideradas en la clasificación anterior como dicotiledóneas), y otros clados que comprenden una diversidad considerable de plantas con flor (Soltis y Soltis, 2004).

Chase y Reveal (2009) propusieron que las angiospermas en su totalidad comprenden los siguientes superórdenes: Amborellanae, Nymphaeanae, Austrobaileyanae, Magnolianae, Liliae (monocotiledóneas), Ceraophyllanae (eudicotiledóneas), Ranunculanae, Proteanae, Buxanae, Trochodendrales, Myrothamnanae, Rosales, Berberidopsidales, Santalales, Caryophyllales y Asterales.

Debido a lo anteriormente expuesto, en la actualidad, ya no se emplea el término dicotiledónea como tal. A pesar de esto, el término dicotiledónea será aplicado a lo largo de este escrito con fines prácticos y también en virtud de que los principales estudios de desarrollo embrionario han empleado este término. Lo anterior se realizará además, con la finalidad de no cambiar el significado de las citas originales.

## **5.2 Evolución de las angiospermas**

Durante los años 1990s, la filogenia de las angiospermas tuvo un avance significativo debido a estudios que involucraron el análisis de secuencias del ADN (APG II, 2003). La evolución de las angiospermas ha sido un tema de gran interés ya que las angiospermas son consideradas como uno de los grupos con mayor derivación evolutiva terrestre de los tiempos geológicos recientes (Davies y col., 2004).

Se ha inferido que el origen de las angiospermas debió haber ocurrido hace unos 200 (Martin y col., 1993) ó 340 millones de años (Wolfe y col., 1989; Martin y col., 1993) y que las monocotiledóneas y las dicotiledóneas divergieron entre los 200 (Wolfe y col, 1989; Martin y col., 1993) y los 205 millones de años (Martin y col, 1993) con una incertidumbre de

alrededor de 40 millones de años (Martín y col., 1993). Chase (2004) determinó como fecha de origen de las monocotiledóneas hace 140 millones de años de acuerdo a relojes moleculares.

Como se puede observar, las monocotiledóneas y las dicotiledóneas son grupos filogenéticos cercanos y en el estudio realizado por Vicentz y col. (2004) encontraron que aproximadamente dos tercios del transcriptoma de la caña de azúcar, una monocotiledónea, tiene secuencias similares a las de *Arabidopsis*, una eudicotiledónea. Existen indicios de que desde que las monocotiledóneas se separaron de las eudicotiledóneas aproximadamente dos tercios de sus genes han mantenido similitudes, mientras que el resto de los genes están constituidos de secuencias con una rápida evolución o genes específicos que podrían estar marcando las diferencias entre estos dos tipos de plantas (Vicentz y col., 2004).

### **5.3 Evolución de las monocotiledóneas**

De las angiospermas actuales, las monocotiledóneas representan al clado más grande que haya aparecido recientemente. A diferencia de otros autores, Bremer (2000, en Soltis y Soltis, 2004) estimó el origen del clado monocotiledónico hace 134 millones de años, fecha aún mayor a los registros fósiles más antiguos. Para Chase (2004) y de acuerdo a estudios empleando relojes moleculares, las monocotiledóneas tienen al menos 140 millones de años de existencia. Las monocotiledóneas son claramente angiospermas, pero aunque su posición exacta aún no es clara, es, sin embargo, aparente que se encuentran embebidas dentro de un grado de plantas que son en los términos más generales “dicotiledóneas” (e.g. Amborellaceae, Austrobaileyales, Ceratophyllales, Chloranthaceae, Eudicotiledóneas, Nymphaeales, Magnoliids) (Chase, 2004). En este sentido, las monocotiledóneas son derivadas de algún tipo de dicotiledóneas primitivas y son un grupo monofilético (todos los organismos en él han evolucionado a partir de una población ancestral común) (Chase, 2004). De cualquier manera, esta distinción entre monocotiledóneas y dicotiledóneas es más aparente cuando se consideran

a las eudicotiledóneas vs. monocotiledóneas y menos clara teniendo como fondo de comparación a las altamente heterogéneas dicotiledóneas “primitivas” (i.e. Amborellaceae, Austrobaileyales, Chloranthaceae, Canellales, Laurales, Magnoliales, Nymphaeales, y Piperales) (Chase, 2004).

#### **5.4 Evolución del género *Agave***

Como se mencionó anteriormente, la especie *Agave tequilana* Weber var. Azul es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia Agavaceae. Eguiarte (1995) calculó que esta familia debió haberse originado hace 14 millones de años. En estudios más recientes se reportó que su origen data de entre 20 y 26 millones de años y que el género *Agave* debió haberse originado hace  $\leq 10$  millones de años (Good-Avila y col., 2006).

La familia Agavaceae abarca ocho géneros con biología reproductiva contrastante, ya que pueden ser iteróparos (se pueden reproducir varias veces) o semélparos (producen una sola inflorescencia en su vida, para después morir) y tienen una notable diversidad de morfologías florales y de polinizadores (abejas, murciélagos, colibríes y polillas.) (Eguiarte y col., 2000). Todas las especies de la familia Agavaceae son nativas de América y se considera que su centro de origen es México (Eguiarte y col., 2000).

El género *Agave* resulta parafilético (un grupo con un ancestro en común formado de los cuales uno o más clados han sido excluidos para formar un grupo separado) (Eguiarte y col., 2000). *Agave* es el género más grande de la familia (García-Mendoza y Galván, 1995 en Eguiarte y col., 2000). La mayoría de las especies de agaves se encuentran en México (Eguiarte y col., 2000; García-Mendoza, 2002). Los ancestros de Agavaceae seguramente fueron plantas herbáceas perennes, similares a las actuales *Hosta* (Eguiarte y col., 2000).

Se ha establecido una división del género *Agave* en dos subgéneros basada en el tipo de inflorescencia: el subgénero *Littea* con inflorescencias espigadas o racemosas, y el subgénero *Agave* con inflorescencia paniculada (Gentry, 1982). *Agave tequilana* Weber var. Azul

pertenece a este último subgénero presentando una inflorescencia paniculada. Un aspecto muy importante en la evolución de la familia Agavaceae y del género *Agave* es su biología floral y reproductiva. En estudios sobre su ecología reproductiva, se ha hecho especial énfasis en las especializaciones florales asociadas a sus polinizadores. Las características florales en *Agave* sugieren una adaptación a polinización por murciélagos (Rocha y col., 2006) considerado como un ejemplo de coevolución con murciélagos nectarívoros, especialmente los del género *Leptonycteris* (Eguiarte y col., 2000). También, se han registrado insectos esfíngidos como polinizadores (Gentry, 1982; Rocha y col., 2006), otros visitantes pueden ser diversas aves (e.g., colibríes) e insectos (e.g. abejas y polillas) (Gentry, 1982). También, se ha hecho mención de que algunas características de varias especies de *Agave* de Estados Unidos y del Norte de México están evolucionando de manera secundaria a síndromes de polinización por abejas medianas y grandes, especialmente en localidades que presentan bajos números o total ausencia de murciélagos polinizadores (Eguiarte y col., 2000). La polinización por insectos esfíngidos parece ser el síndrome de polinización ancestral en Agavaceae, teniendo a la polinización por murciélagos como un proceso que evolucionó más recientemente en el género *Agave* (Good-Avila y col., 2006).

## **5.5 La reproducción sexual en las angiospermas**

Las angiospermas son las plantas que más recientemente se han originado en la evolución de todo el reino vegetal. Estas son plantas que, a diferencia de otras, presentan tanto a sus óvulos como a sus semillas protegidos por estructuras que provienen de una flor. Los óvulos se encuentran protegidos dentro del ovario de la flor, una vez que dichos óvulos son fecundados, comienza el desarrollo de las semillas y el ovario se desarrolla para formar el fruto que de igual forma sirve para proteger y dispersar a las semillas. Las semillas son unidades estructurales de reproducción, propagación, diseminación, que contienen al embrión y comúnmente a tejidos especializados de reserva (endospermo y perispermo, entre otros) (Batygina, 2005).

Las plantas en general y especialmente las angiospermas, son seres vivos que presentan características peculiares. Tempranamente en su evolución, las plantas adquirieron un ciclo de vida que se alterna entre un organismo haploide pluricelular (el gametofito) y un organismo diploide pluricelular (el esporofito) (Drews y col., 1998; Li y Ma, 2002; Yadegari y Drews, 2004; Sundaresan y Alandete-Saez, 2010).

En muchas plantas primitivas, los gametofitos son la generación dominante y libre mientras que las angiospermas cuentan con gametofitos dramáticamente reducidos (Li y Ma, 2002; Yadegari y Drews, 2004) los cuales están compuestos por pocas células y se encuentran embebidos dentro de los órganos sexuales de la flor (Raven y col., 1992 en Drews y col., 1998).

En el caso de las angiospermas, la reproducción sexual ocurre en las estructuras florales. Los gametofitos masculinos (los granos del polen) se desarrollan dentro de las anteras y los gametos femeninos (megagametofitos o sacos embrionarios) se desarrollan dentro de un óvulo (Sundaresan y Alandete-Saez, 2010).

Los gametofitos y esporofitos difieren morfológicamente y funcionalmente. La principal función de la generación del esporofito diploide es producir las esporas haploides, las cuales son producto de la división meiótica. Células específicas del esporofito originan a las esporas, dichas esporas atraviesan por una proliferación celular y diferenciación para desarrollarse en gametofitos (Yadegari y Drews, 2004). La principal función de la generación gametofítica es la de producir gametos haploides (Yadegari y Drews, 2004). La fusión de la ovocélula y una célula espermática originan al cigoto, el cual representa el principio de la generación del esporofito (Yadegari y Drews, 2004).

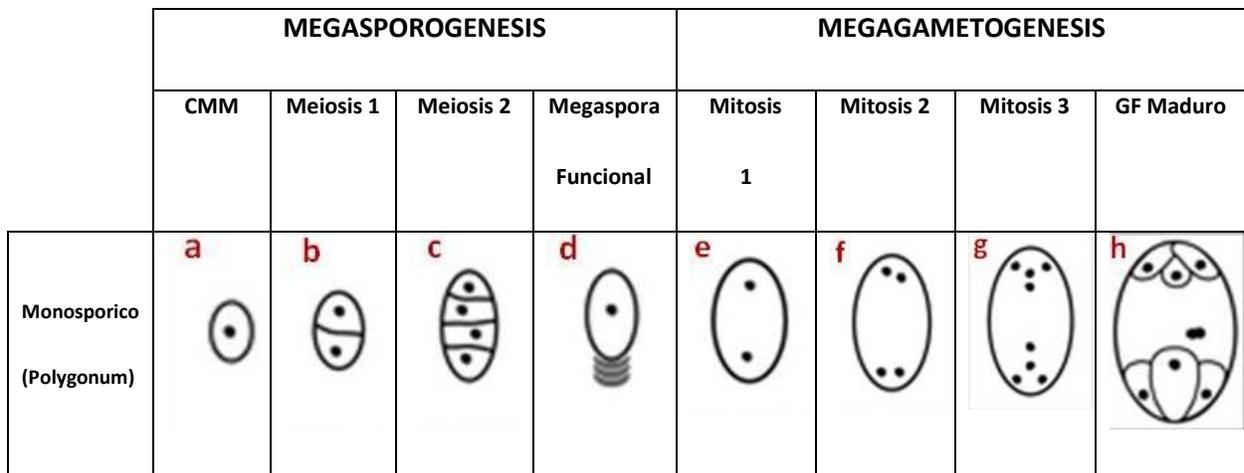
Para fines relacionados con el presente trabajo, se hará énfasis en el gametofito femenino, ya que el entendimiento de la estructura de éste y la descripción de los procesos reproductivos dentro de él, son importantes para el tema de esta investigación. El gametofito femenino es crucial para muchos pasos 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 también es llamada gineceo y la estructura reproductiva masculina es llamada androceo. El gineceo se encuentra constituido por: el estigma, el estilo y el ovario; el androceo se encuentra constituido por: la antera y el filamento. Según sea el caso, una misma flor puede presentar tanto las estructuras masculinas como femeninas en ella, o puede presentarlas en flores separadas. Sea cual sea el tipo de flor, el polen debe de trasladarse de la antera al estigma, una vez que llega al estigma el grano de polen debe desarrollar un tubo polínico que le permita atravesar el estilo y llegar al ovario hasta donde se encuentra el gametofito femenino y así, poder realizar lo que se conoce como la doble fertilización (Faure y Dumas, 2001; Yadegari y Drews, 2004).

El gametofito femenino, también referido como el saco embrionario o megagametofito, se desarrolla dentro del óvulo y se encuentra rodeado por el tejido nucelar y el tejido integumental proveniente del esporofito o de la planta madre. Se han descrito más de 15 tipos diferentes de patrones del desarrollo del saco embrionario. Los diferentes patrones surgen principalmente de variaciones en la citocinesis durante la meiosis, el número y patrón de las divisiones mitóticas y el patrón de la celularización (Drews y col., 1998; Yadegari y Drews, 2004). De estos patrones, se consideran que existen tres tipos de megasporogenesis: monospórica, bispórica y tetraspórica. El patrón monospórico es la forma más común y es presentada por el patrón denominado Polygonum (Maheshwari, 1950; Willemse y van Went, 1984; Haig, 1990) y se considera que este último se exhibe en la mayoría de las especies (Drews y col., 1998; Yadegari y Drews, 2004).

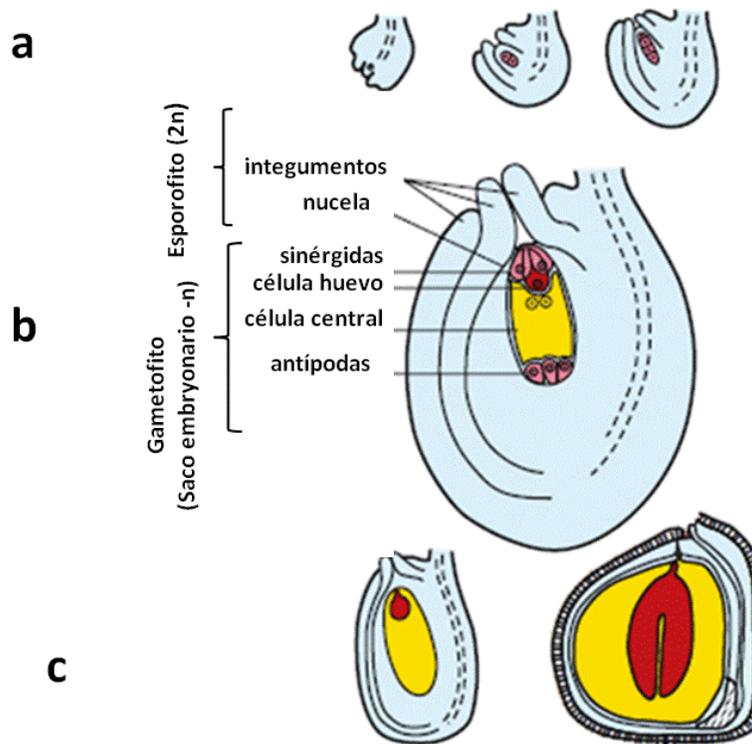
Durante el desarrollo del saco embrionario tipo Polygonum, la megaspóra funcional atraviesa por varias divisiones mitóticas sin citocinesis, resultando en un coenocito multinucleado que subsecuentemente forma paredes celulares alrededor de estos núcleos, que resulta en un gametofito celularizado femenino (Fig. 1h) (Yadegari y Drews, 2004). De manera específica, en el tipo Polygonum ocurren tres rondas de divisiones mitóticas que suceden sin citocinesis (Figs 1e, 1f, 1g) (Yadegari y Drews, 2004). Los ocho núcleos resultantes se separan por una gran vacuola central en dos grupos cada uno de los cuales contiene cuatro núcleos y está

localizado cerca de un extremo de un saco embrionario elongado; entonces, el saco embrionario atraviesa una celularización, produce tres células antipodales en el polo calazal y dos células sinérgidas y una ovocélula en el polo micropilar (Fig. 1h) (Li y Ma, 2000; Sundaresan y Alandete-Saez, 2010). Además, los dos núcleos restantes y mucho del citoplasma en el centro, forman una gran célula central (Li y Ma, 2000; Sundaresan y Alandete-Saez, 2010).



**Figura 1.** Formación del saco embrionario tipo Polygonum dividido en dos etapas: la megasporogénesis y la megagametogénesis. Modificado de: Yadegari y Drews (2004).

En resumen, las células del tejido nucelar o nucela se diferencian y dan origen a la célula madre de la megaspora (Fig. 1a), la cual seguirá un proceso de división meiótica (Fig. 1b) para dar origen a cuatro esporas (Fig. 1c) haploides; de estas esporas, solamente una, la megaspora funcional, originará al saco embrionario a partir de divisiones mitóticas (Figs. 1e, 1f, 1g, 1h). El saco embrionario se encuentra embebido en el tejido nucelar e integumental del ovario y está constituido por la célula huevo, las sinérgidas, una célula central (con dos núcleos), y tres células antípodas (Fig. 2b). Una vez realizada la fecundación de la célula huevo por un núcleo espermático, se desarrollará el embrión cigótico (Fig. 2c).



**Figura 2.** Formación de saco embrionario. a) Saco embrionario embebido en integumentos y nucela. b) Saco embrionario el cuál se encuentra formado por la célula huevo; las células sinérgidas, la célula central y las antípodas. c) Una vez ocurrida la fecundación de la célula huevo se desarrolló el embrión cigótico (en rojo) y el endospermo (en amarillo). Modificado de: Batygina y Vinogradova (2007).

Para que ocurra la fecundación de la célula huevo, el polen debe llegar al estigma y comienza el desarrollo del tubo polínico, dos células espermáticas contenidas y transportadas por el tubo polínico se aproximan al gametofito femenino, una célula espermática (haploide) fecunda o se fusiona con la ovocélula (haploide) para originar al cigoto diploide que mediante divisiones mitóticas dará origen al embrión (nuevamente un esporofito diploide con genotipo distinto al esporofito original materno). La otra célula espermática, se fusionará con los dos núcleos haploides de la célula central y dará origen a la estructura (triploide) conocida como endospermo (Yadegari y Drews, 2004).

Después de la fecundación, se inicia la formación de la semilla; los tejidos esporofíticos maternos provenientes de los integumentos serán parte de la cubierta de la semilla una vez que la semilla madure (Sundaresan y Alandete-Saez, 2010).

### **5.6 La reproducción sexual en el género *Agave* y en la especie *A. tequilana* Weber var. Azul**

El género *Agave* produce una de las más grandes inflorescencias en el reino vegetal (Gentry, 1982), cuyas flores crecen en la parte superior de las inflorescencias, siendo éstas últimas muy grandes llegando a alcanzar entre los 3 y 8 m de altura (Piven y col., 2001). Además, las especies de este género son plantas predominantemente monocárpicas (Piven y col., 2001; Rocha y col., 2006; Abraham-Juárez y col., 2009), reproduciéndose sólo una vez después de muchos años, muriendo luego de su reproducción (Piven y col., 2001; Rocha y col., 2006).

Las especies de *Agave* pueden presentar distintos mecanismos reproductivos tanto sexuales como asexuales; de manera sexual se pueden reproducir por semillas, y asexualmente a través de bulbos aéreos o bulbilos, o propágulos hipógeos (hijuelos o vástagos rizomatosos) (Abraham-Juárez y col., 2009), siendo la reproducción asexual la forma de reproducción más efectiva para algunas especies de *Agave* (Arizaga y Ezcurra, 1995). Se considera que no se han realizado estudios suficientes acerca de la importancia relativa de la propagación sexual vs. asexual en el género (Eguiarte y col., 2000).

Cabe hacer mención que los clones creados cuando las especies de *Agave* se reproducen asexualmente pueden sobrevivir muchas generaciones (Rocha y col., 2006). Cuando se producen los propágulos hipógeos se generan a través de rizomas cuyos meristemos apicales emergen a cierta distancia de la planta parental, originando así a nuevos individuos (Piven y col., 2001). Los bulbilos se originan a partir de brotes bajo las bractéolas en la inflorescencia (Piven y col., 2001).

En un apartado anterior en dónde se trató acerca de la evolución de este género, se hizo mención acerca de la relación coevolutiva de estas especies con sus polinizadores, especialmente, con los murciélagos. Diversos estudios han mencionado que la presencia o ausencia de dichos polinizadores ha ejercido una influencia en la evolución de la biología reproductiva de dichas especies. Algunos agaves han demostrado el desarrollo de estrategias reproductivas asexuales que aparentemente pueden compensar las desventajas de un desarrollo de una coevolución con especies que no siempre pueden estar presentes para fortalecer su polinización (Arizaga y Ezcurra, 1995).

Las flores de especies del género *Agave* son comúnmente de color blanquecino-verdoso, amarillentas o algunas veces rojizas; los tubos de las flores son más o menos cerrados; el polen se produce al anochecer y los estambres son externos; se produce néctar abundante y diluido, principalmente de noche; las flores duran varios días y son protándricas, en el primer día producen polen y en los siguientes el estigma es receptivo; las especies son autocompatibles y puede ocurrir autofecundación lo cual deriva en una depresión por endogamia (Eguiarte y col., 2000).

Eguiarte y col. (2000) además, reportaron que en el género *Agave*, la mayor parte de las semillas resultan de la polinización cruzada, mientras que algunas especies parecen tener altos niveles de propagación asexual, llegando hasta la propuesta de que algunas especies de *Agave* (especialmente poliploides del subgénero *Agave*), tal vez nunca presenten reproducción sexual. Para esos mismos autores, la propagación asexual por medio de la producción de hijuelos y bulbilos, convierte a las plantas de *Agave* y *Furcraea* en plantas iteróparas en la práctica, ofreciéndoles así un escape al callejón evolutivo de la semelparidad, aunque muchas especies de *Agave* no presentan métodos de propagación asexual.

La especie *A. tequilana* es una planta cultivada con fines comerciales para la producción de tequila, es una especie monocárpica perenne que produce flores solamente una vez al final de su ciclo de vida (aproximadamente entre los 5 y los 8 años de edad). Entre las actividades de manejo de esta especie cultivada se realiza el corte del escapo en cuanto comienza su

desarrollo; la propagación es de manera asexual a través de sus hijuelos y vástagos producidos en los rizomas (Escobar-Guzmán y col., 2008).

Existen pocos estudios disponibles que realizan la descripción de los gametofitos femeninos en representantes de *Agave*, entre estos estudios se encuentran las descripciones realizadas para *A. virginica* (Regen, 1941); *A. fourcroydes*, *A. angustifolia* (Piven y col., 2001) y *A. tequilana* (Escobar-Guzmán y col., 2008; González-Gutiérrez, 2013).

En su estudio, Regen (1941) encontró que *A. virginica* presenta un saco embrionario “normal” (tipo Polygonum), mencionó que la célula madre de la megaspora forma cuatro megasporas las cuales pueden contar con un arreglo en forma linear o en forma de “T”. En su estudio describió que la megaspora calazal mediante tres divisiones nucleares forma un saco embrionario “normal” presentando ocho núcleos los cuales se convierten en siete después de la fusión de dos núcleos polares para formar el núcleo primario del endospermo. Tanto las sinérgidas como las antípodas pueden degenerarse antes de la fertilización. La formación del endospermo se origina libre de núcleos, y puede proceder hasta una extensión considerable antes de que el embrión se haya iniciado (Regen 1941). Además, este autor observó la degeneración del saco embrionario y la nucela en óvulos no fertilizados.

Piven y col. (2001) en su estudio sobre *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* dividieron al desarrollo del gametofito femenino en tres etapas: (1) premeiótica en la cual ocurre el establecimiento de la célula madre de la megaspora; (2) meiótica, cuando ocurre la formación de las megasporas funcionales; (3) postmeiótica, la cual comprende la formación del saco embrionario. Ellos describen la formación de tétradas en forma de “T”, en este caso, los autores establecen que la formación del gametofito femenino ocurre a partir de dos células micropilares de la megaspora después de la primera división meiótica (tipo bispórico), *A. fourcroydes* presenta baja fertilidad, según estos autores, florece de la base hacia arriba y presenta una alta frecuencia de granos de polen que no son fértiles, al igual que *A. angustifolia*,

En *A. fourcroydes*, se forma una diada de megasporas (Piven y col., 2001). Solamente una megaspora atraviesa por una segunda división meiótica, creando dos megasporas funcionales (megasporogénesis de tipo bispórico) (Piven y col., 2001), de ahí que el gametofito femenino en *A. fourcroydes* se desarrolla de dos megasporas viables del micropilo directamente en un saco embrionario (Piven y col., 2001). Sin embargo, esta formación no es regular para un megagametofito normal de ocho núcleos. La célula central se encuentra en la parte central del saco embrionario y contiene dos polos nucleares que se fusionan parcialmente antes de la fertilización (Piven y col., 2001).

Escobar-Guzmán y col. (2008) sugirieron que en *A. tequilana* existe incompatibilidad genética, procesos de endogamia, y otros factores que afectan el desarrollo del polen y la germinación, o errores en el desarrollo del gametofito femenino que pueden contribuir a la baja fertilidad observada en *A. tequilana*. Según estos mismos autores la producción de semillas y la eficiencia en la germinación de *A. tequilana* fue baja en sus estudios, además, observaron que el desarrollo del gametofito masculino para esta especie es del tipo sucesivo produciendo granos de polen con una morfología dicolpada.

La reproducción sexual en *A. tequilana* normalmente comienza en febrero o marzo cuando el meristemo vegetativo apical se retrae o se hunde marcando la transición de un meristemo vegetativo apical a un meristemo floral. La inflorescencia llega a medir cerca de 5-6 metros de altura, y la floración se inicia en la parte inferior hacia la parte superior durante los meses de junio y julio y todos los estadios del desarrollo floral pueden ser observados simultáneamente en una sola planta. Dado que la antesis ocurre antes de que el estigma madure, el polen liberado podría polinizar a las flores receptoras que se encuentran en la parte baja de la inflorescencia (Escobar-Guzmán y col., 2008).

Escobar-Guzmán y col. (2008) estimaron que el número de flores por planta fue de 12,341, de éstas solamente entre 14.34 % y 18.69 % se convierten en frutos. Según estos mismos autores, del total de semillas analizadas, solamente el 10 % de ellas presentan una apariencia normal (semillas de color negro).

El saco embrionario o gametofito femenino en *A. tequilana* es de tipo “Polygonum” monospórico (Escobar-Guzmán y col., 2008; González-Gutiérrez, 2013). En *A. tequilana*, durante el proceso de desarrollo del gametofito femenino, la célula madre de la megaspora se diferencia del tejido nucelar, y presenta meiosis para la formación de una tétrada de megasporas haploides (Escobar-Guzmán y col., 2008; González-Gutiérrez, 2013). Mientras que las tres megasporas micropilares se degeneran, la megaspora más cercana a la zona calazal sobrevive para convertirse en una megaspora funcional (Escobar-Guzmán y col., 2008; González-Gutiérrez, 2013). El único núcleo de la megaspora funcional atraviesa por divisiones mitóticas y eventualmente se forman las paredes celulares para producir una estructura típica de ocho núcleos (González-Gutiérrez, 2013) y siete células del gametofito femenino tipo Polygonum (Escobar-Guzmán y col., 2008; González-Gutiérrez, 2013) organizado de la siguiente manera: tres antípodas ubicadas en el tubo haustorial calazal, dos núcleos polares que conforman el núcleo de la célula central (se encuentran uno al lado del otro y se sitúan en el polo calazal del saco justo debajo del tubo haustorial) y tres células en el polo micropila (dos sinérgidas y una célula huevo) (González-Gutiérrez, 2013). Del total de óvulos observados en *A. tequilana*, se encontró que entre el 2 % y el 5 %, no produjeron un gametofito maduro; solamente se pudieron observar células nucleares elongadas (Escobar-Guzmán y col., 2008).

Con respecto al gametofito masculino, al final de la meiosis en la célula madre del polen ocurre la formación de una tétrada de células haploides. La tétrada de células se separa para dar lugar a cuatro microsporas individuales y el único núcleo dentro de cada microspora pasa por una división mitótica para producir dos células: una célula generativa y una célula vegetativa; la célula generativa se encuentra completamente encerrada dentro de la célula vegetativa mayor (Escobar-Guzmán y col., 2008).

La producción de frutos en *A. tequilana* es baja comparada con *A. angustifolia*, esto se puede deber a diversos factores como la carencia de especies polinizadoras adecuadas y errores durante el desarrollo del gametofito, la polinización y la fertilización (Escobar-Guzmán y col., 2008). Además, Ruvalcaba-Ruiz y Rodríguez-Garay (2002) observaron irregularidades

meióticas en un análisis de células madre de polen. Las aberraciones que estos autores observaron fueron: intercambio entre cromátidas hermanas, deleciones y duplicaciones que son reflejadas en una baja viabilidad del polen (42% de granos de polen no viables).

Las semillas de la mayoría de las especies de *Agave* son normalmente dispersadas por el viento al abrirse las cápsulas y no son dispersadas por aves o por otros animales (Escobar-Guzmán y col., 2008).

### **5.7 Apomixis y la reproducción asexual en las angiospermas**

El término apomixis ha sido utilizado en el pasado como un término general para cualquier forma de reproducción asexual en las plantas incluyendo la reproducción vegetativa (Koltunow, 1993). Esta definición original se ha restringido y ahora se utiliza para los procesos reproductivos asexuales que paradójicamente ocurren en los óvulos de las plantas con flor (Koltunow, 1993) y los cuales producen de manera asexual embriones y semillas (Dodeman y col., 1997; Koltunow y Grossniklaus, 2003, Ozias-Akins, 2006). Por lo tanto, a través de este proceso, se produce progenie con un genotipo idéntico al materno (Koltunow, 1993; Koltunow y Grossniklaus, 2003).

La apomixis se encuentra en un número significativo de especies y se puede encontrar esporádicamente a través de todo el árbol filogenético de las angiospermas (Naumova, 2008).

Los procesos apomictícos mimetizan muchos de los eventos de la reproducción sexual y dan origen a semillas fértiles; una diferencia importante entre estos y los embriones sexuales es que los embriones apomictícos se derivan únicamente de células provenientes del tejido del óvulo materno en lugar de la fusión de gametos masculinos y femeninos (Koltunow, 1993).

Los procesos apomictícos han sido clasificados de acuerdo al origen y al mecanismo a través del cual se produce el embrión o el saco embrionario. Koltunow (1993) y Naumova (2008) mencionaron las siguientes clasificaciones: diplosporia, aposporia y embriónía adventicia.

Naumova (2008) además, estableció los dos mecanismos que pueden permitir la formación de embriones a partir de sacos embrionarios ya sean reducidos o no reducidos y que pueden dar origen a embriones no sexuales; los mecanismos mencionados son: la partenogénesis y la apogamia.

Se define como diplosporia al tipo de apomixis que ocurre cuando el saco embrionario se desarrolla a partir de un megasporocito no reducido debido a una meiosis anómala o a una sustitución de la meiosis por mitosis. (Koltunow, 1993; Koltunow y Grossniklaus, 2003; Naumova, 2008;). Koltunow (1993) divide a estas causas en diplosporia meiótica y mitótica, definiendo a la diplosporia meiótica a aquella que ocurre cuando una célula madre de la megaspora se diferencia de la nucela y comienza el proceso de la meiosis, sin embargo, la meiosis es inhibida en una etapa particular por mecanismos desconocidos y el núcleo es restaurado en forma tal que permite que ocurra la mitosis. Se define a la diplosporia mitótica a aquella a través de la cual la célula madre de la megaspora es inhibida para la realización del proceso meiótico, esta última parece ser la más común de las diplosporias (Koltunow, 1993).

Se define como aposporia a la producción de un saco embrionario que se forma a partir de una célula nucelar y no a partir de una megaspora tal y como ocurre en la diplosporia (Koltunow, 1993; Dodeman y col.,1997; Naumova, 2008). A estas células se les llama células apospóricas iniciales (Koltunow, 1993; Naumova, 2008) y al igual que las células madre de las megasporas poseen un núcleo grande y un citoplasma denso (Koltunow, 1993). Tal y como ocurre en la diplosporia, las células iniciales apospóricas dan origen a un saco embrionario no reducido a través de procesos mitóticos. En este caso, los procesos sexuales y apospóricos pueden coexistir en un óvulo, el cual por definición no es posible para la apomixis diplospórica (Koltunow, 1993).

La embriónia adventicia ocurre cuando de manera directa se forman embriones a partir de células individuales pertenecientes a los tejidos somáticos de un óvulo maduro, ya sea la nucela o el integumento interno (Lakshmanan y Abegaokar, 1984 en Koltunow, 1993, Naumova, 2008). Según Naumova (2008) en la mayoría de las plantas que presentan este tipo

de apomixis la reproducción sexual también ocurre. En estos casos los embriones adventicios se pueden dirigir hacia el saco embrionario producido meioticamente (Naumova, 2008). Según Naumova (2008) la embrionía adventicia se había registrado en 250 especies pertenecientes a 57 familias de plantas con flor, incluyendo a una serie completa de plantas económicamente valiosas (*Citrus*, *Mangifera*, *Ribes*, *Beta*, *Alnus*, entre otras).

La forma nucelar de la embrionía adventicia es la más común. Según Koltunow (1993) en *Citrus*, la primera división de las células nucleares iniciales ocurre al mismo tiempo que ocurre la primera división cigótica. Solamente las células iniciales localizadas en la parte de la región micropilar se dividen para formar embriones. A medida que las células iniciales se dividen, se desarrollan dentro del saco embrionario (Koltunow, 1993).

A diferencia de la diplosporia y la aplosporia en la embriogénesis nucelar se genera un esporofito independiente de un saco embrionario y el embrión no se encuentra rodeado de una estructura megagametofítica, en su lugar, se encuentra rodeado por otras células nucleares (Koltunow, 1993).

Por otra parte, la célula huevo puede desarrollar un embrión sin la necesidad de ser fertilizada, a este proceso se le denomina partenogénesis (Naumova, 2008). La partenogénesis puede ser: diplospora, y apospora las cuales originan un embrión diploide no sexual; existe una variación en la partenogénesis que se denomina hemigamia (semigamia), en la cual el núcleo espermático si penetra a la ovocélula pero no se fusiona con su núcleo. Esto ocasiona que la célula huevo se divida originando un embrión haploide (Naumova 2008). Finalmente, se le denomina apogamia al desarrollo de cualquier célula del saco embrionario que no sea una ovocélula y en su lugar se produce un embrión a partir de sinérgidas ya sean diploides o haploides (Naumova, 2008).

## 5.8 La poliembrionía en los seres vivos y en las angiospermas

En los animales, la poliembrionía puede ocurrir a partir de la producción de embriones adicionales a partir del embrión cigótico original, y este proceso ocurre en organismos como: las avispas parasitoides, briozoarios, algunos gusanos planos parásitos, hidrozoarios y un mamífero (armadillo) (Craig y col., 1997). Estos científicos intentaron una hipótesis sobre las causas que han hecho que la poliembrionía evolucione, sin embargo, no intentaron incluir en sus interpretaciones los casos poliembriónicos originados por partenogénesis o lo que ellos consideraron como el suceso accidental de los gemelos.

Basados en su revisión sobre animales presentando poliembrionía, Craig y col. (1997) interpretaron a la poliembrionía como resultado de una selección evolutiva. Dicha selección se orienta hacia un número mayor de embriones sin estar basados en el número de cigotos formados por la madre, si no relegando esta opción al embrión inicial en lugar de a la madre. Es decir, la evolución se ha dirigido hacia la formación de varios embriones a partir de un cigoto original y no a la formación de varios embriones a partir de varios cigotos, considerando así que la evolución se centra en el embrión y no en la madre. Ellos concluyeron que una vez que se forma el embrión, este último puede recibir del exterior información que le permite detectar si existe abundancia con relación a los recursos disponibles por embrión. Cuando se detecta esta abundancia la larva poliembriónica se reproduce asexualmente e incrementa la adecuación de los clones (Craig y col., 1997). Es por esto, que la poliembrionía puede ser considerada como una estrategia para sobrellevar la incertidumbre acerca de la disponibilidad de recursos para el desarrollo de los embriones, especialmente de aquellos cuyas condiciones ambientales de desarrollo no pueden ser monitoreadas por la madre.

En su trabajo acerca de la poliembrionía animal, Zhurov y col. (2007) establecieron que la creación inicial de miles de células no diferenciadas es un prerrequisito para la formación posterior de numerosos embriones. Ellos mencionaron que se requiere una señal para que las

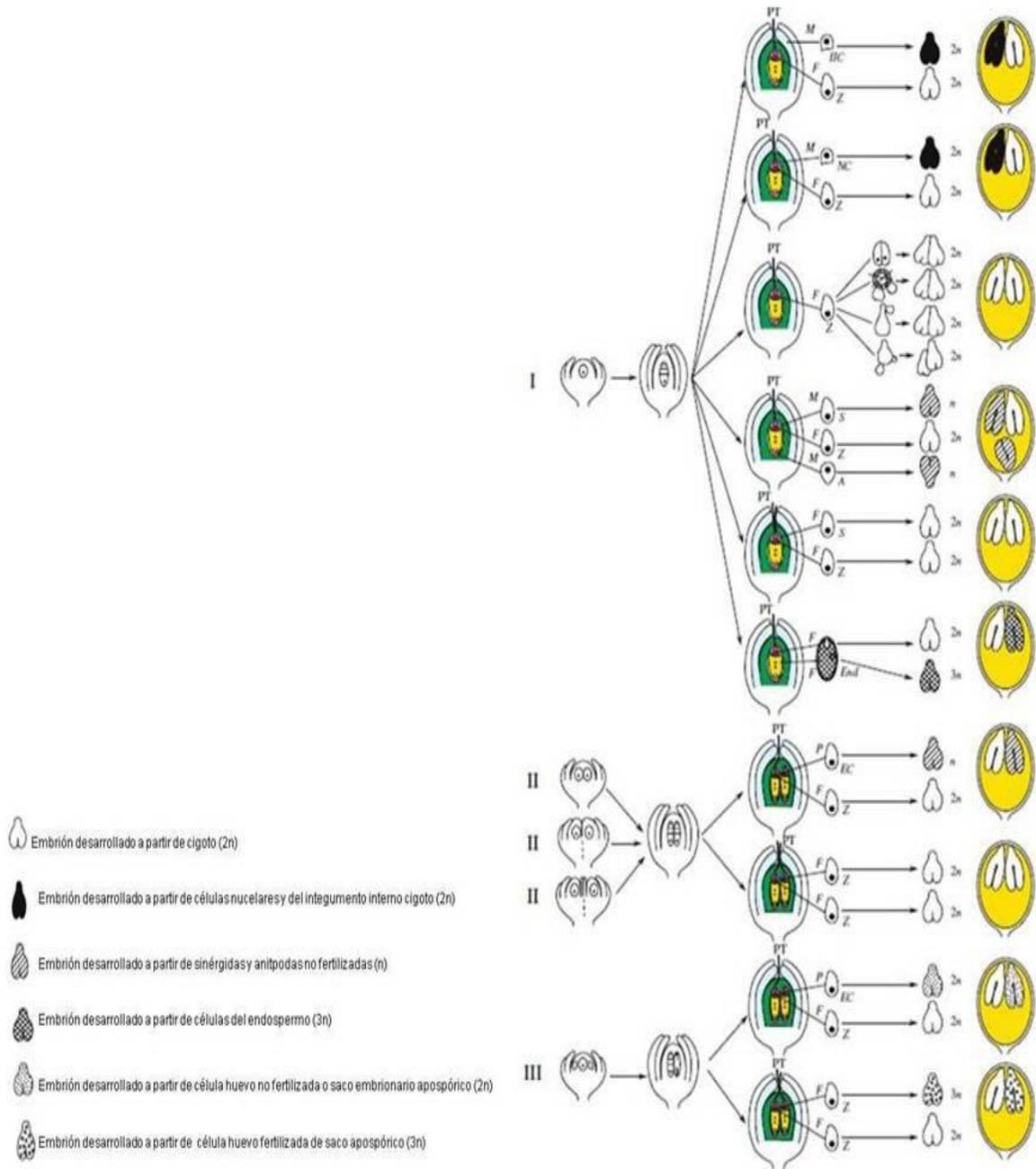
células se mantengan en un estado indiferenciado en la mórula proliferante y que a su vez, estimule la proliferación. Craig y col. (1997) sugirieron que los factores que influyen sobre la poliembrionía en los animales podrían ser: la variabilidad ambiental relacionada con la disponibilidad de nutrimentos y una ovogénesis de larga duración.

Lo anteriormente expuesto se centra en una explicación de la ocurrencia de la poliembrionía en los animales desde el punto de vista evolutivo. En las plantas, el término poliembrionía se refiere a la presencia o producción de más de un embrión por semilla (Durzan, 1988; Allem, 2004; Naumova, 2008), siendo la producción de un solo embrión lo que normalmente ocurre. El primer registro de poliembrionía fue el realizado por Leeuwenhoek en 1719 y fue encontrada en semillas del género *Citrus* (Durzan, 2008; Batygina y Vinogradova, 2007).

A diferencia de los animales, en las plantas existe una mayor variedad de formas en las cuales los poliembriones pueden ser formados. El desarrollo de la poliembrionía puede involucrar a: una variedad de procesos (*e.g.* partición, gemación, partenogénesis, fecundación múltiple); diferentes estrategias reproductivas (sexual o asexual) (Batygina, 2005); diferentes células originales (nucelares, integumentales, huevo, sinérgidas, antípodas, endospermo), además de la participación en este proceso de las dos fases del ciclo de vida vegetal (el esporofito y el gametofito). Aún más, la formación de dos sacos embrionarios también puede ocurrir (Koltunow, 1993). Toda esta variedad de eventos pueden llevar a la formación de diferentes tipos de embriones que pueden presentar diferentes niveles de ploidía. En las semillas, en dónde la poliembrionía ha ocurrido, los procesos sexuales y asexuales se desarrollan uno al lado del otro (Koltunow, 1993; Batygina y Vinogradova, 2007).

En términos generales, la poliembrionía puede ser dividida como esporofítica y gametofítica basada en las células que originan al embrión, si el embrión es formado a partir de las células somáticas del esporofito (células somáticas del cigoto, nucela, o el integumento) entonces, la poliembrionía es llamada esporofítica. Si el embrión está formado por células que provienen del gametofito (huevo, sinérgidas, antípodas), entonces el embrión es llamado gametofítico (Batygina y Vinogradova, 2007).

Existe una gran variedad de mecanismos posibles a partir de los cuales los embriones se pueden formar. Batygina y Vinogradova (2007) describieron diez posibles mecanismos que pueden originar la poliembrionía (Fig. 3) De acuerdo a estos autores, estos mecanismos pueden incluir la participación de un saco embrionario reducido, dos sacos embrionarios reducidos, un saco embrionario reducido con un saco embrionario no reducido dentro del mismo óvulo; la fecundación puede estar involucrada pero, no siempre es necesaria y la fecundación de la célula huevo y de las sinérgidas puede estar ocurriendo; el desarrollo de embriones a partir del endospermo es otra vía posible. Además, embriones somáticos pueden formarse a partir de células nucleares e integumentales o a partir de la fisión o gemación del cigoto.



**Figura 3.** Vías posibles de formación de varios embriones en una misma semilla: (I) A partir de células de un saco embrionario y tejidos circundantes; (II) como resultado del desarrollo de dos sacos embrionarios; (III) como resultado del desarrollo de un saco embrionario adicional apospórico. M, mitosis; F, fertilización; P, partenogénesis; A, antípoda; Z, cigoto; IIC, células del integumento interno; NC, células nucleares; PT, tubo polínico; S, sinérgida; End, endospermo; EC, célula huevo. Modificado de Batygina y Vinogradova (2007).

Todas estas variaciones pueden llevar a la posibilidad de formar: a) embriones haploides a partir ya sea de una célula huevo reducida, una sinérgida reducida o una célula antípoda que se

divide mitóticamente formando al embrión; b) embriones triploides desarrollados a partir del tejido del endospermo o por la fecundación de una célula huevo no reducida; c) poliembriones normales diploides que surgen a partir de embriogénesis somáticas de células nucleares e integumentales.

Tal y como se mencionó anteriormente, en la reproducción sexual vegetal normal, un saco embrionario se desarrolla en un óvulo. La formación del saco embrionario inicia cuando una célula de la nucela se diferencia y da origen a la célula madre de la megaspora. La célula madre de la megaspora atraviesa por procesos meióticos dando como resultado cuatro células haploides, solamente una de estas células haploides (conocida como megaspora) entrará en una serie de divisiones mitóticas que darán origen al saco embrionario o el megagametofito. Mediante la reproducción sexual normal, un único embrión es formado a partir de la fecundación de la ovocélula por una célula espermática y el endospermo es formado a partir de la fusión de una segunda célula espermática con dos núcleos polares. Después de la fecundación de la ovocélula, y sus divisiones mitóticas posteriores formarán al embrión cigótico.

Los procesos de reproducción asexual dentro del óvulo (apomixis) pueden originar un solo embrión, pero también pueden originar poliembriones. Koltunow (1993) describió que cuando la poliembriogénesis ocurre en la apomixis, un saco embrionario normal se origina (un saco reducido), el cual puede seguir su proceso sexual normal, pero un saco embrionario extra se forma a partir de células diferenciadas de la nucela las cuales no pasaron a través de la meiosis pero las cuales se dividieron mitóticamente formando un saco embrionario no reducido, la célula huevo presente en este segundo saco embrionario no reducido se desarrolla sin fertilización en un embrión con el mismo genotipo del esporofito materno. Este mismo autor, al igual, mencionó que otro proceso apomítico vendría de embriones desarrollados a partir del cuerpo del esporofito materno, un proceso denominado embriónía adventicia.

Otra variación de este proceso normal sexual ocurre cuando el único embrión cigótico sexual normal presenta lo que se llama poliembrionía por fisión monocigótica, esta poliembrionía es

una manera de formación de embriones somáticos a partir del esporofito hijo, el cigoto o un embrión multicelular (Batygina y Vinogradova, 2007). En este tipo de poliembrionía, este proceso se puede originar cuando las dos células hijas de la primera división mitótica del cigoto originan cada una un embrión independiente, cuando ocurren varias divisiones del cigoto formando una masa de células a partir de la cual varios embriones se forman a partir de las células superficiales, o cuando resultan de la fisión del embrión, o a partir de las células uniseriadas del suspensor (Batygina y Vinogradova, 2007). La poliembrionía por fisión se origina de la división de un cigoto o una masa proembriónica en dos embriones independientes que son genotípica y fenotípicamente idénticos (Nowaczyk y Nowaczyk, 2006). La gemación se refiere a protuberancias que se originan del embrión sexual original y después se diferencian en uno o varios nuevos individuos (Durzan, 1988). Se ha mencionado que no todos los embriones provenientes de la fisión monocigótica originan a dos embriones completamente separados (Durzan, 2008) y que este proceso puede ser permanente o transitorio (Durzan, 1988). Muchas angiospermas y gimnospermas tienen el potencial de exhibir poliembrionía por fisión monocigótica (Durzan, 2008). Existe información que muestra que este fenómeno no es despreciable. Un porcentaje del 19 %, de un total de 233 especies poliembriónicas de angiospermas, presenta poliembrionía por fisión monocigótica (Ganeshaiyah y col., 1991). Este tipo de poliembrionía ha sido encontrado en *Zea mays* (Sharman, 1942) y ha sido encontrado o se sugiere su ocurrencia en varias especies de dicotiledóneas y monocotiledóneas (Schneider, 2007; Swamy, 1943; Norstog, 1957; Sarkar y Coe, 1966; Tokumasu, 1972; Medina-Filho y col., 1993; Fukai y col., 2000; Batygina y col., 2003; Batygina, 2005; Ditommaso y col., 2005; Nowaczyk y Nowaczyk, 2006; Batygina y Vinogradova, 2007) ha sido encontrado, inclusive, en *Citrus* (Frost, 1938; Medina-Filho y col., 1993; Das y col., 2007), un género reconocido por su capacidad para producir muchos poliembriones apomicticamente (Medina-Filho y col., 1993; Das y col., 2007).

Se considera que el fenómeno de la poliembrionía es promovido en las coníferas bajo condiciones climáticas extremas como las que se encuentran en el Ártico, y que la persistencia de los poliembriones se correlaciona con la presencia de heladas tempranas, mientras que el

desarrollo pobre de las semillas se relaciona con sumas insuficientes de temperatura y un periodo de crecimiento corto (Durzan, 2008). Aunque este evento se encuentra bajo dichas circunstancias, Salomao y Allem (2001) mencionaron el registro de la poliembrionía en el 20% de las 75 especies estudiadas bajo condiciones tropicales en Brasil. Otro ejemplo de especies tropicales que presentan poliembrionía es *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Wx DC.) Standl (Souza y col., 2005).

Para Naumova (2008) la poliembrionía es un rasgo característico de la embrionía adventicia. Al igual, en este trabajo se hace mención que los embriones asexuales pueden originarse tanto en la zona micropilar de la semilla como en la calazal (Naumova, 2008).

## **5.9 El desarrollo embrionario en angiospermas**

Tal y como ya fue mencionado, el embrión sexual de las angiospermas se desarrolla a partir de la fertilización de la ovocélula ubicada dentro del saco embrionario, el cual a su vez se encuentra embebido en el tejido protector materno del óvulo (Dumas y Mogensen, 1993; Dodeman y col., 1997; Berleth y Chatfield, 2002). Tanto el embrión, como el saco embrionario (Dodeman y col., 1997; Berleth y Chatfield, 2002); y el óvulo son estructuras que presentan polaridad (Berleth y Chatfield, 2002). El embrión sexual da origen a la generación esporofítica en las plantas superiores y el cual se inicia con el evento de la doble fertilización la que a su vez, resulta en la formación de un cigoto y de una célula progenitora del endospermo (West y Harada, 1993, Rao, 1996, Dodeman y col., 1997; Harada, 1999).

Comúnmente, el cigoto en las angiospermas se divide transversalmente (Capron y col., 2009) 2002), originando a una célula apical que originará al embrión y una célula basal que dará origen al suspensor (Goldberg y col., 1994; Rao, 1996; Dodeman y col., 1997; Harada, 1999). En la mayoría de los casos, el suspensor tiene una función temprana en la embriogénesis y después se degenera durante estadios tardíos de desarrollo, encontrándose ausente en la semilla madura (Yeung y Meinke, 1993).

Durante la embriogénesis, una sola célula origina a un organismo multicelular funcional (Berleth y Chatfield, 2002), es durante este proceso que el cigoto atraviesa por una serie de cambios morfológicos y celulares complejos que dan como resultado la formación de un embrión maduro con un eje embrionario con dos polos: el brote y la raíz; y además de los cotiledones, los cuales contienen niveles altos de macromoléculas de almacenamiento como proteínas y lípidos (West y Harada, 1993). Los eventos que ocurren durante el desarrollo embrionario establecen la organización del cuerpo vegetal (West y Harada, 1993; Goldberg y col., 1994; Dupree, 1996; Harada, 1999) y preparan al embrión para la latencia y la germinación (West y Harada, 1993). En otras palabras, los fenómenos que caracterizan a la embriogénesis son: (i) la especificación de los meristemas y el establecimiento del patrón corporal de brote-raíz, (ii) la diferenciación de los tipos primarios de tejidos vegetales, (iii) la generación de un órgano de almacenamiento esencial para la germinación de la semilla y el desarrollo de la plántula, y (iv) el paso del esporofito por un período de latencia hasta que las condiciones sean favorables para el desarrollo post-embionario (Goldberg y col., 1994).

Dos eventos críticos deben ocurrir después de que la cabeza embrionaria se forma: (i) las regiones a través del eje longitudinal apical-basal deben diferenciarse la una de la otra y generar sistemas de órganos embrionarios, y (ii) las tres capas de tejidos primordiales del embrión deben especificarse (Goldberg y col., 1994). Dos de estos eventos deben llevarse a cabo durante la fase de transición entre lo que se conoce como el estadio globular y el estadio acorazonado (Goldberg y col., 1994).

Harada (1999) mencionó que en el embrión de una “dicotiledónea”, primero, el cigoto atraviesa una división asimétrica, produciendo células con diferentes destinos. La primera división asimétrica en el cigoto origina una célula basal que producirá la mayor parte de lo que se llama el suspensor (Rao, 1996; Dodeman y col., 1997; Harada, 1999) y la hipófisis (Harada, 1999); y una célula apical que origina al embrión (Rao, 1996; Dodeman y col., 1997; Harada, 1999). En segundo lugar, las divisiones periclinales dentro del estadio de ocho células generan al primer tejido embrionario, el protoderma (Harada, 1999). Las divisiones subsecuentes en los embriones globulares producen células elongadas en el centro del embrión que definen el

tejido del procambium y al tejido del meristemo basal (Harada, 1999). Tercero, en el estadio globular, la división de la célula situada en la parte superior del suspensor define a una célula en forma de lente, “la hipófisis”, que origina a una parte del centro quiescente y las células iniciales de la cofia de la raíz. Cuarto, durante la transición del estadio globular al estadio acorazonado de la embriogénesis, divisiones celulares localizadas generan a los cotiledones, los cuales son órganos embrionarios de almacenamiento de nutrimentos. Quinto, llegando al estadio del torpedo, tanto los meristemos del brote como los de la raíz son estructuras visibles y organizadas.

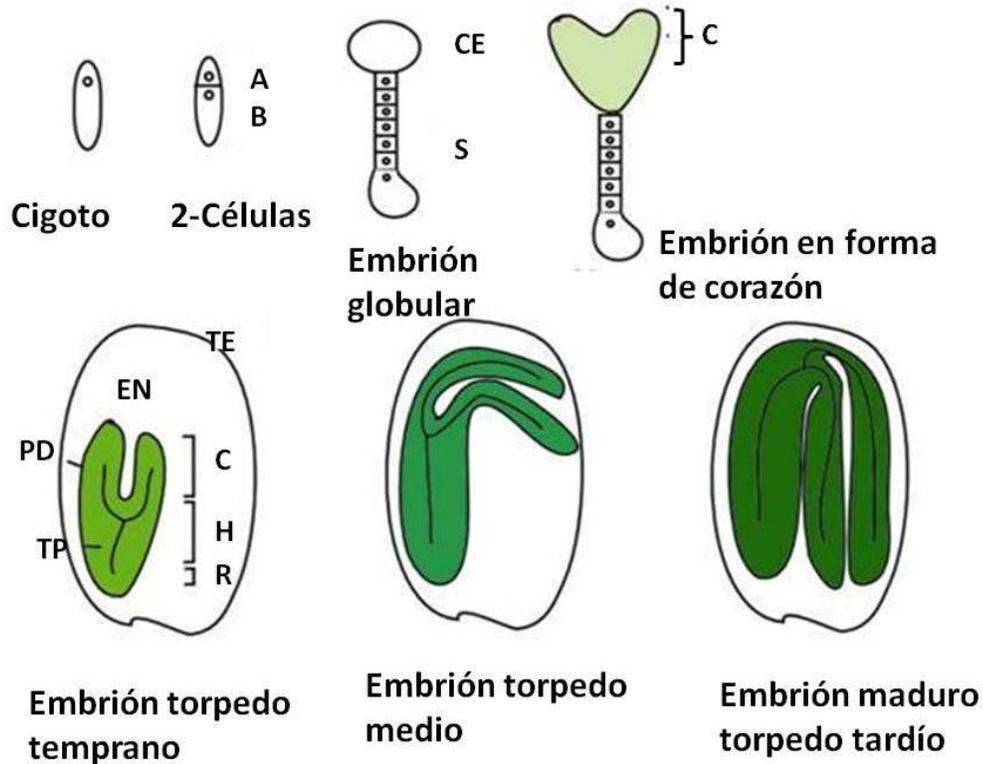
Parece que de manera temprana en los embriones de *Arabidopsis* existen tres dominios, el apical, central y el basal (Harada, 1999). La región apical se deriva de la parte superior del embrión en el estadio de ocho células. Aunque el destino celular se determina, generalmente, por su posición, la región apical comúnmente contribuye al meristemo apical del brote y la mayoría de los cotiledones (Harada, 1999).

Parte de los cotiledones, el hipocotilo, la raíz, y las células iniciales del meristemo apical de la raíz se originan de la región central o dominio central, una región que proviene de la parte más baja del embrión en su estadio de ocho células (Harada, 1999). La región basal origina el centro quiescente del meristemo apical de la raíz (Goldberg y col., 1994; Harada, 1999), y las células centrales de la cofia. Las células de la región basal del embrión son descendientes de la hipófisis, la célula superior del suspensor (Goldberg y col., 1994; Harada, 1999). De esta manera, los linajes derivados de la célula basal dan origen al suspensor y parte de la región de la radícula del eje embrionario (Goldberg y col., 1994).

Conceptualmente, la embriogénesis en plantas puede ser comparable al desarrollo completo en los animales. Sin embargo, los mecanismos no son similares (Dupree, 1996). Existe evidencia que soporta la idea de que los procesos de la división y expansión celular tienen una importancia especial en las plantas, asociadas muy probablemente a las limitaciones por la posesión de una pared celular (Dupree, 1996). A diferencia de sus contrapartes (los animales), las plantas no presentan migración celular durante el desarrollo, la pared celular se mantiene

con la célula de por vida, proveyendo de un registro histórico y posicional de los orígenes del desarrollo. Por lo tanto, la formación del patrón en las plantas es en gran medida dependiente de dos procesos claves en la formación de la pared: la división celular y la expansión celular (Dupree, 1996).

El cigoto rápidamente adquiere el potencial para desarrollarse en un embrión y atraviesa por una serie compleja de cambios morfológicos y celulares (Rao, 1996). Durante este periodo, se presentan los mecanismos que establecen la polaridad, existe una diferenciación de los sistemas de tejidos (Rao, 1996). Estudios realizados en la especie eudicotiledónea *Arabidopsis thaliana* han establecido varios estadios generales que se consideran representativos para todas las especies que antes se clasificaban dentro de las dicotiledóneas. Estos estadios se han basado en la forma del embrión y se han denominado: globular, oblongo, acorazonado, torpedo, estadio cotiledonar y estadio de embrión maduro deshidratado (Dodeman y col., 1997). Otros autores consideran que los estadios en *Arabidopsis* pueden ser denominados como: estadio globular, estadio en forma de corazón, embrión torpedo temprano, embrión torpedo medio y embrión maduro torpedo tardío (Fig. 4) (Kim y col. 2002).



**Figura 4.** Representación esquemática de los estadios del desarrollo embrionario en *Arabidopsis*. En la figura se pueden observar los estadios representativos para esta especie: Cigoto; dos células; embrión globular; embrión en forma de corazón; embrión torpedo temprano; embrión torpedo medio, embrión maduro torpedo tardío. El cigoto se divide para formar un embrión compuesto por un suspensor filamentososo (S) que mantiene contacto con los tejidos maternos, y una cabeza embrionaria terminal (CE). El embrión adquiere un color verde en el estadio de desarrollo en forma de corazón cuando inicia la producción de clorofila y cloroplastos. El suspensor se degenera durante el estadio en forma de torpedo. A=célula apical; B=célula basal; C=cotiledón; PD= protodermo; TP= tejido provascular; H=hipocotilo; R=radícula; TE= testa; EN= endospermo. Modificado de: Kim y col. (2002).

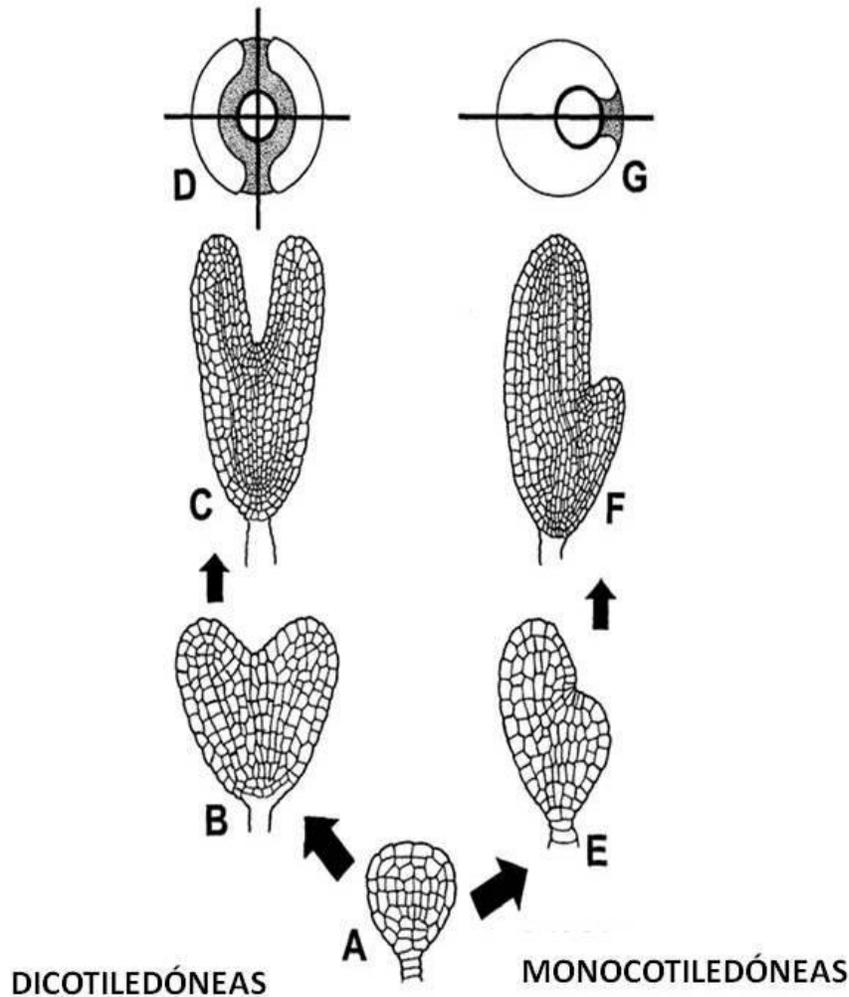
Durante la transición del estadio globular al estadio cotiledonar el cual coincide con el inicio del primordio de la raíz, seguido en las “dicotiledóneas” por el primordio apical del brote (Dodeman y col., 1997), los órganos embriónicos y los diferentes tipos de tejidos se diferencian durante la fase de transición del estadio globular y en forma de corazón (Goldberg y col., 1994). En este estadio, la embriogénesis, *sensu stricto* puede ser considerada como finalizada (Dodeman y col., 1997). Después de esto, a nivel morfogénético, la actividad meristemática es disparada al nivel fisiológico, el proceso del crecimiento, almacenamiento y la maduración son iniciadas (Dodeman y col., 1997). Los cambios fisiológicos, como la

desección y en la mayoría de los casos quiescencia, completan el proceso de la formación de la semilla (Dodeman y col., 1997). El fortalecimiento y la lignificación de los integumentos del óvulo originan la formación de una cubierta dura la cual es necesaria para la conservación de la semilla (Dodeman y col., 1997).

Los estadios embrionarios conocidos como: estadio globular, acorazonado (en forma de corazón), y torpedo son estadios asignados a las especies que antes eran consideradas como dicotiledóneas. La especie *Arabidopsis thaliana* ha sido utilizada como modelo para la descripción de los procesos de desarrollo en las “dicotiledóneas”.

Para la descripción del desarrollo embrionario en las monocotiledóneas, se ha utilizado a las especies de gramíneas como modelo. Algunos autores consideran que de todos los estadios que se han considerando para lo que se conocía anteriormente como dicotiledóneas, las monocotiledóneas no presentan el estadio acorazonado (Kaplan y Cooke, 1997; Alemán, y col., 2002) ni el estadio torpedo (Alemán, y col., 2002). Además, la terminología aplicada para la dicotiledóneas no es utilizada para los embriones de las monocotiledóneas. En la figura 5 se pueden observar las diferencias entre monocotiledóneas y “dicotiledóneas” en los estadios del desarrollo embrionario.

En las monocotiledóneas se produce un solo cotiledón denominado escutelo, produciendo una simetría de manera consiguiente en el ápice vegetativo caulinar situado a un lado del cotiledón (coleóptilo) el cual se encuentra protegiendo a la plúmula; el tejido central del solo cotiledón tiene conexión con el cilindro central y con el eje del hipocótilo (Dodeman y col., 1997)



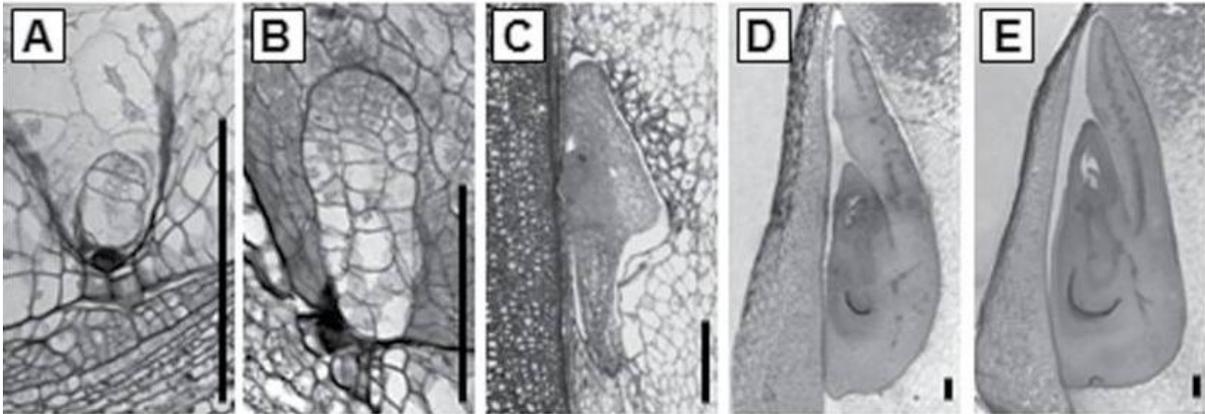
**Figura 5.** Modelos de desarrollo embrionario en dicotiledóneas y monocotiledóneas. A) Estadio globular temprano. B y C) Estadios tempranos en dicotiledóneas. E y F) Estadios tempranos en monocotiledóneas. Planos de simetría vistos en cortes transversales en embriones de dicotiledóneas (D) y monocotiledóneas (G). Modificado de: Burger (1998).

En el trabajo realizado por Jiu-Huan y col. (2003) sobre la embriogénesis de la monocotiledónea *Zea mays* se establece que el embrión del maíz posee una dorsoventralidad y un dimorfismo en los cotiledones. Durante la etapa tardía del proembrión, la cabeza embrionaria se desarrolla en dos partes: el vientre y el dorso. El vientre crece del centro del lado ventral. El dorso se compone de un área marginal del lado ventral y toda la parte dorsal de la cabeza embrionaria. Durante el desarrollo temprano del embrión, el vientre se diferencia

en el coleoptilo, el meristemo apical, el hipocotilo, la radícula y la parte principal de la coleorriza. Además, la emergencia del primordio del hipocotilo y el coleoptilo y las células iniciales de la radícula ocurre en el eje de la cabeza embrionaria. El primordio del coleoptilo se expande a partir de sus dos extremos hacia la izquierda y la derecha para formar un anillo, las células iniciales de la radícula se expanden en todas las direcciones para formar una punta radicular cónica. Todas estas actividades morfogenéticas del vientre siguen un patrón simétrico bilateral. El dorso forma el primordio del escutelo. Después el primordio del escutelo se expande rápidamente hacia la izquierda, derecha, al frente y la parte trasera, mientras que se va engrosando como si se tratara de esconder a todos los componentes que se originan de la parte ventral en la hendidura longitudinal del escutelo. Al final, las brácteas laterales derechas e izquierdas emergen de los bordes de la hendidura longitudinal y se expanden hacia la línea central del eje. Como consecuencia, morfológicamente, la simetría bilateral de lado ventral se revela enteramente (Jiu-Huan y col., 2003).

Morfogenéticamente, el primordio del coleoptilo y el meristemo apical en el maíz son similares al coleoptilo (cotiledón apical) del embrión de arroz, así es que el coleoptilo del embrión del maíz, puede también ser considerado como un cotiledón apical. El escutelo es un cotiledón lateral. Estos cotiledones dimórficos del embrión de maíz se originan de la cabeza embrionaria de manera dorsoventral (Jiu-Huan y col., 2003). Tal y como se acaba de mencionar para Jiu-Huan y col. (2003) el embrión de maíz presenta dos cotiledones.

Estos autores consideran que los cuatro estadios secuenciales en el desarrollo embrionario del maíz son los siguientes: 1) estadio proembrionario, este estadio cubre el período entre la primera división celular del cigoto hasta la aparición del dorso y el vientre; 2) el estadio de diferenciación rápida del vientre; 3) el estadio de la expansión rápida del escutelo; 4) el estadio del desarrollo de la bráctea lateral (o el estadio de la formación de la cubierta embrionaria) (Fig. 6).



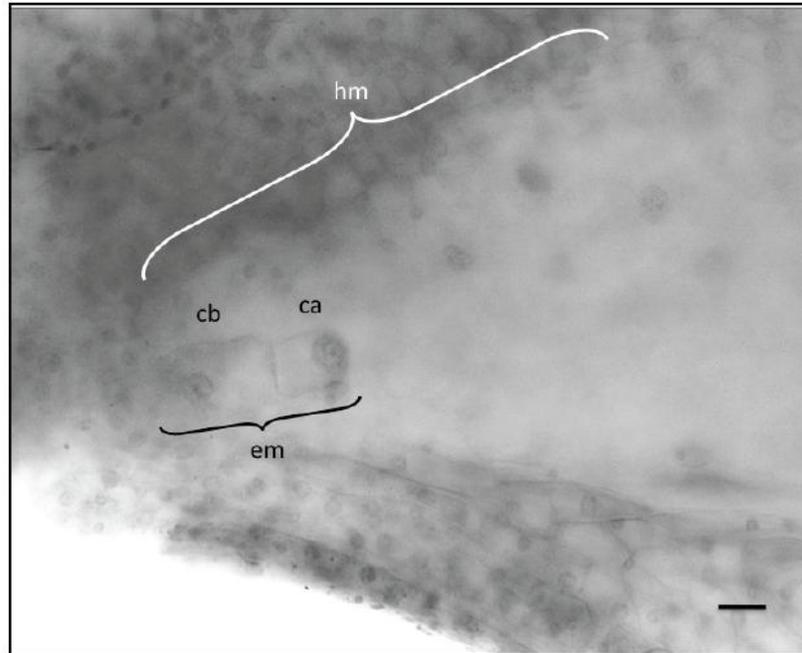
**Figura 6.** Secciones longitudinales de cariopses de maíz teñidas empleando el procedimiento ácido periódico de Schiff y fotografiadas. En la figura se pueden apreciar los distintos estadios embrionarios asignados a maíz. A) y B) Periodo proembrionario; C) Estadio de aparición del dorso y el vientre; D) Estadio de la expansión rápida del escutelo; E) El estadio del desarrollo de la bráctea lateral. Barras= 200 mm. Modificado de Sosso y col. (2012).

En los párrafos anteriores se explicó cómo se desarrollan los embriones que se generan de manera sexual. Sin embargo, se debe recordar que para el caso de las plantas, la embriogénesis puede ser asexual mediante el desarrollo de un embrión a partir de células somáticas (Rao, 1996; Dodeman y col., 1997). El cigoto es intrínsecamente embriogénico, sin embargo, las células somáticas no lo son (Dodeman y col., 1997). Las células somáticas requieren de la inducción de la competencia embriogénica en células que no son naturalmente embriogénicas (Dodeman y col., 1997). El desarrollo de embriones no cigóticos puede ocurrir en un rango amplio de especies vegetales. Dichos embriones somáticos se desarrollan ya sea de tejidos vegetativos o de los tejidos reproductivos maternos (Rao, 1996). Entre estos embriones podemos encontrar a los embriones somáticos los cuales pueden ser inducidos en medios sintéticos suplementados con reguladores de crecimiento vegetal, auxinas y citocinina (Rao, 1996). Dado que la embriogénesis somática aparentemente sigue los mismos procesos de desarrollo de los embriones cigóticos y dada la dificultad en el trabajo con embriones cigóticos, la embriogénesis somática ha servido para elucidar los cambios morfológicos y procesos moleculares sucedidos durante la embriogénesis cigótica.

### **5.10 El desarrollo embrionario en *Agave tequilana* Weber var. Azul**

Solamente se encontró un estudio que de forma detallada explica cómo ocurre la fecundación y el desarrollo del cigoto hasta su primera división celular en *A. tequilana*. Este estudio fue el realizado por González-Gutiérrez (2013). Toda la información sobre la fecundación y la primera división celular aquí presentada se obtuvo de dicho estudio.

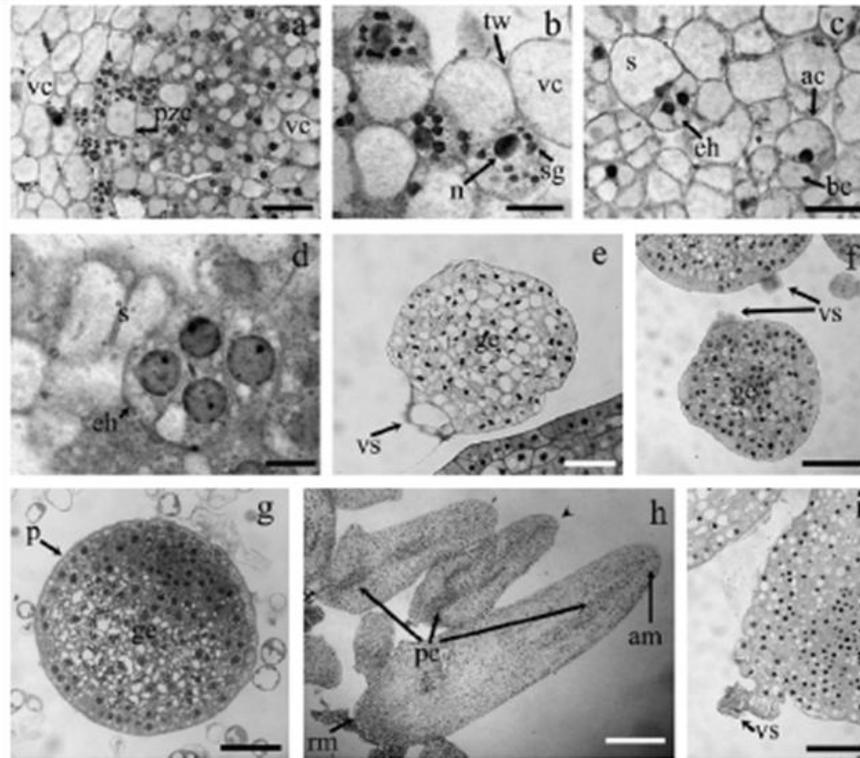
La doble fecundación (la fecundación de la célula huevo por un núcleo espermático y la célula central por el otro núcleo espermático) en *A. tequilana* puede ocurrir a los 3 ó 4 d después de que ocurre la polinización. El tubo polínico penetra una de las sinérgidas (la cual degenera) y descarga los dos núcleos espermáticos al interior del saco embrionario; uno de los núcleos espermáticos fecunda a la célula huevo, mientras que el otro núcleo espermático fecunda a la célula central. Después de formarse el cigoto se puede apreciar que ocurre un alargamiento (aproximadamente tres veces su tamaño original). Las células del endospermo continúan dividiéndose rápidamente situándose mayormente en la región media y calazal del saco embrionario. El endospermo presenta varias divisiones antes de que el cigoto presente su primera división. Al octavo día después de la polinización se observa la primera división del cigoto. Esta división ocurre de forma transversal y da lugar a dos células, una basal y una apical. La célula apical dará origen a la cabeza embrionaria. Al igual que en el cigoto, el núcleo de la célula apical del embrión muestra una alta polaridad hacia el extremo calazal. Esta polaridad resulta en una división asimétrica del embrión por lo que la célula apical es de menor tamaño a la célula basal presentando un gran núcleo bien definido, mientras que la célula basal parece estar altamente vacuolada (Fig. 7) (González-Gutiérrez, 2013).



**Figura 7.** Primera división del cigoto en la especie *A. tequilana*. En esta primera división se puede observar la formación de la célula apical y la célula basal al igual que la polaridad de la célula apical; em=embrión, ca=célula apical, cb=célula basal, hm= haustorio micropilar. Barra=20µm. Fuente: González-Gutiérrez (2013).

Hasta la fecha de la realización del presente trabajo, no se había encontrado ningún trabajo que tratará sobre las distintas etapas del desarrollo embrionario más allá de la primera división celular del embrión cigótico en la especie *Agave tequilana*. Sin embargo, en el trabajo de Portillo y col. (2007) acerca de la embriogénesis somática en esta especie, se puede apreciar que los embriones somáticos de *A. tequilana* pueden formarse a partir de una célula embrionaria la cual presenta gránulos grandes de almidón, según las imágenes, presentadas por estos autores, parece ser que esta célula sufre una división transversal que tendrá como consecuencia una polarización en la estructura embrionaria, en dónde una célula dará origen al embrión y otra célula dará origen al suspensor. De igual forma, parece ser que la célula apical presenta otras series de divisiones, algunas en el plano longitudinal hasta que se forma el

estadio globular, de éste estadio se pasa al estadio de torpedo. En dicho trabajo no se publicaron imágenes que presenten ningún otro estadio intermedio entre el estadio globular y el estadio de torpedo (Fig. 8).



**Figura 8.** Etapas tempranas de embriogénesis somática en *A. tequilana* Weber cultivar Azul. **a)** Callo formado por células no competentes y células embriogénicas conteniendo grandes cantidades de gránulos de almidón. Barra = 40  $\mu\text{m}$ . **b)** Células embriogénicas polarizadas conteniendo grandes cantidades de gránulos de almidón Barra= 20  $\mu\text{m}$ . **c)** Estructuras embriogénicas polarizadas resultado de la primera y la segunda división de las células embriogénicas. Barra = 30  $\mu\text{m}$ . **d)** Proembrión de cuatro células con una estructura similar al suspensor. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . **e)** y **f)** Embriones globulares con suspensores vestigiales. Barra = 50  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ . **g)** Embrión globular somático sin suspensor. Barra = 75  $\mu\text{m}$ . **h)** Embriones en estadio de torpedo mostrando células iniciales del procambium. Barra = 350  $\mu\text{m}$ . **i)** Acercamiento del suspensor vestigial del embrión de la imagen h. Barra= 20  $\mu\text{m}$ . pzc: Célula polarizada; vc: célula vacuolada; sg: granos de almidón; n: núcleo; tw: pared engrosada; eh: cabeza embrionaria; s: suspensor; ac: célula apical; bc: célula basal; ge: embrión globular; vs: suspensor vestigial; p: protoderma; pc: hebras del procambium; rm: meristemo radicular, am: meristemo apical. Fuente: Portillo y col. (2007).

### **5.11 El desarrollo de cotiledones en angiospermas y los estados monocotiledonar y dicotiledonar**

El cotiledón es un órgano terminalmente diferenciado que acumula reservas alimenticias que son utilizadas por la plántula para su crecimiento y desarrollo antes de que sea fotosintéticamente activa (Goldberg y col., 1994).

La división formal de la especies de las angiospermas en las clases Dicotyledonae (dicotiledóneas) y Monocotyledonae (monocotiledóneas) fue creada por John Ray en su *Methodus Plantarum Nova* en el año 1862 (Chandler, 2008). Además, de otras características, esta división se basaba en el número de cotiledones presentes en los embriones maduros (uno en las monocotiledóneas y dos en las dicotiledóneas). Durante el desarrollo del embrión de las angiospermas el cigoto pasa a través de diferentes estadios, el primero es llamado el estadio globular cuando el embrión está formado por una esfera de células con una simetría radial (Fig. 5A). El siguiente estadio se encuentra cuando uno o dos cotiledones se desarrollan cerca del sitio del meristemo apical del brote (Figs. 5B, 5E). Durante el desarrollo del embrión monocotiledoneo, el cigoto atraviesa del estadio globular al estadio con simetría bilateral (Fig. 5E) (Fischer y Neuhaus, 1996; Matthys-Rochon y col., 1998, Fischer Iglesias y col., 2001). En las “dicotiledóneas”, dos cotiledones se desarrollan y el estadio cambia de un embrión globular a un embrión en forma de corazón o acorazonado (Fig. 5B), el embrión se elonga para formar el embrión en forma de torpedo (Fig. 5C). Las monocotiledóneas, por supuesto, no tiene un estadio en forma de corazón debido a que solamente se forma un solo cotiledón (Leyser y Day, 2002).

Antes de la obtención de herramientas de estudio molecular, la clasificación de los seres vivos se realizaba a través de los caracteres morfológicos. Un carácter morfológico importante en el establecimiento de los grupos de angiospermas era la morfología en los cotiledones de los embriones. Bancroft (1914) estableció que entre el año 1829 y el 1832 propuso una clasificación que dividió a las angiospermas basándose en las características morfológicas de sus embriones en: dicotiledóneas y kryptocotiledóneas. Para este autor las kryptocotiledóneas

presentaban un subgrupo que contenía solamente a las “Gramineae” y las “Syncotyledónea”. En las syncotyledóneas se incluía a las Liliae, Aroideae, Naiadeae, Palmae, Scitamineae, Nymphaeaceae y Cycadas. La clasificación de Agardh se basaba en el hecho de que él consideraba a los embriones dicotiledóneos como típicos y a los embriones sincotiledóneos como derivados de este por la fusión de dos cotiledones originales. Agardh se refirió a los pastos como los verdaderos monocotiledóneos, el embrión en este caso siendo derivado de un tipo dicotiledóneo por la supresión de un cotiledón. Si las monocotiledóneas obtuvieron evolutivamente su monocotiledón de estructuras derivadas de un acervo dicotiledonar, entonces, esto debió haber sido alcanzado por la sincotilia y la heterocotilia (Bancroft, 1914).

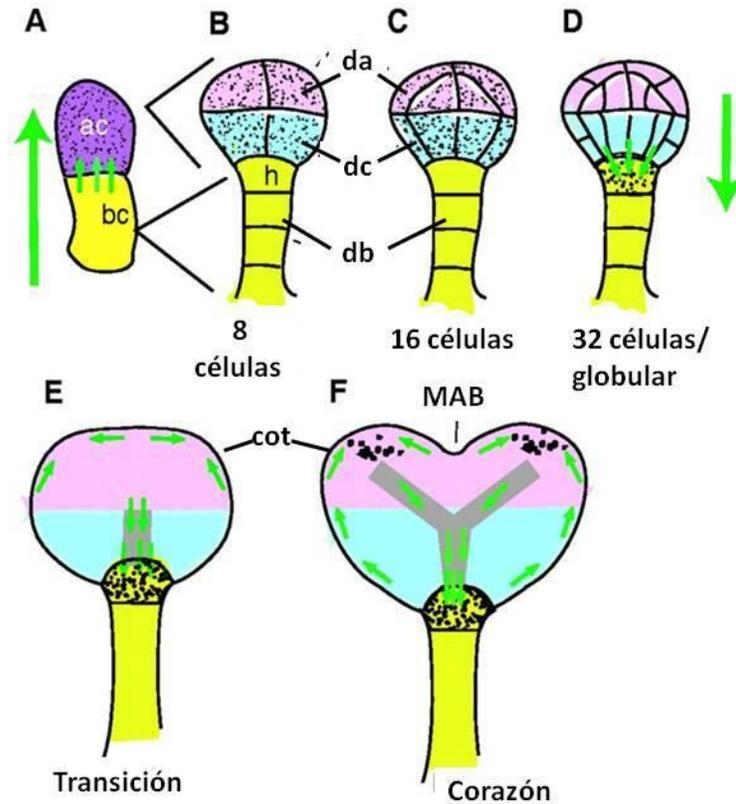
La sincotilia es un concepto empleado para la descripción de la fusión de dos cotiledones para formar un miembro (Bancroft, 1914), se puede referir a la fusión parcial o completa de los cotiledones, tal y como existe en las especies de *Calphyllum*, *Swietenia*, *Guarea*, y *Carapa* en las cuales los cotiledones se encuentran distalmente fusionados (Datta, 1988 en Chandler, 2008). Sargent (1903) propuso una teoría en donde se estableció que el único cotiledón encontrado en las monocotiledóneas fue primitivamente originado por la fusión de dos cotiledones. Esta teoría se basó en la estructura vascular de 25 especies de monocotiledóneas pertenecientes a diferentes familias y por el hecho de que algunas especies de dicotiledóneas pueden presentar una fusión parcial o completa de sus cotiledones. Esta evidencia presentada por Sargent fue expandida en el trabajo realizado por Haines y Lye (1979), en donde ellos presentaron evidencia de la sincotilia en embriones pertenecientes a las familias “dicotiledóneas” Apiaceae (Umbelliferae), Ranunculaceae y Combretaceae. Estos embriones dicotiledonares pueden presentar una fusión total o parcial, y cuando se presentan, estas fusiones se asemejan a las encontradas en algunos embriones de monocotiledóneas. El caso opuesto-especies monocotiledóneas presentando embriones dicotiledonares ha sido reportado desde el año 1914 en los géneros *Cyrtanthus* y *Agapanthus*; en el año 1920 en el género *Colocasia* (Haines y Lye, 1979).

En el año 2003, Titova examinó los porcentajes de los embriones presentes en la especie monocotiledónea *Agapanthus praecox* Willd. con fusión de cotiledones y dicotiledonares (1 y

6 % respectivamente). Shuma y Raju (1991) consideraron a la especie monotocotiledónea de la avena silvestre (*Avena fatua* L.) como una especie con presencia en realidad de dos cotiledones en lugar de uno, considerando al escutelo del embrión como el primer cotiledón y al primer primordio foliar como el segundo cotiledón. Al igual, Raju y Steeves (1998) consideraron a los embriones de la avena silvestre como embriones con dos cotiledones.

En términos hormonales, existen varios estudios que han resaltado el papel de las auxinas en la formación de los cotiledones durante el desarrollo embrionario. El cotiledón es el primer órgano que se forma durante la embriogénesis de las plantas (Madishetty y col., 2006). Después de la germinación, el cotiledón mantiene el crecimiento de la plántula hasta que la plántula se convierte en fotosintéticamente competente. La formación normal de los cotiledones es comúnmente interrumpida en mutantes de *Arabidopsis* defectuosos en el transporte polar de auxinas (Madishetty y col., 2006).

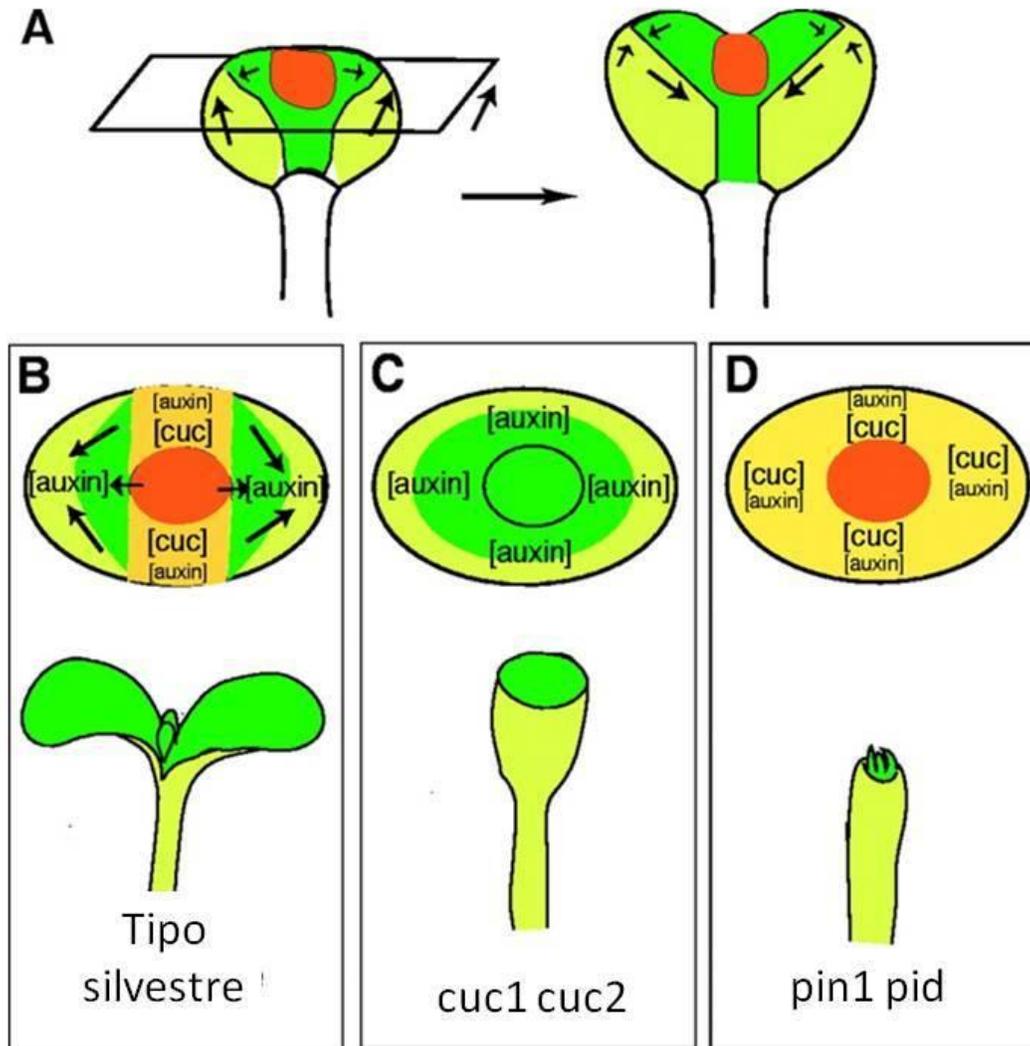
La distribución de las auxinas en los embriones se encuentra relacionada con el desarrollo de los cotiledones (Fig. 9). El término auxina se refiere a cualquier miembro de un grupo de moléculas pequeñas relacionadas químicamente y el cual incluye al ácido indolacético y al ácido indolbutírico (Jenik y Barton, 2005). Existen varios cientos de genes que son regulados a nivel transcripcional por las auxinas (Goda y col., 2004; Nemhauser y col., 2004 en Jenik y Barton, 2005). Entre la amplia variedad de productos génicos regulados por las auxinas, se encuentran aquellos relacionados con la elongación celular (Jenik y Barton, 2005). La auxina es transportada de su lugar de síntesis a su lugar de acción por un mecanismo transcelular (Jenik y Barton, 2005). Se cree que la auxina extracelular es transportada a través de la membrana y dentro de la célula por la proteína AUX1. Al igual, se cree que proteínas de la membrana de la familia PIN juegan un papel importante en la excreción de la auxina de la célula (Blilou, 2005; Jenik y Barton, 2005)



**Figura 9.** Transporte de auxinas relacionado con eventos tempranos en el patrón de desarrollo embrionario en *Arabidopsis*. **A)** Embrión temprano de *Arabidopsis*, el cual consiste en una célula apical (ac) y una célula basal (bc). Las flechas verdes indican la dirección del transporte de auxinas; el punteado indica las regiones con altos niveles de auxinas. **B)** Embrión en estado de ocho células. (El número de células empleado para establecer el estado del embrión refleja el número de células en el linaje apical celular). El dominio apical (da) y el dominio central (dc) ambos derivados de la célula apical y cada uno consiste en cuatro células. El dominio basal (db) se deriva de la célula basal. **C)** Un estadio de 16 células, embrión temprano globular. **D)** En un embrión en estadio globular de 32 células, el transporte de las auxinas ha cambiado de dirección (flechas verdes), y las auxinas ahora se acumulan en el linaje hipofiseal. El linaje hipofiseal se deriva de la hipófisis (h) —la célula del suspensor más cercana a la cabeza embrionaria. Este linaje origina a una porción del meristemo radicular, específicamente el centro quiescente y la columna central con células madres asociadas. **E)** Un embrión en estadio transicional (transicional entre el estadio globular y el estadio acorazonado). El transporte de la auxina en el dominio apical se dirige hacia el centro del primordio cotiledonar (cot). **F)** Un embrión en un estadio temprano en forma de corazón, mostrando la emergencia de los cotiledones y una hendidura en donde el meristemo apical de brote (MAB) se formará. El color gris indica las regiones del desarrollo vascular. Modificado de: Jenik y Barton (2005).

Existen mutantes en la especie eudicotiledónea *Arabidopsis thaliana* que presentan en sus embriones un crecimiento fusionado de sus dos cotiledones. Aida y col. (1997) observaron que el mutante del cotiledón en forma de copa (cup-shaped cotyledon mutant) en la especie *Arabidopsis thaliana* consistía de dos cotiledones que estaban fusionados y que las secciones transversales de estos mutantes demostraron que habían conservado las mismas cuatro capas de tejidos observadas en los cotiledones de tipo silvestre, sugiriendo que las mutaciones dobles *CUC1* y *CUC2* no afectan la diferenciación de los tejidos en los cotiledones, sin embargo, las plántulas de estos mutantes carecieron completamente de los meristemos apicales del brote. Los mutantes “simples” *CUC1* y *CUC2* presentaron plántulas normales pero algunas de estas fueron plántulas tipo corazón, cuyos cotiledones se encontraron fusionados en un lado (0.49 % para *CUC1* y 0.53 % para *CUC2*). La estructura en forma de copa se forma como una estructura fusionada a partir del estadio temprano del desarrollo del cotiledón y no por una fusión posterior de dos cotiledones (Aida y col., 1997).

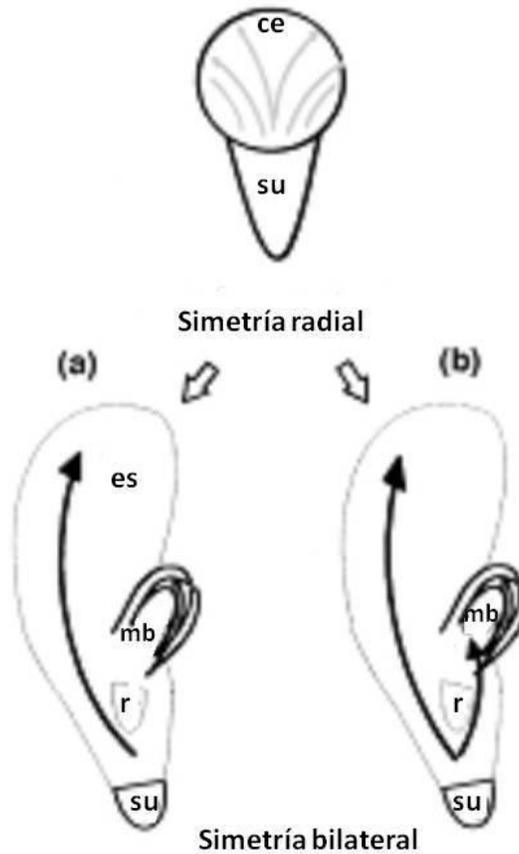
De acuerdo a lo investigado por Jenik y Barton (2005), la auxina juega un papel importante en el desarrollo de los cotiledones. Los dos cotiledones y el meristemo apical del brote se desarrollan a partir de la mitad apical del embrión globular (Fig. 10). Durante el estadio globular tardío, los primordios de los dos cotiledones crecen rápidamente a diferencia de la región de la hendidura entre los cotiledones la cual crece de manera lenta; esto ocasiona que se forme la figura en forma de corazón (Jenik y Barton, 2005). Los genes *CUC* parecen estar relacionados con la auxina. En las zonas del meristemo y las zonas intercotiledonares presentan bajos niveles de auxina y altos niveles de *CUC* a diferencia de las zonas cotiledonares en donde existen altos niveles de auxinas y bajos niveles de *CUC* (Fig. 8) (Jenik y Barton, 2005)



**Figura 10.** Partición del dominio apical en el meristemo apical de brote y los cotiledones. **A)** Embriones de *Arabidopsis* en estadio de transición y estadio acorazonado temprano mostrando la dirección del transporte de la auxina (flechas) y la partición del embrión en los dominios cotiledonarios (en verde) y los dominios del meristemo (en anaranjado). **B)** secciones transversales (como en A) a través del dominio apical del embrión tipo silvestre, mostrando la región que se desarrollará en el meristemo apical de brote (en anaranjado oscuro), las zonas intercotiledonarias (en anaranjado claro) el dominio adaxial (en la parte superior) del cotiledón (verde oscuro) y el dominio abaxial (parte inferior) de los cotiledones (verde claro). El meristemo y las zonas intercotiledonares tienen niveles bajos de auxinas y altos niveles de *CUC*, mientras que lo opuesto se encuentra en el primordio del cotiledón. **C)** Sección transversal del dominio apical de un mutante del cotiledón en forma de corazón *CUC1* y *CUC2*. No se origina separación alguna entre los cotiledones y no se origina el meristemo apical de brote en la región central del embrión. **D)** Sección transversal del dominio apical de un embrión *PIN1* *PID*. Estos embriones carecen del *PIN1* transportador de auxinas. También carecen de la *PID* quinasa la cual parece ser responsable de posicionar a *PIN1* en el lado apical de la célula. La ausencia de altos niveles de auxinas en el primordio del cotiledón en estos embriones permite la acumulación de *CUC* a través del dominio apical, previniendo así el crecimiento del cotiledón. Modificado de: Jenik y Barton (2005).

También, el papel de las auxinas ha sido estudiado en embriones de trigo (una especie monocotiledónea). En el estudio realizado por Fischer-Iglesias y col. (2001) en el cuál se monitoreó el patrón de movimiento y distribución de un análogo de la auxina, el [3H], 5-N3IAA, se encontró que existe un cambio en la distribución de este análogo dentro de los embriones vinculado con el cambio del estadio de crecimiento radial al del crecimiento bilateral en el embrión.

De acuerdo a sus estudios en embriones de trigo Fischer-Iglesias y col. (2001) concluyeron que la difusión y la posibilidad de un transporte activo mutidireccional de la auxina ocurre en los embriones radialmente simétricos a partir de la parte más interna y baja del embrión hacia el protodermo. En embriones bilateralmente simétricos, ocurre un cambio en el transporte de la auxina en dónde la auxina es transportada de las capas celulares internas hacia las capas celulares externas, apreciándose así, un transporte mediante exportación para la reducción de la concentración endógena de auxina o un transporte hacia regiones embrionarias específicas (hacia el escutelo, o hacia el meristemo del brote ya sea hacia un transporte activo polarizado de manera unidireccional o de manera bidireccional a partir de la parte más interna y baja del embrión hacia el escutelo. Además, estos autores mencionaron que no se detectaron señales de presencia de la auxina en las capas celulares externas del ápice del brote, lo cual sugiere dos posibilidades: que no ocurre un transporte hacia el meristemo del brote o que durante el cambio de simetría las células del ápice del brote han adquirido la habilidad para liberar o exportar la auxina. Por último, estos autores asumieron como un sitio supuesto de síntesis de auxina a la parte baja del embrión (Fig. 11).



**Figura 11.** Modelo de la distribución de la auxina y su transporte en embriones de trigo. **a)** Transporte unidireccional polar de la auxina hacia el escutelo. **b)** Transporte bidireccional polar de la auxina hacia el escutelo y el meristemo apical del brote. Flechas negras: vías del transporte polar de la auxina; flechas grises: difusión y posiblemente transporte activo de la auxina; ce: cabeza embrionaria; r: raíz embrionaria; es: escutelo; mb: meristemo del brote; su: suspensor. Modificado de: Fischer-Iglesias y col. (2001)

La especie *Agave tequilana* Weber var. Azul es una especie angiosperma monocotiledónea, la cual por definición debería presentar embriones con un solo cotiledón, y los cuales a su vez, deberían atravesar solamente por los estadios globular y estadio de simetría bilateral. Además, cada una de las semillas de esta especie debería presentar solamente un embrión. Sin embargo, tal y como fue presentado anteriormente pueden existir excepciones a estos supuestos. En este trabajo se exponen algunas excepciones para el caso de *Agave tequilana* Weber var. Azul.

## 6. MÉTODOLÓGÍA

Para la observación de las características morfológicas y la ocurrencia de los fenómenos de poliembrionía y la presencia de un cotiledón, dos cotiledones o cotiledones fusionados en embriones cigóticos de *A. tequilana*, se realizó la extracción de embriones de semillas inmaduras provenientes de diversas panículas que fueron colectadas a partir de individuos provenientes de plantaciones de seis localidades de los estados de Jalisco y Nayarit, México durante los años 2008 y 2009. Los frutos fueron colectados entre 30 y 40 días después de la polinización (aproximadamente) y fueron seleccionados de manera aleatoria, las semillas de cada fruto fueron extraídas al igual que los embriones dentro de cada semilla. Todos los frutos fueron enjuagados empleando agua corriente. Además, los frutos fueron desinfectados utilizando una solución 3 % de hipoclorito de sodio durante 10 min y enjuagados tres veces con agua destilada y/o sumergidos en alcohol para ser flameados.

Los embriones fueron extraídos de las semillas inmaduras y observados a través de un microscopio de disección. La posición del embrión dentro de la semilla fue registrada considerando las siguientes orientaciones (micropilar, calazal, lateral). De igual manera, la ocurrencia de poliembriones fue registrada. Además de estas observaciones, se registró el estadio del embrión y se analizó la morfología de los cotiledones clasificando al embrión como: monocotiledonar, fusionado y dicotiledonar.

Los embriones extraídos fueron cultivados para su posterior maduración y germinación en cajas desechables de Petri estériles (100 x 15 mm) las cuales contenían 25 mL de medio de cultivo para expresión MS modificado ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  reducido a 5 mM; Concha y col., 1990), suplementado con vitaminas L2, 500 mg  $\text{L}^{-1}$  L-glutamina (Sigma Chemical G-3202), 250 mg  $\text{L}^{-1}$  de hidrolizado de caseína (Sigma Chemical C-7290; Santacruz-Ruvalcaba y col., 1998) y sin reguladores de crecimiento. La evolución de los embriones cultivados fue observada

durante un período de 60 d a partir de la extracción de los mismos de la semilla. Los embriones cultivados fueron observados a través de un microscopio de disección.

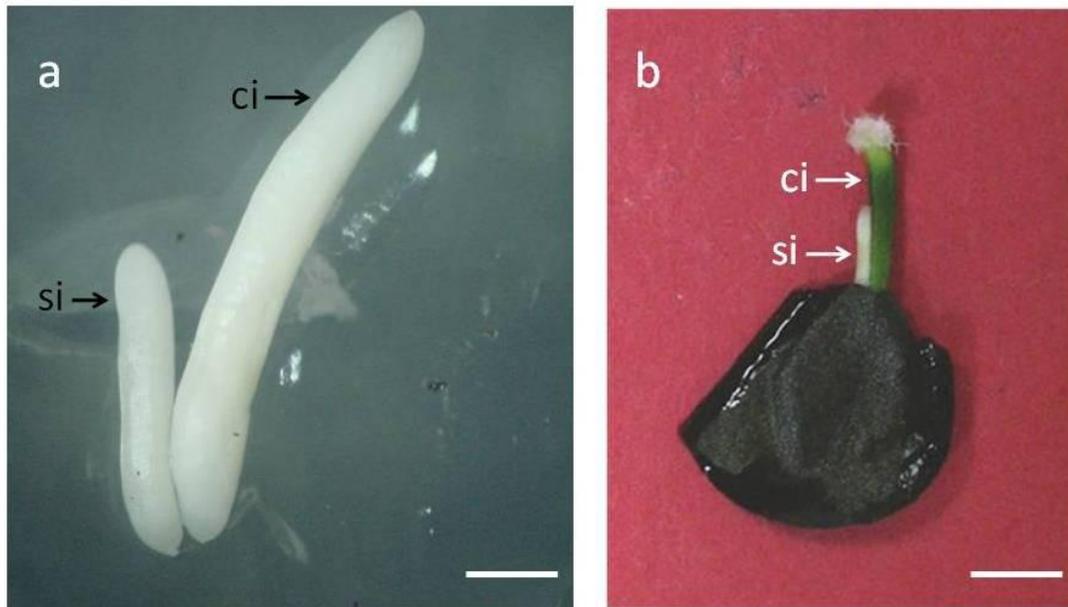
Se realizaron observaciones microscópicas de embriones encontrados en estadios tempranos de desarrollo bajo microscopios de luz con la finalidad de conocer el origen de los embriones gemelos. Algunos embriones fueron extraídos al igual que el endospermo que los rodeaba y fueron fijados en una solución de FAA (5 % formaldehído, 5 % ácido acético, 50 % etanol) por más de 48 h y fueron deshidratados paulatinamente (etanol 30 %, etanol 50 % y etanol 70 %) hasta encontrarse en una solución de etanol al 70 %. Los embriones fijados y deshidratados fueron enviados al Laboratorio de Desarrollo en Plantas del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de México para la elaboración de preparaciones histológicas y muestras para la observación en microscopía electrónica de barrido. Para la observación histológica, las muestras fueron montadas y se analizaron utilizando la técnica de tinción Hematoxilina-Safranina (López-Curto, 2005).

Algunos embriones fueron extraídos y clarificados en fresco empleando la solución Hoyer (7.5 g de goma arábica; 100 g hidrato de cloral; 5 mL glicerol; 30 mL agua destilada) (Liu y Meinke, 1998). Estos embriones fueron observados a través de microscopio óptico.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

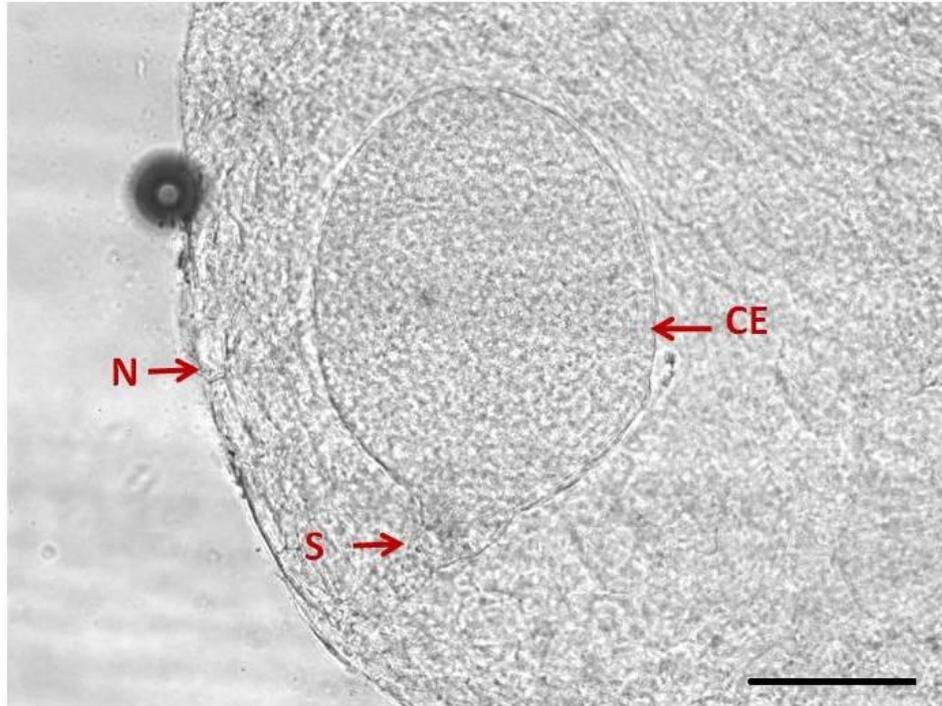
### 7.1 Poliembrionía

Un total de 1,164 semillas y sus embriones fueron observados. De estas semillas, el 2.2 % presentaron poliembrionía (gemelos). La mayoría de estos gemelos (a excepción de un caso de gemelos) se encontraron de manera adyacente (Fig. 12a) uno del otro, sugiriendo un origen por fisión monocigótica, o por apomixis mediante el desarrollo de un embrión a partir de una sinérgida. Esta última posibilidad se sugirió a partir de que en la mayoría de los casos un embrión era más pequeño que el otro, y debido a que en años anteriores se pudo observar la ocurrencia de un embrión albino creciendo de manera adyacente a un embrión con producción de clorofila (Fig. 12b). Una característica que a simple vista puede sugerir la presencia de poliembriones haploides es precisamente la diferencia de tamaños entre estos (Dunwell, 2010). Para el caso de los cereales, los embriones haploides originados a partir del cultivo de anteras o microsporas pueden presentar una alta incidencia de albinismo (Dunwell, 2010). Sin embargo, durante el desarrollo del presente trabajo de investigación se pudo comprobar el nivel de ploidía debido a que los embriones gemelares más pequeños no sobrevivieron a las condiciones de cultivo *in vitro*.



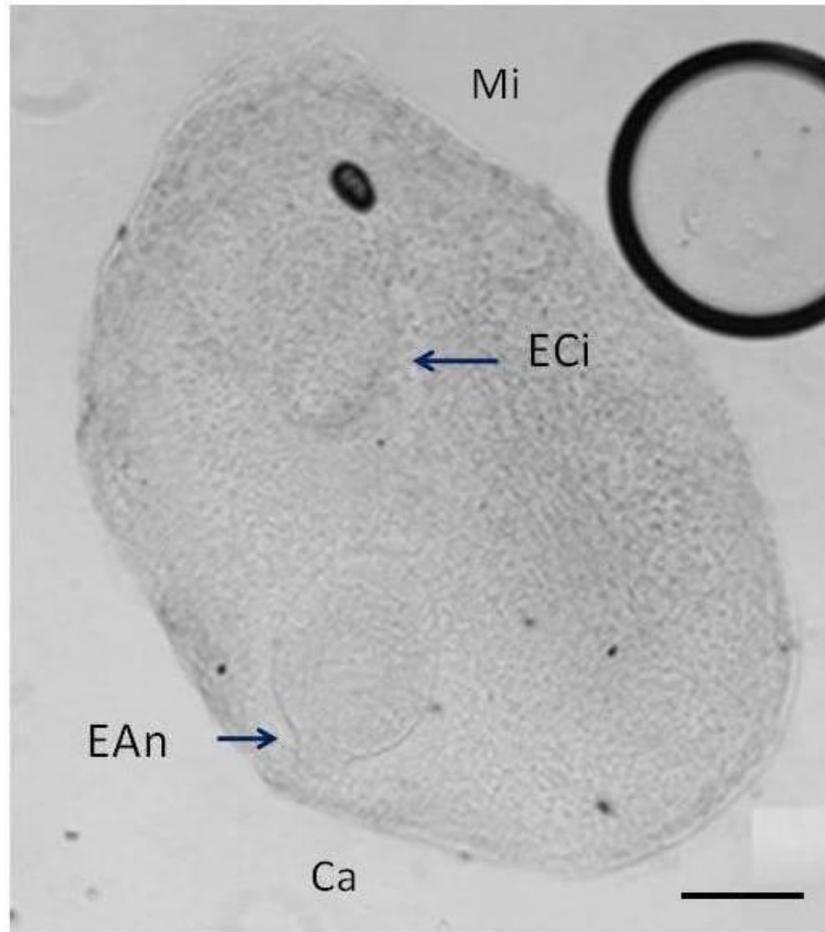
**Figura 12.** Poliembriones en semillas de *A. tequilana* var. Azul. **a)** Poliembriones gemelares extraídos de semillas de *A. tequilana* y cultivados *in vitro*; si= embrión posiblemente desarrollado a partir de una sinérgida, ci= embrión desarrollado a partir de cigoto. Barra = 2 mm. **b)** Poliembriones gemelares germinando en una semilla *A. tequilana*; si=embrión albino desarrollado muy probablemente a partir de sinérgida, ci= embrión fotosintético desarrollado a partir de cigoto. Barra= 4 mm.

Se analizaron un total de 1190 embriones de los cuales 1187 presentaron la ubicación esperada para los embriones cigóticos –una ubicación en la zona micropilar. La excepción fueron tres embriones uno que presentó una posición lateral (Fig. 13) y dos presentando una posición calazal. La posición calazal de los embriones sugiere un origen de embriones por apomixis a partir de antípodas y embrionía adventicia a partir de células nucelares.



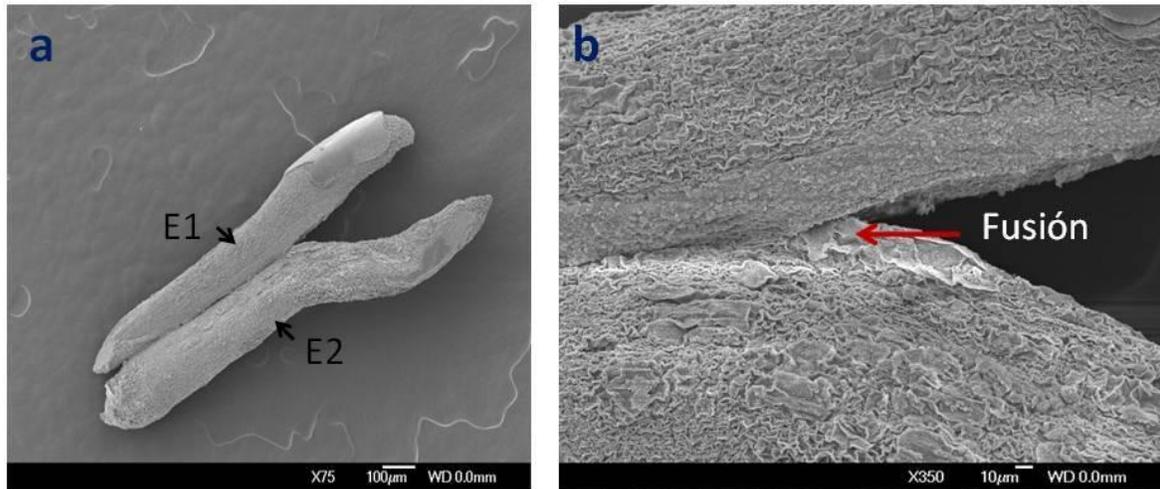
**Figura 13.** Embrión adventicio. N=zona nucelar, S= suspensor, CE= cabeza embrionaria. Barra = 100  $\mu$

Se observaron poliembriones en dónde uno se encontró en la orientación micropilar y otro en orientación calazal sugiriendo la formación de un embrión sexual y un embrión posiblemente a partir de antípodas (Fig. 14).



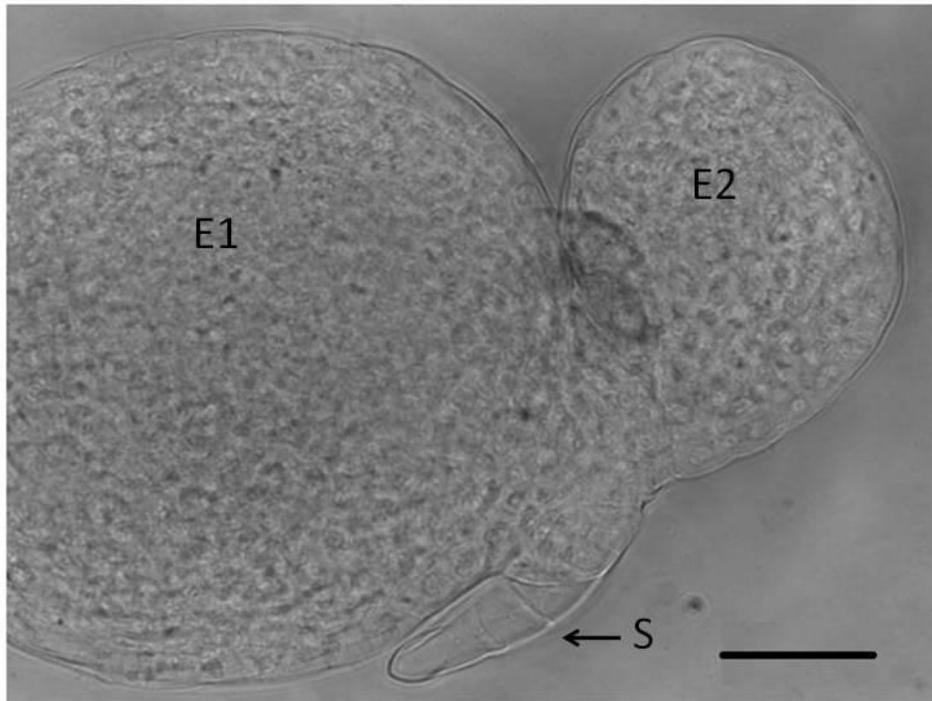
**Figura 14.** Poliembriones. EAn= Embrión posiblemente por desarrollo de antípodas; Eci=Embrión posiblemente por desarrollo de cigoto. Mi= Zona micropilar, Ca= Zona calazal. Barra = 200  $\mu$

A través de microscopía electrónica de barrido se pudo observar la presencia de gemelos presentando una fusión parcial por el hipocotilo. Esto último demuestra que en *A. tequilana* un mecanismo probable de formación de gemelos es a partir de la fisión monocigótica (Fig. 15).



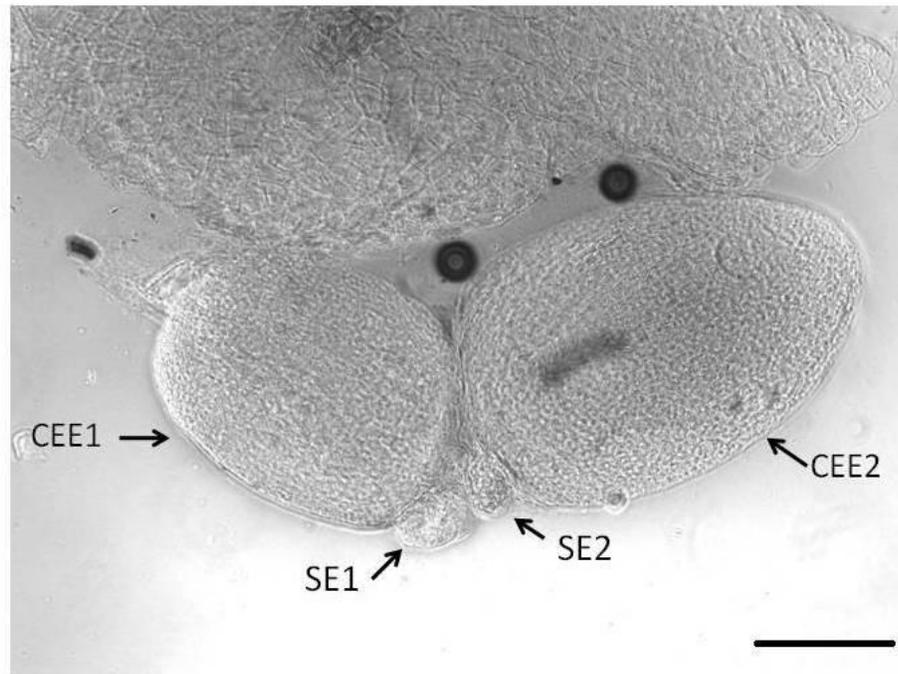
**Figura 15.** Poliembriones de *A. tequilana* por fisión monocigótica. **a)** Dos embriones (E1, E2) presentando fusión en el hipocotilo. Barra = 100 µ. **b)** Acercamiento de la fusión en el hipocotilo. Barra = 10 µ.

Se encontraron dos embriones globulares bien definidos adyacentes uno al otro presentando una unión basal y compartiendo un suspensor, mostrando un proceso de poliembrionía por fisión monocigótica (Fig. 16).



**Figura 16.** Poliembriones (E1, E2) de *A. tequilana* por fisión monocigótica compartiendo un mismo suspensor (S) Barra = 50  $\mu$ .

En otro caso, se encontraron a embriones gemelos en estadio globular presentando cada uno su propio suspensor, la posición de los embriones sugiere un posible proceso de formación de poliembriones a través de gemación del suspensor, una fisión monocigótica temprana o desarrollo de otro embrión a partir de sinérgida (Fig. 17). En el año 2012 Ruvalcaba-Ruíz y col. reportaron la presencia de embriogénesis secundaria a partir de la región radicular de un embrión primario en la embriogénesis somática de *A. tequilana*.

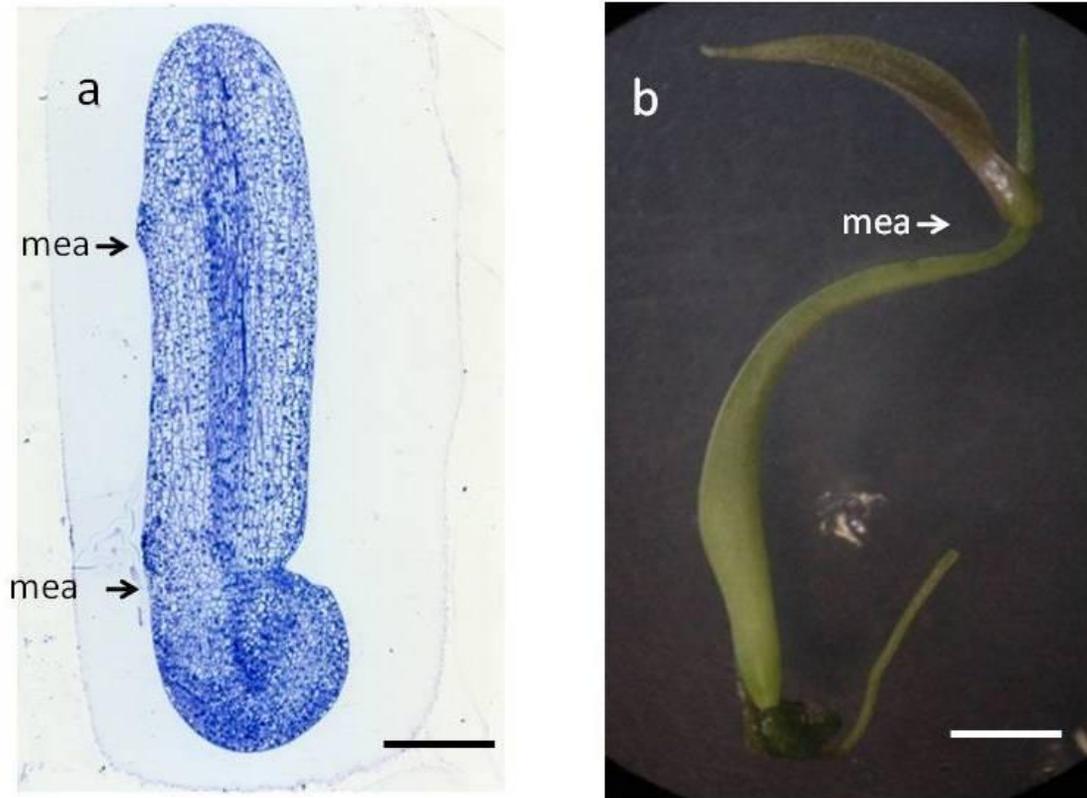


**Figura 17.** Poliembriones. En la imagen se puede distinguir a dos cabezas embrionarias (CEE1, CEE2) cada una con un propio suspensor (SE1, SE2). Barra = 200  $\mu$ .

Durante este estudio, no se pudo observar duplicación de sacos embrionarios debido a la etapa de desarrollo en la que se encontraron los embriones.

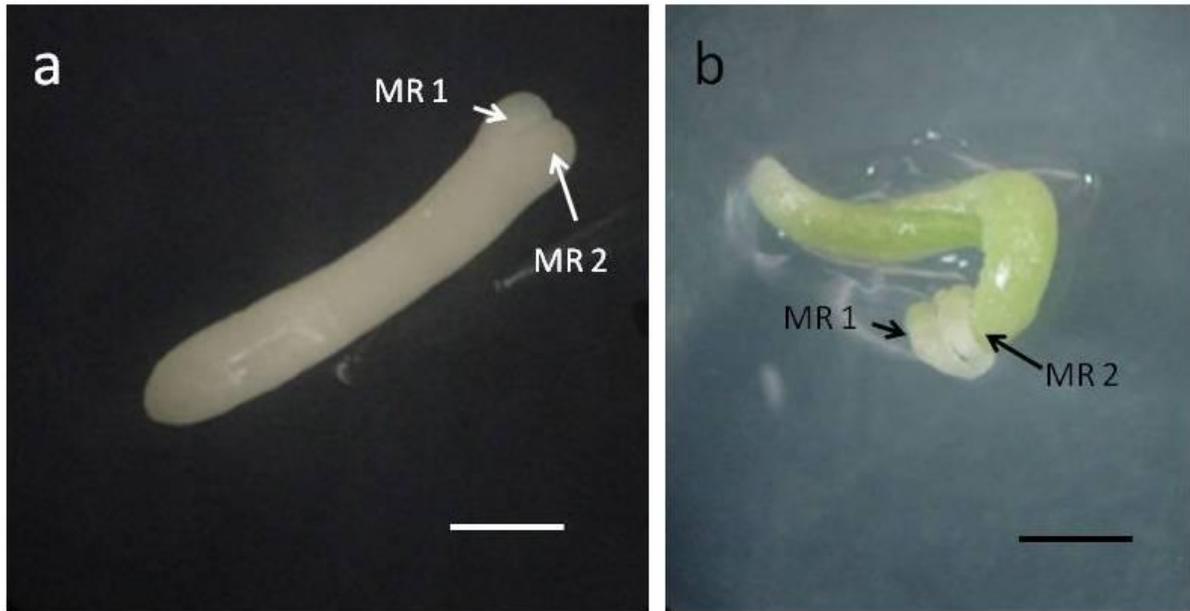
Las evidencias presentadas en el presente estudio sugieren que los procesos de poliembrionía a partir del suspensor, fisión monocigótica, desarrollo de embriones a partir de antípodas y sinérgidas y a partir de la nucela podrían ser los responsables de la poliembrionía en la especie *A. tequilana* Weber var. Azul.

También, se pudo observar la presencia de meristemos adventicios en los embriones y plántulas *A. tequilana* (Fig. 18).



**Figura 18.** Embrión y plántula con meristemos adventicios. a) corte histológico mostrando dos meristemos adventicios (mea) en la parte dorsal del embrión. Barra= 0.5 mm b) Plántula de *A. tequilana* presentando un meristemo adventicio en la zona superior de una hoja y del cual emerge otra hoja. Barra= 5 mm.

Además de estas observaciones se pudieron observar variaciones en algunos embriones. El 0.3 % de los embriones observados presentaron dos meristemos radiculares (Fig. 19). Algunos embriones presentaron deformaciones en la estructura cotiledonar 0.6 %.



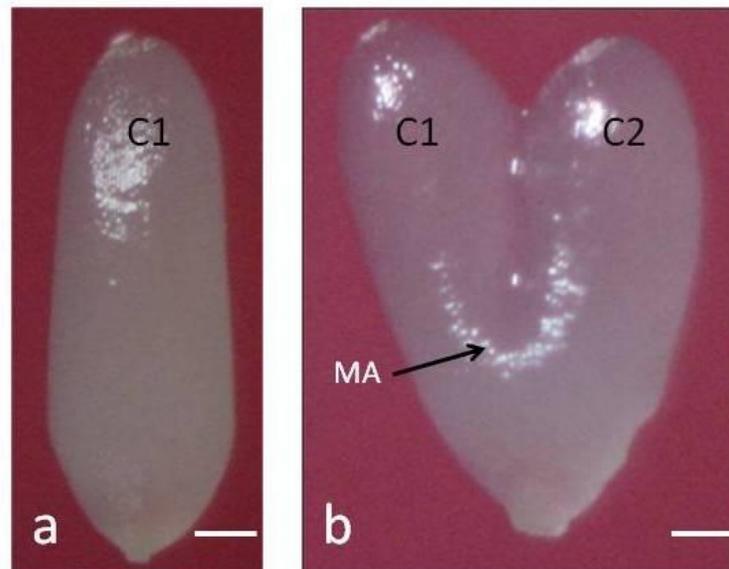
**Figura 19.** Embriones con dos meristemos radiculares. A) Embrión con dos meristemos radiculares (MR1, MR2), b) Embrión con dos sistemas radiculares (MR1, MR2), Barra = 3 mm.

## 7.2 Embriones dicotiledonares, fusionados y monocotiledonares

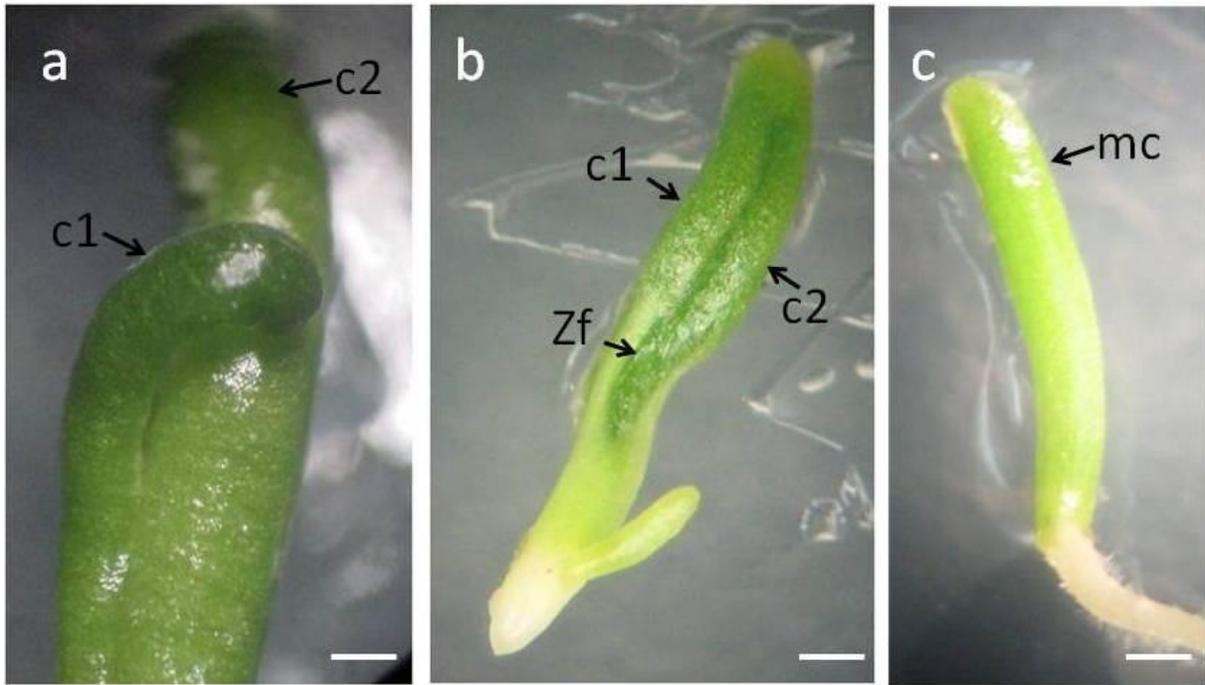
Un descubrimiento importante y el cual no fue encontrado como reportado, para ninguna especie de monocotiledónea, en la bibliografía disponible hasta la fecha de elaboración de este proyecto, fue encontrar embriones presentando el estadio en forma de corazón (Fig. 20). Cabe hacer mención que este estadio se supone exclusivo de las “dicotiledóneas” y que por definición no debería presentarse en una monocotiledónea como *Agave tequilana* Weber var. Azul. Si bien se han reportado casos extraordinarios en donde monocotiledóneas presentan dos cotiledones, el estadio en forma de corazón como tal no fue encontrado en la bibliografía disponible al momento de la realización del presente trabajo de investigación, siendo así el primer registro del estadio en forma de corazón para *A. tequilana* y para otras monocotiledóneas.

No solamente se encontró a embriones en forma de corazón, sino a embriones en estados más avanzados de desarrollo que presentaban dos cotiledones. Además de este hallazgo se pudo observar, la presencia de embriones que presentaban dos cotiledones fusionados, al igual que embriones que presentaron un solo cotiledón. Los porcentajes de embriones dicotiledonares y fusionados es alta en esta especie.

Del total de embriones analizados, el 4 % presentó dos cotiledones (o embriones dicotiledonares) (Figs. 20b, 21a), el 44 % de embriones presentaron lo que fue considerado como dos cotiledones fusionados (Fig. 20b), el 51 % presentó un solo cotiledón (Figs. 20a, 21c) y un 0.3 % presentó malformaciones.

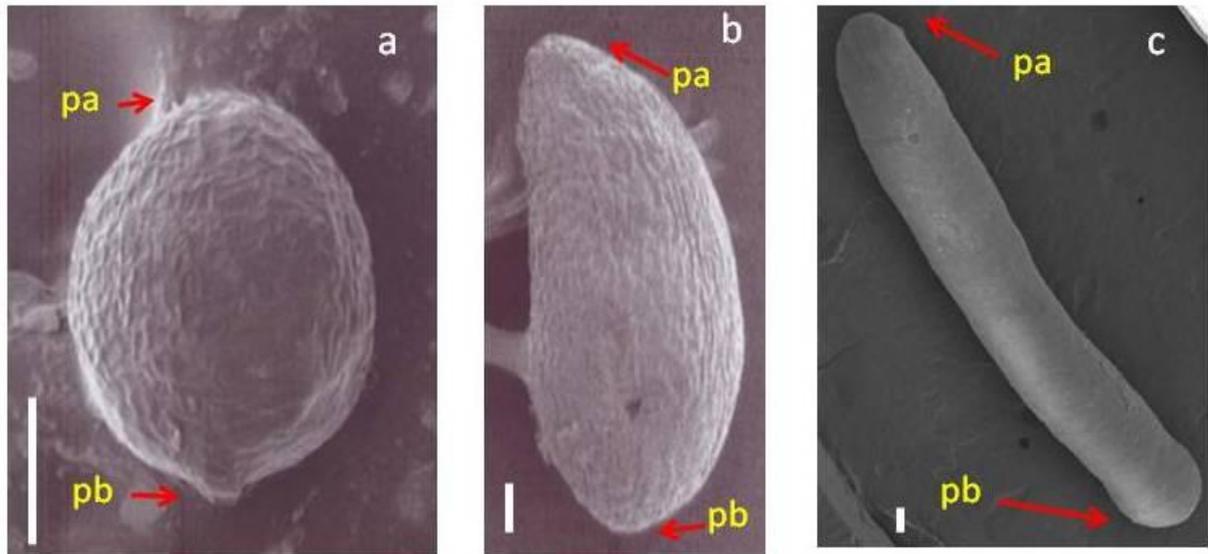


**Figura 20.** Embriones monocotiledonares y dicotiledonares en *A. tequilana*. **a)** Embrión monocotiledonar (un solo cotiledón: C1) en el estadio torpedo. Barra = 0.5 mm. **b)** Embrión dicotiledonar (dos cotiledones: C1, C2) en estadio en forma de corazón. Barra = 0.5 mm



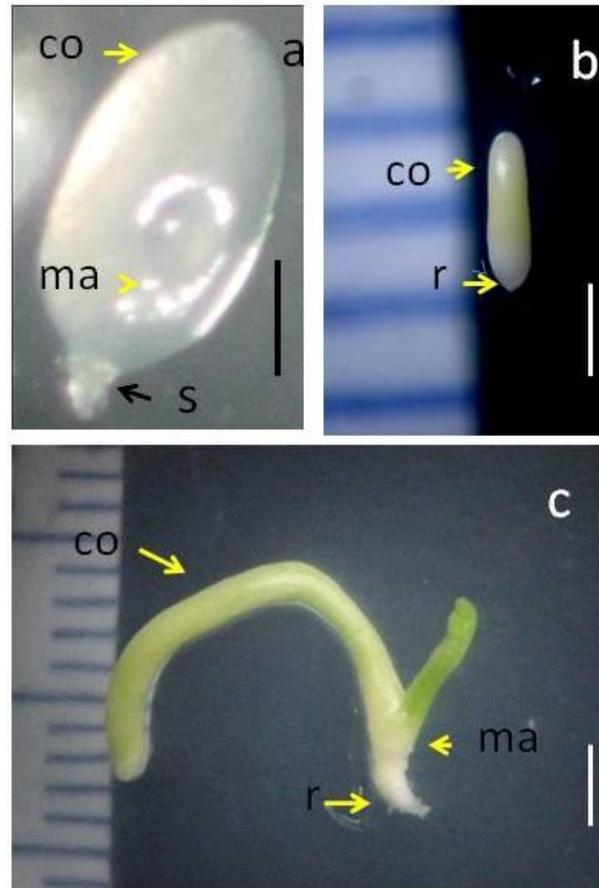
**Figura 21.** Embriones monocotiledonares, fusionados y dicotiledonares en *A. tequilana*. **a)** Embrión dicotiledonar (dos cotiledones: C1, C2) **b)** Embrión fusionado (dos cotiledones: C1, C2; zona de fusión Zf). **c)** Embrión monocotiledonar (monocotiledón: mc). Barra = 0.5 mm.

Mediante la observación de los embriones monocotiledonares considerados como normales para esta especie, se sugiere que los estadios de desarrollo embrionario en *A. tequilana* podrían ser considerados como intermedios a los estadios embrionarios de la especie “dicotiledónea” *Arabidopsis thaliana* y la especie monocotiledónea *Zea mays*. Es por esto que en este trabajo se asignan los siguientes estadios embrionarios para la especie *A. tequilana*: estadio globular, estadio simetría bilateral y estadio torpeda (Fig. 22)

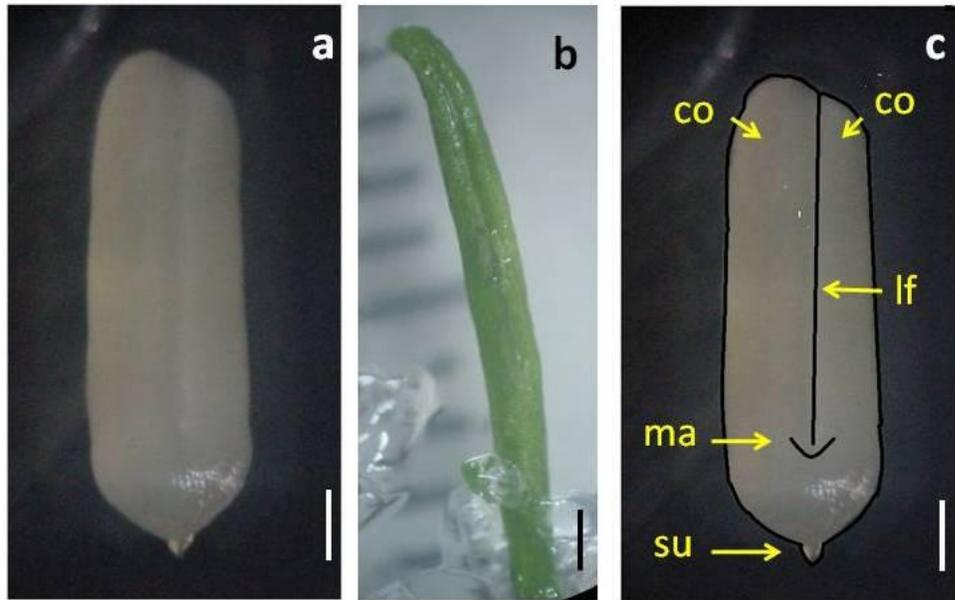


**Figura 22.** Estadios en embriones monocotiledonares de *A. tequilana*. pa= polo apical, pb= polo basal. a) Estadio globular. Barra 100  $\mu$ m. b) Estadio simetría bilateral. Barra 100  $\mu$ m. c) Estadio torpedo. 100  $\mu$ m.

En *A. tequilana* el meristemo apical se localiza en la zona ventral mientras que el cotiledón se desarrolla de manera dorsal y en ambos lados del meristemo apical (Fig. 23). La presencia de dos cotiledones y cotiledones fusionados en esta especie sugieren que el único cotiledón de esta especie pudo haber evolucionado a partir de dos cotiledones (Figs. 24 y 25).



**Figura 23.** Embriones monocotiledonares de la especie *A. tequilana*. a) Embrión estadio simetría bilateral, en el que se observa la zona del meristemo apical del brote (ma); el suspensor (s), y el único cotiledón (co) el cual se desarrolla de manera lateral y dorsal a la zona del meristemo apical del brote; Barra = 0.5 mm. b) Embrión en estadio simetría bilateral, en él se observa el cotiledón y la zona radicular; Barra= 1mm. c) Embrión en estadio torpedo, se puede observar la radícula (r) y el brote; Barra= 3 mm.

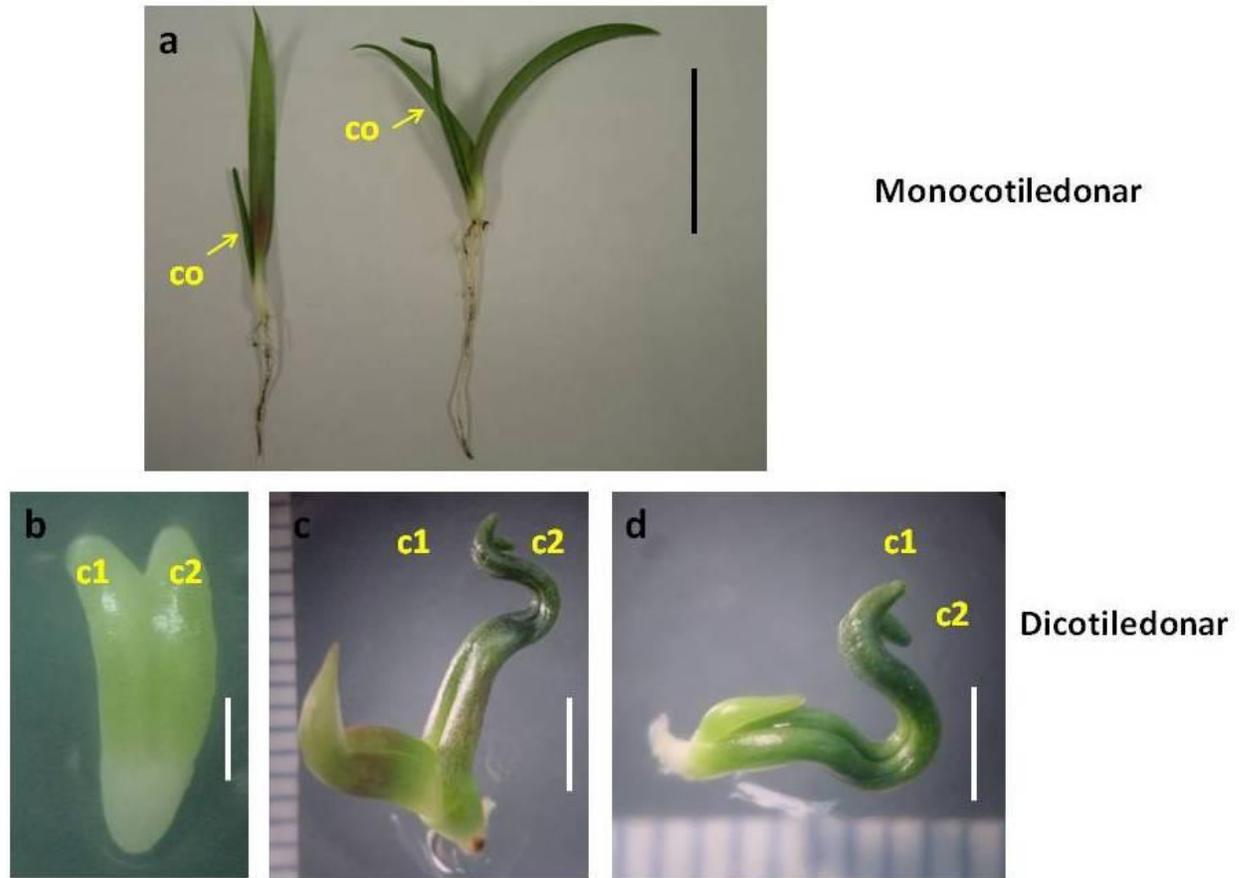


**Figura 24.** Embriones de *A. tequilana* presentando dos cotiledones (co) fusionados. a) Embrión en estadio torpedo, Barra 0.5 mm. b) Embrión con desarrollo de clorofila en estadio torpedo, Barra = 1 mm. c) Embrión presentando de forma resaltada los dos cotiledones y la línea de fusión (lf); se puede observar la zona del meristemo apical del brote (ma) y el suspensor), Barra = 0.5 mm.

Al observar los embriones de *A. tequilana* y compararlos con las imágenes de embriones de otras monocotiledóneas, se considera que esta especie presenta un patrón de desarrollo embrionario intermedio entre las “dicotiledóneas” y monocotiledóneas (Figs. 22 y 23).

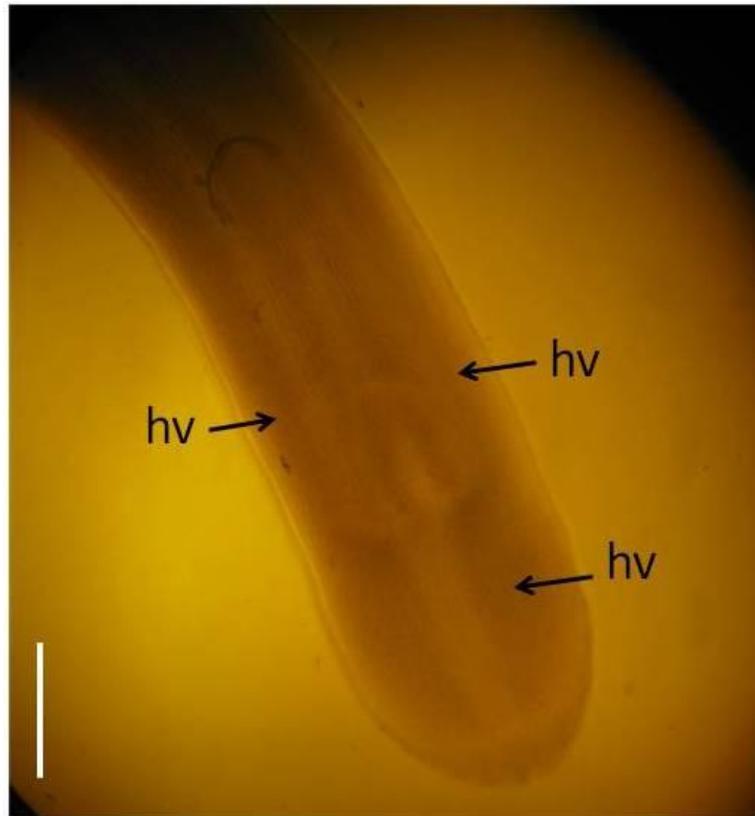
De acuerdo a lo establecido con relación a la sincotilia, se considera en este trabajo que el desarrollo del cotiledón en la especie *A. tequilana* se desarrolla a partir de un aparente crecimiento fusionado de dos regiones cotiledonares.

Se descarta la posibilidad de que en los casos de embriones en estadio en forma de corazón se trate de un proceso de fisión monocigótica ya que en ninguno de los casos se pudo observar a embriones con dos meristemas. Por lo tanto se descarta la posibilidad de que se traten de gemelos fusionados.



**Figura 25.** Embriones en *Agave tequilana* Weber var. Azul. a) Embriones monocotiledonares germinados; co= monocotiledón; Barra= 5 cm. b) Embrión de *A. tequilana* presentando dos cotiledones (c1, c2) y mostrando claramente la similitud con el estadio torpedo temprano de la “dicotiledónea” *Arabidopsis thaliana*; Barra= 1 mm; c y d) Embriones dicotiledonares de *A. tequilana* mostrando un estadio similar al estadio de torpedo tardío de la especie *Arabidopsis thaliana*, Barra= 4 mm.

En embriones dicotiledonares (con dos cotiledones) y en embriones con un solo cotiledón se pudo observar la presencia de un haz vascular que se bifurca sugiriendo que el solo cotiledón presente en *A. tequilana* se forma a partir del proceso de sincotilia (Fig. 26).



**Figura 26.** Embrión monocotiledonar de *A. tequilana* clarificado con solución Hoyer. En esta figura se muestra cómo un solo haz vascular (hv) en la zona basal se bifurca a partir de la zona del meristemo apical. Esta división de un solo haz vascular en dos sugiere que la formación del único cotiledón en *A. tequilana* se forma a partir del proceso de sincotilia. Barra= 100  $\mu$ m.

*Agave tequilana* es la especie empleada en la elaboración del tequila. Las prácticas de cultivo del tequila se han enfocado principalmente en la reproducción vegetativa de los genotipos que presentan las características deseadas para la industria tequilera. Los individuos de este estudio provinieron de campos de cultivo de esta industria.

Al considerar las características de la reproducción sexual en *A. tequilana* se puede decir que este tipo de reproducción para esta especie puede presentar algunas desventajas. Escobar-Guzmán y col. (2008) demostraron que la autopolinización no es un método eficiente en *A. tequilana*. Además, estos mismos autores encontraron una relación inversa entre el número de semillas producidas y el número de semillas con la capacidad para germinar. Aún más, el porcentaje de granos de polen no viables en esta especie es alto (42 %) y esto posiblemente sea causado por un comportamiento meiótico aberrante (Ruvalcaba-Ruiz y Rodríguez-Garay, 2002).

*A. tequilana* pertenece al subgénero *Agave*, y éste subgénero ha producido de manera general, características reproductivas que le confieren mayores dificultades en su reproducción sexual. Las especies del subgénero *Agave* han evolucionado hacia el monocarpismo y asignan una gran cantidad de recursos a sus estructuras florales, las características de estas estructuras se asocian a la polinización por murciélagos (Rocha y col. 2006). Se ha especulado que la polinización por murciélagos ha sido la mayor fuerza en la evolución de este género (Rocha y col., 2006). Sin embargo, la polinización por murciélagos no es un sistema confiable (Fleming, 2001). A pesar de todas estas dificultades aparentes en la reproducción sexual, algunos agaves parecen sobrellevar la incertidumbre de la disponibilidad de polinizadores mediante el cambio de una reproducción sexual a una reproducción asexual. Arizaga y col. (2000) encontraron que cuando la especie *A. macroacantha* se somete a tratamientos de exclusión de polinización se producen menos frutos, y que en estos casos se dispara la producción de bulbilos. Molina-Freaner y Eguiarte (2003) sugirieron que en la especie *A. angustifolia* la propagación vegetativa podría ser más importante que la reproducción sexual en poblaciones localizadas cerca de los límites de el rango de forrajeo de los murciélagos nectarívoros.

Una baja producción de frutos también está relacionada con limitación de recursos nutrimentales por parte de la plantas maternas (Udovic y Aker, 1981; Flemming 2001) o debido a limitantes en la polinización (Flemming, 2001). Diferentes estudios, han reportado producciones bajas de frutos en especies de la familia Agavaceae (Udovic y Aker, 1981, Rocha y col., 2005; Rocha y col., 2006, Escobar-Guzmán, 2008) *A. tequilana* es una de las

especies reportada como baja productora de frutos (Escobar-Guzmán, 2008). Parece ser que una baja producción en los frutos es una característica común en la familia Agavaceae. Las consecuencias ecológicas y evolutivas en una producción baja de frutos quizá no sean muy claras, sin embargo, algunos estudios han demostrado que cuando los principales polinizadores son una limitante mecanismos reproductivos alternativos pueden evolucionar (*e.g.* un cambio de una polinización especialista hacia una generalista) (Fleming, 2001), y el cambio de una reproducción sexual hacia una reproducción vegetativa (Molina-Freaner y Eguiarte, 2003). En *Agave macroacantha*, la producción de bulbilos es considerada como un seguro contra las fallas en la reproducción sexual (Arizaga y Ezcurra, 1995) y los mismo ocurre en *A. tequilana*.

Lo anterior, se podría relacionar con la poliembrionía ya que este último proceso ha sido hipotetizado como un mecanismo que contrarresta los efectos en una baja producción de embriones, y ha sido considerado como una adaptación probable a las condiciones limitantes en el éxito en la polinización o a ambientes con una gran variabilidad en condiciones climáticas y depredación (Ditomaso y col., 2005).

Existe la posibilidad de que la producción de poliembriones en *A. tequilana* sea una estrategia evolutiva para contrarrestar los efectos ocasionados por una baja producción de semillas. Sin embargo, no existen datos que demuestren el éxito en la supervivencia de los poliembriones. Sin embargo, las actuales prácticas de manejo y cultivo de esta especie no permiten determinar si la producción de poliembriones es una estrategia reproductiva.

Al considerar las características sexuales presentes en *A. tequilana*, y vincular estas características con la presencia de poliembriones surgen algunas preguntas. ¿Podría ser la poliembrionía encontrada en *A. tequilana* un mecanismo para contrarrestar las pérdidas de embriones debido a las fallas en la fecundación o a otras amenazas ambientales?, ¿podría ser un mecanismo que trate de evitar el desperdicio de recursos cuando la polinización ha fallado? Para poder contestar estas preguntas es necesario realizar estudios con especies filogenéticamente cercanas a *A. tequilana* para determinar si en el género *Agave*, la

poliembrionía podría ser una estrategia reproductiva que permita contrarrestar los efectos negativos por una baja producción de semillas.

Desde el punto de vista hormonal, la poliembrionía en *A. tequilana* podría estar influenciada por el transporte de las auxinas. Las auxinas han sido vinculadas con varios procesos en el desarrollo vegetal como: el desarrollo del ovario (Zhang y O'Neill, 1993), la dehiscencia de las anteras y la maduración de los frutos (Sunberg y Østergaard, 2009), la simetría bilateral en los embriones de las monocotiledóneas (Fischer-Iglesias y col., 2001) y dicotiledóneas (Liu y col., 1993), el desarrollo del eje basal apical en los embriones (Jenik y Barton, 2005), el desarrollo de las hojas y las flores (Cheng y col., 2007), y la formación del patrón vascular (Scarpella y col., 2006). Las auxinas no solamente regulan el crecimiento sino que parece que dictan el futuro de la célula (Jenik y Barton, 2005). Existe un patrón dinámico y cambiante en la acumulación de las auxinas durante el desarrollo embrionario, las auxinas pueden ser transportadas de su sitio de síntesis a su sitio de acción (Jenik y Barton, 2005), y su distribución polarizada y el transporte de auxinas es conocido como el transporte polar de auxinas. Fischer y col. (1997) encontraron que poliembriones siameses se desarrollaron de embriones normales cultivados *in vitro* cuando fueron tratados con inhibidores del transporte polar de las auxinas. En otros estudios, se observó la presencia de embriogénesis por un desarrollo espontáneo de embriones a partir del suspensor y fisión del embrión cigótico en maíz cuando las cariopses habían sido tratadas con ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2,4-D) en el segundo día después de la polinización (Erdelská y Vidovencová, 1992).

Estos descubrimientos previos sugieren que la concentración de la auxina y la distribución de esta molécula podría ser la principal responsable en la formación de poliembriones. Una posible anomalía en la concentración de las auxinas durante los primeros estadios de desarrollo embrionario y la modificación en el mecanismo del transporte polar de auxinas podría ser la responsable del fenómeno de poliembrionía en *A. tequilana*.

En los experimentos realizados por Jedrzejczyk y Nowaczyk (2009) se investigó el efecto de reguladores de crecimiento en la inducción de semillas poliembriónicas mediante el

tratamiento de los botones de las flores con auxinas y citocininas. Lo que parece interesante acerca de sus hallazgos es que los reguladores de crecimiento aumentaron la frecuencia de gemelos en semillas y que redujeron la cantidad de semillas por fruto. En flores de orquídeas, la diferenciación y el desarrollo del óvulo dependen de la polinización, y se ha especulado que la auxina puede ser un elemento en la señalización química entre el desarrollo del óvulo y el gametofito masculino (Zhang y O'Neill, 1993). Además, Sundberg y Østergaard (2009) citaron información que relaciona la distribución asimétrica de la auxina con la distribución precisa de los ocho núcleos encontrados dentro del gametofito femenino. Es por esto último que se concluye que la distribución de la hormona auxina puede estar jugando un papel importante en la reproducción de *A. tequilana*.

Erdelská y Vidovencová (1992) encontraron reportes de poliembrionía en maíz, mencionando que la frecuencia de embriones múltiples dependía del genotipo y no excedía normalmente al 0.1 %, pero que la frecuencia podría llegar hasta los 25.3 % o inclusive el 75% en genotipos apomícticos de maíz.

A pesar de lo afirmado por Leyser y Day (2002) acerca de que las monocotiledóneas no presentan el estadio en forma de corazón, según lo encontrado a través del presente trabajo de investigación, la especie monocotiledónea *A. tequilana* Weber var. Azul no siempre cumple con lo afirmado por Leyser y Day (2002). Tal y como fue mencionado anteriormente en esta especie se encontraron embriones presentando el estadio en forma de corazón característico de lo que antiguamente se conocían como dicotiledóneas.

La presencia de embriones dicotiledonares, con fusión de cotiledones, y monocotiledonares, en *A. tequilana* permite que resurja una vieja pregunta ¿el único cotiledón encontrado en las monocotiledóneas se origina de la fusión de dos cotiledones? La habilidad de las plantas monocotiledóneas de formar dicotiledóneas origina la pregunta de un gran significado teórico en conexión con el problema del origen monocotiledonar (Titova, 2003)

La mayoría de las plantas con semillas presentan dos cotiledones, siendo este un carácter ancestral a la monocotiledonía; sugiriendo que el estado monocotiledonar es derivado (una

apomorfía) (Chandler, 2008). Existen distintas teorías alternativas: el solo cotiledón de las monocotiledóneas pudo haberse derivado de la fusión de dos cotiledones, o la dicotilia puede haber sido una duplicación evolutiva de un órgano o un evento de fisión del estado monocotiledonar (Chandler, 2008). Alternativamente el estado monocotiledonar pudo haberse originado de la pérdida o supresión de los dos cotiledones y una subsecuente innovación apomórfica, o una subespecificación funcional, en donde un cotiledón retardó su desarrollo para formar la primera hoja de la plúmula y el otro mantuvo su posición y función como cotiledón (Chandler, 2008).

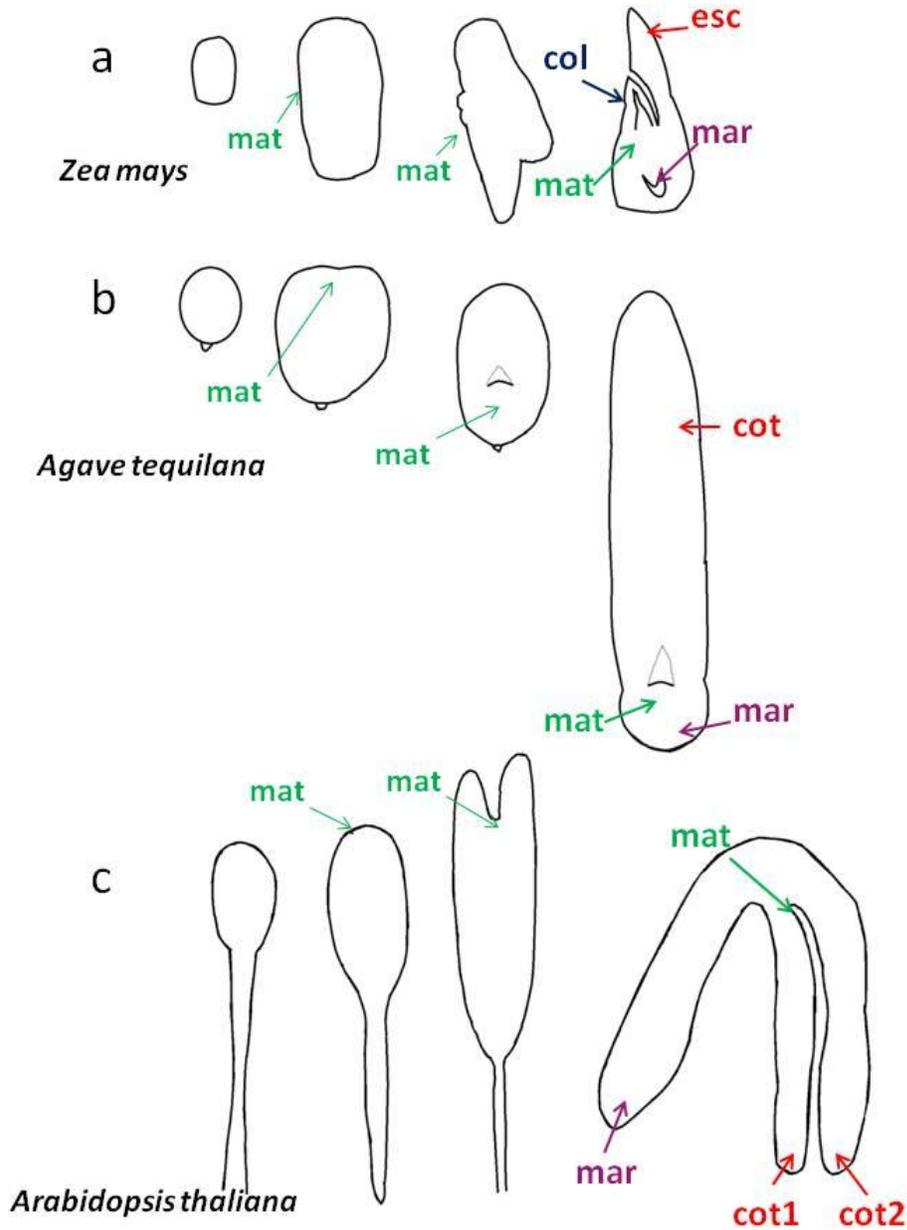
Agardh (1829-1832) estableció que para él los embriones dicotiledonares eran lo que él consideró como típicos, y agrupó en distintas clasificaciones a las plantas de acuerdo a lo que él consideró como dicotiledonares reales, un grupo especial otorgado para las gramíneas y las sincotiledonares en dónde clasificaba a los grupos pertenecientes a las familias Liliae, para él este último grupo se había derivado de la fusión de dos cotiledones originales y para Agardh el único grupo real de monocotiledóneas era el formado por las gramíneas (Bancroft, 1914).

En este trabajo se reconsidera la propuesta original de Agardh (1829-1832) (Bancroft 1914), la propuesta de Bancroft (1914) y Titova (2003) que plantean la formación del único cotiledón de ciertas monocotiledóneas se ha formado evolutivamente a partir de la sincotília o fusión de dos cotiledones.

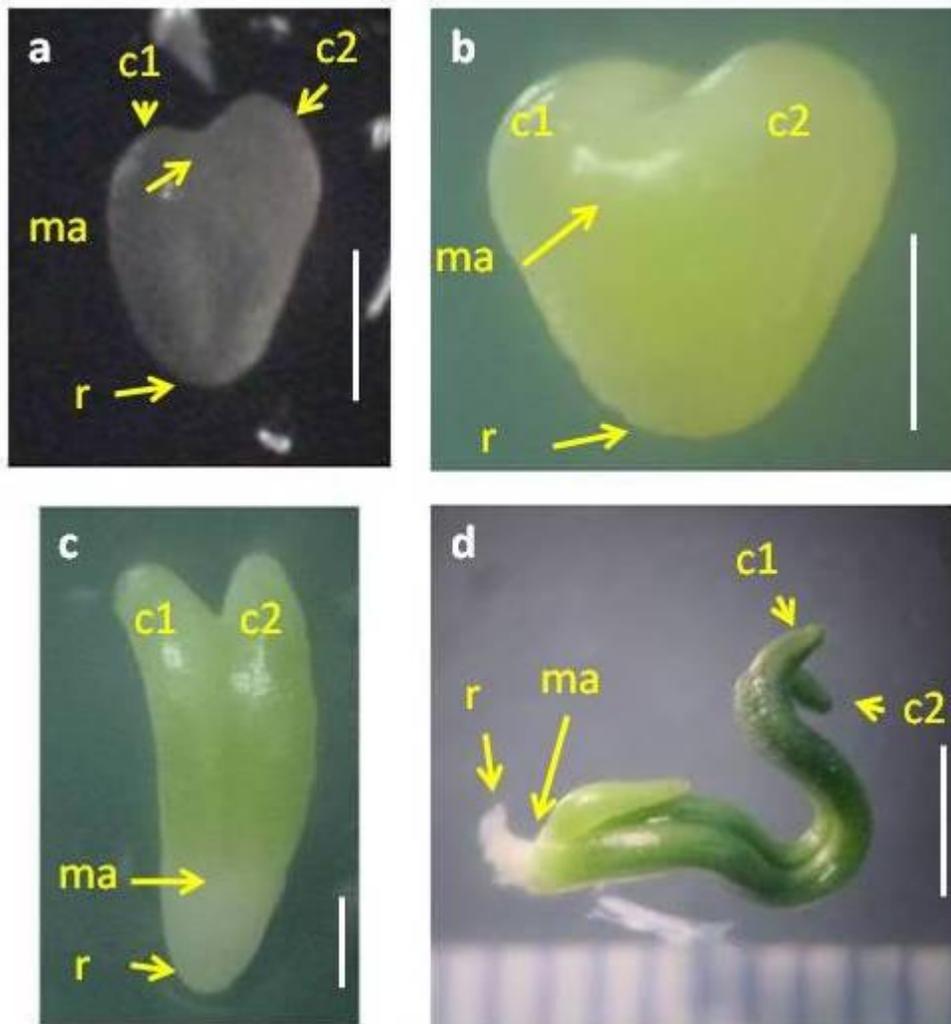
De acuerdo a lo observado en la especie *A. tequilana*, se podría especular que el único cotiledón presente en esta especie se desarrolló a partir de un mecanismo ancestral dicotiledonar. Es decir, que el único cotiledón de esta especie se originó a partir de dos cotiledones. Los resultados presentados aquí corresponden con la hipótesis de la sincotilia como mecanismo de formación del único cotiledón presente en *A. tequilana*. Las observaciones de este trabajo indican que este órgano debió de haber evolucionado de un estado dicotiledonar concordando con lo establecido por Agardh (1829-1832), Bancroft (1914), Sargent (1914), Haines y Lye (1979), Liu y col. (1999) y Titova (2003).

Al observar los estadios embrionarios presentados por la especie eudicotiledónea *Arabidopsis*

*thaliana* y la especie monocotiledónea *Zea mays* y compararlos con los estadios de *Agave tequilana*, se puede considerar que *A. tequilana* presenta estadios que se pudieran considerar como intermedios a *A. thaliana* y *Z. mays*. Por lo tanto, se especula que el patrón de desarrollo embrionario en *A. tequilana* se asemeja al patrón de desarrollo embrionario de *A. thaliana*; presentando ciertas variaciones que permiten algunas semejanzas con el patrón de desarrollo de *Z. mays* (Fig. 25). Las semejanzas entre los estadios embrionarios de *A. tequilana* con los estadios embrionarios de *A. thaliana* se hacen aún más evidentes en los embriones de *A. tequilana* que presentan dos cotiledones o cotiledones fusionados (Fig. 28).

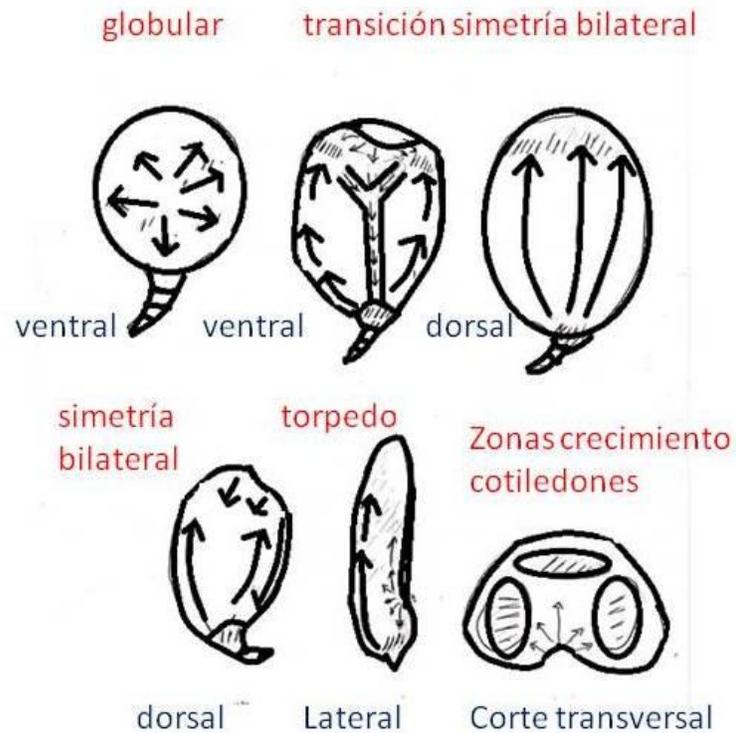


**Figura 27.** Ilustraciones comparativas de los estadios embrionarios entre las especies de **a)** *Zea mays*, **b)** *Agave tequilana*, y **c)** *Arabidopsis thaliana*. En la ilustración se puede observar cómo los embriones de *A. tequilana* presentan una simetría que se asemeja más a la presentada por los embriones de *A. thaliana*. Se puede observar la región en dónde se desarrolla el meristemo apical del tallo (mat), el meristemo apical de la radícula (mar), y los cotiledones (cot). Los embriones de *Zea mays* presentan estructuras exclusivas a las gramíneas conocidas como escutelo (esc) y el coleoptilo (col).



**Figura 28.** Embriones dicotiledonares de la especie monocotiledónea *A. tequilana* en distintas fases de desarrollo, aquí se puede apreciar la similitud de los estadios embrionarios con los estadios típicos de las “dicotiledóneas”. **a)** y **b)** estadios en forma de corazón; Barra= 0.5 mm. **c)** estadio en forma de torpedo temprano; Barra 0.5 mm. **d)** estadio en forma de torpedo tardío; Barra= 3 mm. c1 y c2 = cotiledones; ma=meristemo apical; r= radícula.

En términos hormonales, se interpreta que la formación del cotiledón en *A. tequilana* debe de cumplir con lo encontrado por Fischer-Iglesias y col. (2001) para el trigo y se especula que en *A. tequilana* en el estadio globular existe una producción de auxina con una distribución pasiva a lo largo de todo el cuerpo del embrión, después se considera que existe un transporte polar de la auxina en dónde se inicia la extracción de la auxina de la zona del embrión en dónde se formará el meristemo apical del brote, empezando a fluir la auxina hacia la zona radicular y hacia las zonas en dónde se desarrollarán los cotiledones, se especula en este estudio que existen tres zonas de acumulación de auxina una zona en la parte dorsal y dos zonas cercanas a los costados de la zona del meristemo apical (Fig. 29). En este estudio se podría especular que en *A. tequilana* pueden existir variaciones sutiles en la forma en cómo se distribuye la auxina al momento de formarse los cotiledones, ocasionando así las variaciones que podemos observar en los cotiledones de esta especie.



**Figura 29.** Propuesta hipotética del movimiento polar de auxinas en *A. tequilana*. Para esta especie se hipotetiza que en el estadio globular existe una distribución de la auxina a través de toda la cabeza embrionaria. En el estadio de transición entre el estadio globular y la simetría bilateral se hipotetiza que ocurre un movimiento polar a través del cual la auxina es transportada de la parte inferior hacia los costados, y el dorso; en la parte superior ventral (en la zona en dónde se desarrollará el meristemo) existe un proceso de exportación o evacuación de la auxina hacia las zonas aledañas para permitir el desarrollo del meristemo del brote. En este mismo estadio se hipotetiza que la auxina se acumula en la zona superior dorsal permitiendo así, el desarrollo del cotiledón. Se especula que existen tres zonas en donde se concentra mayormente la auxina, dos zonas laterales al meristemo del brote y una zona dorsal. Se especula que existe una variación en el patrón de concentración de la auxina en estas tres zonas y que esta variación ocasiona que en *A. tequilana* se puedan presentar embriones con dos cotiledones, cotiledones fusionados y un solo cotiledón.

## 8 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se concluye que los poliembriones en *A. tequilana* Weber var. Azul probablemente son formados a través de los procesos de fisión monocigótica, desarrollo de embriones por apomixis a partir de sinérgidas y antípodas, por embrionía secundaria a partir de suspensor y por embrionía adventicia a partir del tejido nucelar.

El patrón de desarrollo embrionario en *A. tequilana* presenta procesos considerados en el presente trabajo como intermedios entre la especie “dicotiledónea” *Arabidopsis thaliana* y la especie monocotiledónea *Zea mays*.

Los estadios en forma de corazón encontrados en este trabajo sugieren que *A. tequilana* Weber var. Azul presenta patrones de desarrollo que se comparten con lo que antes se consideraba como el grupo de las dicotiledóneas.

Los estadios embrionarios considerados como típicos para las monocotiledóneas no corresponden a la especie *A. tequilana* Weber var. Azul.

Los resultados del presente trabajo sugieren que la sincotilia debió haber sido el proceso que evolutivamente originó al único cotiledón presente en *Agave tequilana*.

Se considera a *A. tequilana* como una especie clave para estudios evolutivos, esta especie podría presentar un repertorio de mecanismos ancestrales que afectan el desarrollo de los cotiledones y podría ser un recurso genético importante para elucidar la evolución a través de estudios de la biología del desarrollo, también podría ayudar a revelar la extensión de la conservación de genes a lo largo del reino vegetal y distinguir los mecanismos que han evolucionado de manera divergente.

## 9. RECOMENDACIONES

A partir del presente estudio se sugiere la realización de estudios sobre la ecología reproductiva de *A. tequilana* y parientes silvestres que se centren en determinar si la efectividad en la polinización y fecundación se relaciona con la formación de poliembriones, para permitir elucidar si la formación de poliembriones es una estrategia evolutiva para contrarrestar las fallas en la reproducción sexual. Se recomienda considerar la producción de embriones con la eficiencia en la polinización, fecundación, producción de frutos y supervivencia de embriones.

Se recomienda la elaboración de estudios experimentales centrados en el transporte polar de auxinas en embriones cigóticos de *A. tequilana* y la comparación de este transporte polar entre esta especie con *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*. Al igual, se propone la comparación del desarrollo embrionario de estas tres especies y la propuesta de modelos alternativos de desarrollo en plantas.

Se recomienda el estudio de expresión génica *in vitro* para la detección de genes que se activan durante las distintas fases de desarrollo embrionario.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abraham-Juárez M. J.; Ramírez-Malagón R.; Gil-Vega K.; Simpson J. AFLP Analysis of genetic variability in three reproductive forms of *Agave tequilana*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32: 171-175; 2009.
- Aida M.; Ishida T.; Fukaki H.; Fujisawa H.; Tasaka M. Genes Involved in Organ Separation in Arabidopsis: An analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant Cell* 9:841-857; 1997.
- Alemán S.; González G.; Barredo F. Estudio histológico de la embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem. *Biotecnología vegetal* 2: 51-56; 2002.
- Allem A. C. Optimization theory in plant evolution: An overview of long-term evolutionary prospects in the angiosperms. *The Botanical Review* 69: 225-251; 2004.
- APG II. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of Linnean Society* 141: 399-436; 2003.
- Arizaga S.; Ezcurra E. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia* 101:329-334; 1995.
- Arizaga S.; Ezcurra E.; Peters E.; Ramírez F.; Vega E. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a mexican tropical desert. II. The role of pollinators. *American Journal of Botany* 87: 1011-1017; 2000.
- Bancroft N. A review of literature concerning the evolution of monocotyledons. *New Phytologist*. 13: 285-308; 1914.
- Batygina T. Sexual and asexual processes in reproductive systems of flowering plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47: 51-60; 2005.

- Batygina T. B.; Bragina E. A. Vailyeva V. E. (2003). The reproductive system and germination in orchids. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 45:221-34; 2003.
- Batygina T. B.; Vinogradova G. Y. Phenomenon of polyembryony: genetic heterogeneity of seeds. *Russian Journal of Developmental Biology* 38: 126-151; 2007.
- Berleth T.; Chatfield S. Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book*. 2002.
- Blilou I.; Xu J.; Wildwater M.; Willemsen V.; Paponov I.; Friml J.; Heidstra R.; Aida M., Palme K.; Scheres B. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433:39-44; 2005.
- Burger W.C. The question of cotyledon homology in angiosperms. *The Botanical Review* 64:356-371; 1998.
- Capron A.; Chatfield S.; Provart N. Berleth T. Embryogenesis: Pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book*; 2009.
- Craig S. F.; Slobodkin L. B.; Wray G. A.; Biermann C. H. The 'paradox' of polyembryony: A review of the cases and a hypothesis for its evolution. *Evolutionary Ecology* 11:127-143; 1997.
- Chandler J.W. Cotyledon organogenesis. *Journal of Experimental Botany* 59: 2917-2931; 2008.
- Chase M.W. Monocot relationships: An overview. *American Journal of Botany* 91: 1645-1655; 2004.
- Chase M. W.; Reveal J.L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:122-127; 2009.

- Cheng Y.; Dai X.; Zhao Y. Auxin synthesized by the YUCCA Flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 2430-2439; 2007.
- Das A.; Mandal B.; Sarkar J.; Chaudhuri S. Occurrence of zygotic twin seedlings in mandarin orange plants of the northeastern Himalayan region. *Current Science* 92: 1488-1489; 2007.
- Davies T.J.; Barraclough T.G.; Chase M.W.; Soltis P.S.; Soltis D. E.; Savolainen V. Darwin's abominable mystery: Insights from a supertree of the angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 1904-1909; 2004.
- Ditommaso A.; Lawlor F. M.; Darbyshire S.J. The Biology of Invasive Alien Plants in Canada. 2. *Cynanchum rossicum* (Kleopow) Borhidi (= *Vincetoxicum rossicum* (Kleopow) Barbar) and *Cynanchum louseae* (L.) Kartesz y Gandhi (= *Vincetoxicum nigrum* (L) Moench). *Canadian Journal of Plant Science* 85:243-263; 2005.
- Dodeman V. L.; Ducreux G.; Kreis M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48:1493-1509; 1997.
- Drews G.; Lee D.; Christensen C. A. Genetic Analysis of Female Gametophyte Development. *The Plant Cell*.10:5-17; 1998.
- Dumas C.; Mongensen H. L. Gametes and Fertilization: Maize as a Model System for Experimental Embryogenesis in Flowering Plants. *The Plant Cell* 5:1337-1348; 1993.
- Dunwell J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal* 8:377-424; 2010
- Dupree P. Plant embryogenesis: Cell division forms a pattern. *Current Biology* 6: 683-685; 1996.
- Durzan D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 6:339-376; 1988.

- Durzan D. J. Monozygotic Cleavage Polyembryogenesis and Conifer Tree Improvement. *Cytology and Genetics* 42:159-173; 2008.
- Eguiarte L.E. Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56: 45-56; 1995.
- Eguiarte L.E.; Souza V.; Sila-Montellano A. Evolución de la Familia Agavaceae: Filogenia, Biología Reproductiva y Genética de Poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66:131-150; 2000.
- Erdelská O.; Vidovencová Z. Cleavage polyembryony in maize. *Sexual Plant Reproduction* 5:224-226; 1992.
- Escobar-Guzmán R. E.; Zamudio-Hernández F.; Gil-Vega K.; Simpson J. Seed production and gametophyte formation in *Agave tequilana* and *Agave americana*. *Botany* 86:1343-135; 2008.
- Faure J. E.; Dumas C. Fertilization in Flowering plants. New Approaches for an Old Story. *Plant Physiology* 125:102-104; 2001.
- Fischer C.; Neuhaus G. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. *The Plant Journal* 9:659-669; 1996.
- Fischer C.; Speth V.; Fleig-Eberenz S.; Neuhaus G. Induction of Zygotic Polyembryos in Wheat: Influence of Auxin Polar Transport. *The Plant Cell* 9: 1767-1780; 1997.
- Fischer-Iglesias C.; Sundberg B.; Neuhaus G.; Jones A. M. Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat. *The plant Journal* 26:115-129; 2001.
- Fleming T.; Sahley C.; Holland J.; Nason J.; Hamrick J. Sonoran desert columnar cacti and the evolution of generalized pollination systems. *Ecological Monographs* 71:511-530; 2001.

- Frost H.B. The genetics and cytology of Citrus. *Current Science, Special Number on Genetics* 24-27; 1938.
- Fukai S.; Shimomura R.; Kondo T. Morphological observation of polyembryony in *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 69: 614-616; 2000.
- Ganeshaiyah K. N.; Shaanker R. U.; Joshi N. V. Evolution of polyembryony: consequences to the fitness of mother and offspring. *Journal of Genetics* 70: 103-127. 1991.
- García-Mendoza A. Distribution of Agave (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and succulent Journal* 74:177-187; 2002.
- Gentry H. S. Agaves of continental North America. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona; 670 pp.; 1982.
- Goda H.; Sawa S.; Asami T.; Fujioka S.; Shimada Y.; Yoshida S. Comprehensive Comparison of Auxin-Regulated and Brassinosteroid-Regulated Genes in Arabidopsis. *Plant Physiology* 134:1555-1573; 2004.
- Goldberg R. B., de Paiva G.; Yadegari R. Plant Embryogenesis: Zygote to Seed. *Science* 266: 605-614; 1994.
- González-Gutierrez A. Megagametogénesis, fecundación, formación del cigoto y desarrollo temprano del embrión de *Agave tequilana* Weber var. Azul. Tesis de Licenciatura en Biología. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. México. 58 p; 2013.
- Good-Avila S.V.; Souza V.; Gaut B. S.; Eguiarte L.E. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *PNAS* 104: 9124-9129; 2006.
- Haig D. New Perspectives on the Angiosperm Female Gametophyte. *The Botanical Review* 56: 236-274; 1990.

- Haines R.W.; Lye K.A. Monocotylar seedlings: a review of evidence supporting an origin by fusion. *Botanical Journal of Linnean Society* 78: 123-140; 1979.
- Harada J. Signalling in plant embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 2:23-27; 1999.
- Jedrzejczyk I.; Nowaczyk P. *In vivo* polyembryony induction in species of *Capsicum*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 51: 55-60; 2009.
- Jenik P.D.; Barton M.K. Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development* 132:3577-3585, 2005.
- Jiu-Huan F.; Xue-Bin X.; Xian-Dong L.; Chong-Ling Z.; Xiu-Lan L.; Wan-Chun W. Embryogenesis, Germination, Structure and Cotyledon Dimorphism of *Zea mays* Embryo. *Acta Botanica Sinica* 45: 712-723; 2003.
- Kaplan D. R.; Cooke T.J. Fundamental concepts in the embryogenesis of dicotyledons: a morphological interpretation of embryo mutants. *The Plant Cell* 9:1903-1919; 1997.
- Kim I.; Hempel F.D.; Sha K.; Pfluger J.; Zambryski P.C. Identification of a developmental transition in plasmodesmatal function during embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 129: 1261-1272; 2002.
- Koltunow A. Apomixis: Embyo Sacs and Embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell* 5:1425-1437. 1993.
- Koltunow A. M.; Grossniklaus U. Apomixis: A developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54:547-74, 2003.
- Leyser O.; Day S. Mechanisms in Plant Development. John Wiley and Sons Ltd, United Kingdom 241 pp.; 2002.
- Li W.; Ma H. Gametophyte development. *Current Biology* 12: 718-721; 2002.
- Liu C. M. y Meinke D.W. The titan mutants of *Arabidopsis* are disrupted in mitosis and cell cycle control during seed development. *The Plant Journal* 16:21-31; 1998.

- Liu C. M.; Xu Z. H.; Chua N.H. Auxin Polar Transport is Essential for the Establishment of Bilateral Symmetry during Early Plant Embryogenesis. *The Plant Cell* 5: 621-630; 1993.
- López-Curto M. L.; Márquez-Guzmán J.; Murguía-Sánchez G. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Libro de Laboratorio. Segunda edición. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 178 pp; 2005
- Madishetty K., Bauer P.; Sharada M. S. Genetic characterization of the polycotyledon locus in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 113:673-683; 2006.
- Maheshwari. An Introduction to the Embryology of Angiosperms. McGraw-Hill New York; 453 pp. 1950.
- Martin W.; Lydiate D.; Brinkmann H.; Forkmann G.; Saedler H.; Rüdiger C. Molecular Phylogenies in Angiosperm Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 10:140-162; 1993.
- Matthys-Rochon E.; Piola F.; Le Deunff E.; Mol R.; Dumas C. *In vitro* development of maize immature embryos: a tool for embryogenesis analysis. *Journal of Experimental Botany* 49: 839-845; 1998.
- Medina-Filho H. P.; Bordigon R.; Lizana R. M.; Siqueira W. J. Genetic proof of the occurrence of mono and dizygotic hybrid twins in Citrus rootstocks. *Brazilian Journal of Genetics* 16: 703-711, 1993.
- Molina-Freaner F.; Eguiarte E. The pollination biology of two paniculate agaves (Agavaceae) from northwestern Mexico: contrasting roles of bats as pollinators. *American Journal of Botany* 90: 1016-1024; 2003.
- Naumova T.N. Apomixis and amphimixis in flowering plants. *Cytology and Genetics* 42: 179-188; 2008.

- Norstog K. Polyembryony in *Hierochloe odorata* (L.) Beauv. *The Ohio Journal of Science* 57: 315-320; 1957.
- Nowaczyk L.; Nowaczyk P. Genetic analysis of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) twin forms. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48: 53-58; 2006.
- Ozias-Akins P. Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 25: 199-214; 2006.
- Piven M. N.; Barredo-Pool F. A.; Borges-Argáez I. C.; Herrera-Alamillo M. A., Mayo-Mosqueda A.; Herrera-Herrera J. L.; Robert M. L. Reproductive Biology of Henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave angustifolia* (Agavaceae). I. Gametophyte development. *American Journal of Botany* 88(11): 1966-1976; 2001.
- Portillo L.; Santacruz-Ruvalcaba F.; Gutiérrez-Mora A.; Rodríguez-Garay B. Somatic Embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar Azul. *In vitro cellular and Developmental Biology plant* 43: 569-575; 2007.
- Raju M.V.S.; Steeves T. A. Growth, Anatomy and Morphology of the Mesocotyl and the Growth of Appendages of the Wild Oat (*Avena fatua* L.) Seedling. *Journal of Plant Research* 111: 73-85; 1998.
- Rao K. S. Embryogenesis in flowering plants: Recent approaches and prospects. *Journal of Bioscience* 21: 827-841; 1996.
- Regen L. The Development of the Embryo Sac in *Agave virginica*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 68: 229-236; 1941.
- Rocha, M.; Valera A.; Eguairte L. Reproductive ecology of five sympatric *Agave littae* (Agavaceae) species in Central Mexico. *American Journal of Botany* 92: 1330-1341; 2005.
- Rocha M.; Good-Avila F.; Molina-Freaner F.; Arita H.; Castillo A.; García-Mendoza A.; Silva-Montellano A.; Gaut B.; Souza V.; Eguarte L. E. Pollination biology and

- adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso* 22:329-344; 2006.
- Ruvalcaba-Ruiz D.; Rodríguez-Garay B. Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. Azul. *BMC Plant Biology* 2:10; 2002.
- Ruvalcaba-Ruiz D.; Palomino G.; Martínez J.; Méndez I.; *In vitro* induction of a trisomic of *Agave tequilana* Weber var. Azul (Agavaceae) by *para*-fluorophenylalanine treatment. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 48:144-152; 2012.
- Salomao A.; Allem A. C. Polyembryony in Angiospermous Trees of the Brazilian Cerrado and Caatinga Vegetation. *Acta botanica brasiliica* 15: 396-378; 2001.
- Santacruz-Ruvalcaba F.; Gutiérrez-Mora A.; Rodríguez-Garay B. Somatic embryogenesis in some cactus and *Agave* species. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 3:15-26; 1998.
- Sargent E. A theory of the origin of monocotyledons founded on the structure of their seedlings. *Annals of Botany* 17: 1-92; 1903.
- Sarkar K.R.; Coe E. H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. *Genetics* 54:453-464; 1966.
- Scarpella E.; Marcos D.; Friml J.; Berleth T. Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes and Development* 20:1015-1027; 2006.
- Schneider J.V. Stachyuraceae *The Families and Genera of Vascular Plants* 9:449-455; 2007.
- Sharman B.C. A Twin Seedling in *Zea mays* L Twinning in the Gramineae. *New Phytologist* 41: 125-129; 1942.
- Shuma J. M.; Raju M. V. S.; Is the wild oat embryo monocotylous?. *The Botanical Magazine Tokyo* 104:15-23; 1991.

- Soltis P. S.; Soltis D. E. The Origin and Diversification of Angiosperms. *American Journal of Botany* 91:1614-1626; 2004.
- Sosso D.; Canut M.; Gendrot G.; Dedieu A.; Chambrier P.; Barkan A.; Consonni G.; Rogowsky P. M.; PPR8522 encodes a chloroplast-targeted pentatricopeptide repeat protein necessary for maize embryogenesis and vegetative development. *Journal of Experimental Botany* 63:5843-5857; 2012.
- Souza L.A.; Iwazaki C.; Moscheta I.S. Morphology of the Pericarp and Seed of *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex DC.) Standl. (Bignoniaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 407-418; 2005.
- Sunberg E.; Østergaard L. Distinct and Dynamic Auxin Activities During Reproductive Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1:14; 2009.
- Sundaresan V.; Alandete-Saez M. Pattern formation in miniature: the female gametophyte of flowering plants. *Development* 137:179-189; 2010.
- Swamy B. G. L. Embryology of Orchidaceae. *Current Science* 12: 13-17; 1943.
- Titova G. E. *Agapanthus Praecox* Willd. (Alliaceae) in Monocotly, Dicotly and Transitional Forms. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 45: 161-165; 2003.
- Tokumasu S. A cytogenetical study on the origin of twin plants found in the progeny of an aneuploid in *Brassica napus* L. *Japanese Journal of Breeding* 22: 334-339; 1972.
- Udovic D.; Aker C. Fruit abortion and the regulation of fruit number in *Yucca whipplei*. *Oecologia* 49:245-248; 1981.
- Vicentz M.; Cara F. A. A.; Okura V. K.; da Silva F.R.; Pedrosa G. L.; Hemerly A. S.; Capella A. N.; Marins M.; Ferreira P. C.; França S. C.; Grivet L.; Vettore A. L.; Kemper E. L., Burnquist W.L.; Targo M. L. P.; Siqueira W. J.; Kuramae E.E.; Marino C. L.; Camargo L. E. A.; Carrer H.; Coutinho L. L.; Furlan L. R.; Lemos M.V.F.; Nunes L. R.; Gomes S. L.; Santelli R. V.; Goldman M. H.; Bacci M.; Giglioti E. A.; Thiemann O. H.; Silva

- F. H.; Van-Sluys M. A., Nobrega F. G.; Arruda P.; Menck F. M. Evaluation of Monocot and Eudicot Divergence Using the Sugarcane Transcriptome. *Plant Physiology* 134: 951-959; 2004.
- West M. A. L.; Harada J.J. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *The Plant Cell* 5:1361-1369; 1993.
- Wikström, N., Savolainen, V., y Chase, M.W. Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 268: 2211-2220; 2001.
- Willemsse M.T.M.; Van Went J.L. The female gametophyte. En *Embryology of Angiosperms*, ed. B.M. Johri. Springer-Verlag, Berlin; 1984.
- Wolfe K.; Gouy M.; Yang Y.W.; Sharp P.M.; Li W.H. Date of monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86:6201-6205; 1989.
- Yadegari M.; Drews G. N. Female Gametophyte Development. *The Plant Cell* 16:133-141; 2004.
- Yeung E. C.; Meinke D. W. Embryogenesis in Angiosperms: Development of the Suspensor. *The Plant Cell* 5: 1371-1381; 1993.
- Zhang X. S.; O'Neill S. Ovary and gametophyte development are co-ordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. *The Plant Cell* 5:403-418; 1993.
- Zhurov V.; Terzin T.; Grbić M. (In) discrete charm of the polyembryony: Evolution of embryo cloning. *Cellular and Molecular Life Sciences Cell* 64: 2790-2798; 2007.

## 11. GLOSARIO

**Antípodas:** Células del saco embrionario de las angiospermas en el lado opuesto a la ovocélula y las sinérgidas.

**Apogamia:** Producción de un embrión sin fecundación a partir de cualquiera de las células del gametófito femenino distinta al gameto femenino (distinta a la ovocélula).

**Célula central:** Célula binucleada del saco embrionario constituida por los núcleos polares.

**Célula huevo u ovocélula:** el gameto femenino.

**Célula madre de la megaspora:** Se refiere a la célula diferenciada de la nucela que por meiosis dará origen a la megaspora.

**Coenocito:** Organismos con células multinucleadas, se encuentran especialmente en algunas algas y hongos.

**Coleorriza:** Órgano tubular que envuelve a la raíz primaria en los embriones de las gramíneas.

**Cotiledones:** órganos embrionarios capaces de proveer energía y nutrientes a la plántula en desarrollo hasta que esta se encuentre lo suficientemente desarrollada para realizar la fotosíntesis.

**Diploide:** Se refiere a las células que presentan dos juegos de cromosomas.

**Diplosporia:** La célula madre del saco embrionario o gametófito femenino se desarrolla directamente en un embrión diploide.

**Esfíngidos:** Mariposas nocturnas o crepusculares de cuerpo grueso y robusto, con alas anteriores estrechas y largas.

**Endospermo:** Es un tejido nutricional triploide el cual se forma a partir de la fusión de los dos núcleos polares en la célula central con uno de los núcleos espermáticos del polen.

**Espiga:** Es un tipo de inflorescencia racemosa en el cual el eje es alargado y las flores son sésiles.

**Esporofito:** la fase diploide multicelular en las plantas la cual produce por meiosis esporas haploides. Un esporofito se desarrolla a partir de un cigoto formado por la fusión de un gameto femenino con un gameto masculino.

**Gametofito:** En las plantas con alternancia de generaciones (generación haploide y generación diploide) se la llama gametófito al individuo de generación haploide. En las angiospermas esta generación se encuentra embebida en las estructuras florales.

**Haploide:** se denomina haploide a las células que solamente presenta un solo juego de cromosomas.

**Hipocótilo:** eje embrionario que soporta a los cotiledones.

**Inflorescencia:** disposición de las flores sobre las ramas de un tallo. Sistemas de ramas de los espermatófitos que están destinados a la formación de flores y se suelen encontrar más o menos claramente delimitados respecto al área vegetativa.

**Iterópara:** Ser que presenta varios ciclos reproductivos.

**Megaspora:** En las angiospermas, la megaspora se forma en los ovarios, se forma por meiosis a partir de una célula diferenciada de la nucela del óvulo llamada célula madre de la megaspora. Sus núcleos son haploides.

**Megasporocito:** Es la célula diploide que atravesará el proceso de meiosis para producir las megasporas.

**Meristemo apical de la raíz:** tejido meristemático cuyas divisiones originan a las células que al diferenciarse formarán los tejidos adultos de la raíz.

**Meristemo apical del brote:** Se refiero a tejidos embrionarios capaces, se multiplican activamente para formar los tejidos adultos diferenciados, el cuál será el encargado del crecimiento del tallo, ramas y hojas.

**Monocárpico:** plantas que florecen y fructifican sólo una vez. Planta que florece y fructifica una sola vez, muriendo después.

**Nucela:** Tejido esporofítico presente en el óvulo angiospermas dentro del cual se diferencia la célula madre de las megaspora.

**Núcleos espermáticos:** El grano de polen contiene dos núcleos espermáticos. Cuando el grano de polen germina uno de los núcleos desciende por el tubo polínico y fecunda a la ovocélula, el otro núcleo espermático se fusiona con los núcleos de la célula central del saco embrionario para formar el endospermo.

**Núcleos polares:** dos gametos masculinos dentro del grano de polen.

**Panícula:** Un racimo con ramificaciones también racemosas; el término es empleado para describir a una inflorescencia muy ramificada.

**Paniculada:** Con una panícula o dispuesta en panícula.

**Partenogénesis:** En las angiospermas se le conoce como partenogénesis al desarrollo de un embrión a partir de una célula huevo no fecundada, puede ocurrir a partir de células reducidas o no reducidas.

**Perispermo:** Reserva de nutrimentos en la semilla proveniente de la nucela o de los tegumentos.

**Protándrica:** Los estambres y estigmas de una misma flor no alcanzan al mismo tiempo la madurez para la polinización. Si los estambres maduran antes, las flores son protándricas, la flor funciona primero como masculina y después como femenina.

**Racemosa:** Inflorescencia con racimos o el aspecto de un racimo.

Relojes moleculares: técnica para establecer la fecha de divergencia de dos especies. Deduce el tiempo pasado a partir del número de diferencias entre dos secuencias de ADN. Se basa en la tasa de error de replicación del ADN.

Rosetas: Formación de hojas que se disponen muy juntas a causa de la brevedad de los entrenudos formando una estructura a modo de una rosa.

Reducido: Hace referencia al paso a través de procesos meióticos que permitieron la obtención del estado haploide. A la meiosis se le conoce como el proceso de reducción celular, en dónde una célula se convierte en haploide.

Saco embrionario: Gametofito femenino ubicado en el interior de la nucela que contiene a la ovocélula, sinérgidas, y las antípodas y la célula central.

Semélpara: que presenta semelparidad. Es decir, especies que se reproducen una sola vez en su vida y mueren.

Sinérgidas: Las células del saco embrionario que se encuentran junto a la célula huevo u ovocélula.

Suculenta: Aquellas plantas que su raíz, tallo u hojas se han engrosado para almacenar agua.

Suspensor: Órgano considerado como temporal y presente en los embriones vegetales, este órgano permite el anclaje de la cabeza embrionaria con el saco embrionario circundante y los tejidos del óvulo y sirve como un conducto de nutrimentos del esporofito materno y el proembrión en desarrollo. El suspensor muere después del estadio acorazonado y no constituye una parte funcional del embrión en una semilla madura.

Tejido integumental: Tejido o cubierta protectora del óvulo que dará origen a la cubierta de la semilla madura.

Transcriptoma: Se le denomina transcriptoma a todo el ARN mensajero transcrito bajo ciertas condiciones.