

Secuencias nucleotídicas de la región ITS en familias S₁ y PL de maíces poliembriónicos*

Nucleotide sequences of ITS region in S₁ and PL families of polyembryonic maize

Marselino Avendaño-Sánchez¹, José Espinoza-Velázquez¹, Alondra Gutiérrez-López¹, Adriana Carolina Flores-Gallegos² y Raúl Rodríguez-Herrera^{2§}

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Departamento de Fitomejoramiento. Blvd. Antonio Narro 1923, Buenavista Saltillo México. ²Universidad Autónoma de Coahuila-Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas. Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas V. s/n. Col. República Ote. C. P. 25280. Saltillo, Coahuila, México. Tel: 52 844 4161238, 4169213. §Autor para correspondencia: rrh961@hotmail.com.

Resumen

Poliembrionía (PEm) es una mutación poco frecuente en maíz (*Zea mays* L.) y se manifiesta en la formación y desarrollo de dos o más plantas por semilla. Los mecanismos y causas de la PEm no están aún definidos. El objetivo del presente trabajo fue determinar la similitud de la secuencia de la región ITS de plantas madre y su progenie PEm obtenidas por autofecundación (S₁) y polinización libre (PL). La progenie se obtuvo a partir de la población UA-IMM-BAP (braquíticas, alta poliembrionía). Se tomaron muestras de tejido foliar de madres y sus progenies de 3 familias de polinización libre y 3 familias de líneas S₁. Después de extraer ADN, se amplificaron las regiones genómicas ITS (Internal Transcribed Spacer) mediante PCR y posteriormente se secuenció los fragmentos amplificados. La comparación de las secuencias ITS dentro de cada familia mostro cierta similitud, pero no fueron idénticas en las familias PL2, PL4, PL5 y S5. Sin embargo, en las familias S3 y S7 la comparación entre la secuencia de la madre y su descendencia (S3m vs S3P22 y S7m vs S7P22) presentó 100 % de similitud. La similitud encontrada entre las secuencias de ITS de plantas madre y descendientes PEm sugieren una probable relación entre la poliembrionía y apomixis.

Palabras clave: *Zea mays* L., diversidad nucleotídica, ITS, líneas S₁, polinización libre, similitud.

Abstract

Polyembryony (PEm) is a rare mutation in maize (*Zea mays* L.) and is manifested in the formation and development of two or more plants per seed. The mechanisms and causes of PEm are not yet defined. The aim of this study was to determine the similarity of the sequence of the ITS region of mother plants and their progeny PEm obtained by self-fertilization (S₁) and open-pollinated (PL). The progeny was obtained from the UA-IMM-BAP (brachitic, high polyembryony) population. Leaf tissue samples of mothers and their progenies from 3 open-pollinated families and 3 families from S₁ lines were taken. After extracting DNA, the genomic regions ITS (Internal Transcribed Spacer) were amplified by PCR and the amplified fragments were subsequently sequenced. Comparisons of ITS sequences within each family showed some similarity but were not identical in PL2, PL4, PL5 and S5 families. However, in S3 and S7 families the comparison between the sequence of mother and its progeny (S3m vs S3P22 and S7m vs S7P22) presented 100% similarity. The similarity found between ITS sequences of mother plants and PEm descendants suggest a probable relationship between polyembryony and apomixis.

Keywords: *Zea mays* L., ITS, nucleotide diversity, open pollinated, S₁ lines, similarity.

* Recibido: septiembre de 2014
Aceptado: febrero de 2015

Introducción

La poliembrionía (PEm) es una variante genética en maíz, que se refiere a la producción de dos o más plántulas por semilla, emergiendo simultáneamente desde el momento de la germinación (Espinoza *et al.*, 1998). La PEm se ha reportado como una mutación natural que aparece esporádicamente en baja frecuencia (Castro, 1979; Pilu, 2000), aunque también se ha reportado como mutación inducida (Morgan y Rappleye, 1951). El maíz poliembriónico presenta características de alto potencial agronómico, como son alta calidad proteica (15 a 20% más lisina) y mayor cantidad de grasa cruda en el grano (de 30 a 50%) que la encontrada en maíz común (González *et al.*, 2011). Además, su capacidad de semilla prolífica produce una mayor cantidad de materia seca por semilla de siembra (Castro, 1979). Estos atributos hacen que este fenómeno haya sido estudiado por diferentes investigadores(as) en los últimos 100 años (Kempton, 1913; Weatherwax, 1921; Kiesselbach, 1926; Randolph, 1936; Skovested, 1939; Morgan y Rappleye, 1951; Kermicle, 1969, 1971; Pesev *et al.*, 1976; Castro, 1979; Rebolloza *et al.*, 2011; Espinoza *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que los embriones adicionales en la semilla pueden resultar de la diferenciación y desarrollo de varios tejidos maternos que están asociados al saco embrionario. Bhojwani y Bhatnagar (1974) indican que la poliembrionía puede surgir en angiospermas por diferentes mecanismos: 1) mediante la formación de gemelos o tripletes a partir de una célula huevo pro-embriónica (cleavage); 2) por la formación de embriones a partir de células del saco embrionario diferentes a la ovocélula; 3) por el desarrollo de más de un saco embrionario dentro del mismo óvulo derivado de la misma célula madre de la megaspora o de células de la nucela; y 4) por la activación de una célula somática o esporofítica del óvulo para formar un embrión, en forma natural. También, en forma artificial, se puede inducir con la fitohormona 2,4-D en sacos embrionarios 2 días después de la polinización (Erdelska y Vidovencova, 1992; Erdelska, 1996).

Sin embargo, a la fecha aún existen lagunas en el conocimiento de la PE por lo que se han propuesto diferentes mecanismos genéticos que controlan la PE en maíz: desde herencia por un gen mendeliano, la interacción de dos genes y control genético de tipo cuantitativo. Investigaciones iniciales en el Instituto Mexicano del Maíz "Dr. Mario E. Castro Gil" (IMM) de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" se propuso que la PE se heredaba de manera cuantitativa (heredabilidad de 0.65; Castro, 1979; Espinoza

Introduction

Polyembryony (PEm) is a corn gene variant, which relates to the production of two or more seedlings per seed, emerging simultaneously from the moment of germination (Espinoza *et al.*, 1998). PEm has been reported as a natural mutation that appears sporadically in low frequency (Castro, 1979; Pilu, 2000), but has been reported as induced mutation (Morgan and Rappleye, 1951). Polyembryonic corn present high agronomic potential characteristics, such as high quality protein (15 to 20% more lysine) and higher amount of crude fat in grain (30 to 50%) than that found in common corn (González *et al.*, 2011). In addition, its ability of prolific seed produces a larger amount of dry matter per seed at sowing (Castro, 1979). Due to these attributes this phenomenon has been studied by different researchers in the last 100 years (Kempton, 1913; Weatherwax, 1921; Kiesselbach, 1926; Randolph, 1936; Skovested, 1939; Morgan and Rappleye, 1951; Kermicle, 1969, 1971; Pesev *et al.*, 1976; Castro, 1979; Rebolloza *et al.*, 2011; Espinoza *et al.*, 2012).

It has been proposed that additional embryos in the seed may result from the differentiation and development of various maternal tissues that are associated to embryo sac. Bhojwani and Bhatnagar (1974) indicate that Polyembryony may start in angiosperms by different mechanisms: 1) through the formation of twins or triplets from an egg cell pro-embryo (cleavage) cell; 2) embryo formation from cells of different embryonic sac to the egg cell; 3) development of more than one embryo sac within the same ovule derived from the same mother cell of the megaspore or nucellus cells; and 4) activation of somatic cell or sporophytic ovule to form an embryo, naturally. Also, artificially, can be induced with 2,4-D phytohormone in embryo sacs 2 days after pollination (Erdelska and Vidovencova, 1992; Erdelska, 1996).

However, to date there are still gaps in the knowledge of PE so there had been proposed different genetic mechanisms that control PE in corn: from inheritance by a Mendelian gene, the interaction of two genes and quantitative genetic control. Initial research at the Instituto Mexicano del Maíz "Dr. Mario E. Castro Gil" (IMM) from the Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" was suggested that PE was inherited quantitatively (heritability of 0.65; Castro, 1979; Espinoza *et al.*, 1998). The first time that PE corn was observed were in IMM-UAAAN populations was in a town called SSE, based on super-dwarf corn.

et al., 1998). La primera vez que se observaron maíces PE en poblaciones del IMM-UAAAN fue en una población denominada SSE, base de los maíces súper-enanos.

Originalmente, la condición de plantas gemelas se presentó en frecuencias de 1 a 2% (Castro, 1979). A partir de esas plantas, en este Instituto se generaron dos poblaciones PE que en la actualidad presentan frecuencias de 55 a 65% del mutante. Estas poblaciones de maíz fueron denominadas: UA-IMM-BAP (braquítica de alta frecuencia poliembriónica) y UA-IMM-NAP (porte normal de alta frecuencia poliembriónica). Conviene señalar que estas dos poblaciones serán referidas en lo sucesivo como BAP y NAP. Estudios posteriores sobre la herencia de la poliembriónia en estas poblaciones han permitido determinar y validar un modelo de herencia cualitativa, controlada por dos *loci* en interacción génica epistática recesiva duplicada del tipo 15:1 en segregación F₂ y de 12:4 en CP, cruce de prueba, presentando además el fenómeno de penetrancia incompleta (PI), por lo que el carácter se expresa generalmente de 30 a 70%, aunque es posible que en determinadas combinaciones híbridas entre genotipos PE de BAP y NAP con materiales exóticos, las progenies F₂ y CP muestren 100% de poliembriónia en la proporción esperada de 1/16 o 4/16, respectivamente (Rebolloza *et al.*, 2011).

Otros fenómenos reproductivos también se han asociado a la poliembriónia. Webber (1940) señaló que muchos casos de formación de células adventicias en angiosperma se refieren realmente a la apomixis y que es muy probable que la PE y la apomixis puedan estar interconectadas. Espinoza y De León (2005) reportaron que con base en el historial poliembriónico y poliploide de las poblaciones de maíz BAP y NAP, además de los trabajos preliminares sobre la conducta reproductiva atípica en maíz, se puede plantear que estas poblaciones pudieran contener la capacidad de manifestar reproducción asexual por semilla (apomixis). La introducción de la característica apomixis en maíz se ha intentado mediante retrocruzas convencionales usando como fuente de este fenómeno reproductivo a especies del género *Tripsacum* y se ha podido generar semillas viables de esta hibridación intergenérica. Algunas semillas se produjeron de manera apomíctica cuando fueron polinizadas utilizando maíz común (Leblanc *et al.*, 1996), lo que sugiere que la fuente de polen también puede estar relacionada con apomixis y quizás con PE.

Por otra parte, el rDNA (ácido desoxirribonucleico ribosómico) nuclear tiene muchas copias, que se repiten en tándem; se trata de un sistema complejo que incluye los genes 18S, 28S, 5S y 5.8S. Las secuencias de estos

Originalmente, la condición de twin plants presentada en frecuencias de 1 a 2% (Castro, 1979). From these plants, at this Institute two PE populations were generated that currently present frequencies of 55 to 65% from mutant. These corn populations were called: UA-IMM-BAP (brachitic of high polyembryonic frequency) and UA-IMM-NAP (normal size high polyembryony frequency). It should be noted that these two populations will be referred hereinafter as BAP and NAP. Further studies on inheritance of polyembryony in these populations have allowed to identify and validate a model of qualitative inheritance, controlled by two *loci* in duplicate recessive epistatic gene interaction of type 15:1 in segregation F₂ and of 12:4 in CP, test cross, presenting the phenomenon of incomplete penetration (PI), so that the trait is usually expressed in 30-70%, although it is possible that in certain hybrid combinations between PE genotypes of BAP and NAP with exotic materials, F₂ and CP progenies show 100% of polyembryony in the expected ratio of 1/16 or 4/16, respectively (Rebolloza *et al.*, 2011).

Other reproductive phenomena have also been associated with Polyembryony. Webber (1940) point out that many cases of adventitious cell formation in angiosperm really refer to apomixis and it is very likely that PE and apomixis can be interconnected. Espinoza and De Leon (2005) reported that based on poliembriónica and polyploid history of BAP and NAP population of corn, plus preliminary work on atypical reproductive behavior in corn, one can assert that these populations may contain the ability to express asexual reproduction by seed (apomixis). It has been tried to introduce the apomixis trait in corn through conventional backcrossing using as source of this reproductive phenomenon to species of *Tripsacum* and has been able to produce viable seeds of this intergeneric hybridization. Some seeds were produced in an apomictic manner when pollinated using common corn (Leblanc *et al.*, 1996), suggesting that the source of pollen may also be related with apomixis and perhaps with PE.

Moreover, nuclear rDNA (ribosomal deoxyribonucleic acid) has many copies that repeat in tandem; this is a complex system that includes 18S, 28S, 5.8S and 5S genes. The sequences of these genes are separated by internal spacers ITS (Internal Transcribed Spacer). These regions are easy to amplify and align, have a high rate of mutation, and are relatively small (Baldwin *et al.*, 1995), which are of great interest in the study of identification and classification of species (Rogers and Bendich, 1987). Furthermore, sequence analysis of ITS, has proven useful to establish phylogenetic relationships in plant families such as Poaceae (Hsiao *et al.*, 1995). In this paper the

genes están separadas por espaciadores internos ITS (Internal Transcribed Spacer). Estas regiones son fáciles de amplificar y alinear, tienen una alta tasa de mutación, y son relativamente pequeñas (Baldwin *et al.*, 1995), por lo que son de gran interés en el estudio de identificación y tipificación de especies (Rogers y Bendich, 1987). Además, el análisis de la secuencia de los ITS ha probado ser útil para establecer relaciones filogenéticas en familias de plantas tales como las Poaceae (Hsiao *et al.*, 1995). En el presente trabajo se compararon las secuencias nucleotídicas de la región ITS en familias S₁ y PL de la población BAP, desarrollada por el IMM-UAAAN con la finalidad de establecer la relación de identidad que existe entre los individuos de cada familia.

Materiales y métodos

Material genético. Dentro de la población BAP se realizaron 50 autofecundaciones con el fin de seleccionar las mazorcas más sanas y con mayor número de granos para obtener así un total de 20 progenies S₁. Además, en la misma población, se dejaron 50 plantas a polinización abierta, y se seleccionaron las mazorcas de la forma antes descrita para obtener un total de 20 familias de polinización libre (PL). Las familias S₁ y PL fueron obtenidas bajo condiciones de campo en el ciclo primavera-verano 2010 en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México [25° 21' latitud norte, 101° 02' longitud oeste, 1 756 msnm (CETENAL, 1975)]. De las plantas adultas poliembriónicas en plena floración que fueron seleccionadas en el campo para generar a las familias S₁ y PL, se colectó muestras de tejido de la lámina foliar, las cuales fueron etiquetadas de forma individual. El material vegetal se almacenó a -50 °C para la posterior extracción de ADN.

Evaluación en invernadero. Las semillas de las familias S₁ y PL se sembraron bajo condiciones de invernadero y fueron evaluadas a los 15 días de la siembra por su porcentaje de germinación, porcentaje de plántulas anormales y frecuencia de la poliembriónia. Cada familia fue representada por 20 semillas, con dos repeticiones, sembradas en charolas de germinación. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con dos repeticiones. A los 15 días se recolectó tejido de la lámina foliar de las progenies (plantas individuales y poliembriónicas), tanto de las S₁ como de PL. Las muestras de tejido fueron etiquetadas de forma individual. Debido a que a la fecha no se tienen líneas de maíz que presenten poliembriónia en 100% de

nucleotide sequences of the ITS region in S₁ and PL families of BAP population, developed by IMM-UAAAN were compared in order to establish the identity relation that exist between individuals of each family.

Materials and methods

Genetic material. Within 50 BAP populations were performed self-fertilization in order to select the most healthy cobs and with greater number of grains to obtain a total of 20 S₁ progenies. Furthermore, in the same population, 50 plants were left for open pollination, and selected cobs as described above for a total of 20 open pollinated families (PL). S₁ and PL families were obtained under field conditions during the 2010 spring-summer cycle in Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico [25° 21' N, 101° 02' W, 1 756 masl (CETENAL, 1975)]. Polyembryonic adult plants at full flowering that were selected in the field to generate S₁ and PL families, collected tissue samples from leaf lamina, which were labeled individually. The plant material was stored at -50 °C for subsequent DNA extraction.

Greenhouse evaluation. The seeds of S₁ and PL families were sown under greenhouse conditions and were evaluated at 15 days after planting for germination percentage, percentage of abnormal seedlings and frequency of polyembryony. Each family was represented by 20 seeds, with two replications, sown in germination trays. The experiment was established under a completely randomized design with two replications. At 15 days, leaf lamina tissue of the progeny (individual and polyembryonic plants) were collected, both S₁ and PL. The tissue samples were labeled individually. Due to up to date there are no corn lines that present 100% Polyembryony in grains, a seed can produce only one plant (when PE is not expressed), or two, three or more plants per seed (when PE expresses); therefore on leaf sampling for each family collected individual plants (coming from a single seed, and were labeled as P1) and two plants, coming from one seed, labeling each plant individually, e.g. P2-1 and P2-2 (Figure 1). Plant tissue samples were placed in bags after sealing and stored (-50 °C) for later DNA extraction.

DNA extraction. From the frozen plant tissue both mother plant and its progeny (individual and polyembryonic plants), from S₁ and PL families, extracted DNA as proposed by Ausubel *et al.* (1992), with some modifications. Approximately 0.1 g of plant material were weighted and placed in liquid nitrogen.

los granos, una semilla puede producir solo una planta (cuando no se expresa la PE), o bien dos, tres o más plantas por semilla (cuando se expresa la PE); por lo tanto, en el muestreo de cada familia se colectó tejido vegetal de plantas individuales (provenientes de una sola semilla, y fueron etiquetadas como P1) y de dos plantas, provenientes de una semilla, etiquetando cada planta de forma individual, por ejemplo P2-1 y P2-2 (Figura 1). Las muestras de tejido vegetal fueron colocadas en bolsas con cierre hermético y después almacenadas en congelación (-50 °C) para realizar posteriormente la extracción de ADN.

Extracción del ADN. Del tejido vegetal congelado tanto de la planta madre como de su descendencia (plantas individuales y poliembriónicas), de las familias S₁ y PL, se extrajo ADN según el protocolo propuesto por Ausubel *et al.* (1992), con algunas modificaciones. Se pesaron aproximadamente 0.1 g del material vegetal los cuales fueron colocados en nitrógeno líquido. Posteriormente, el material fue macerado hasta obtener un polvo fino, que fue transferido a un tubo de 1.5 ml; aquí, se agregó 1 ml de buffer de extracción CTAB [1.4 M NaCl (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA), 100 mM Tris-HCl (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA) pH= 8, 20 mM EDTA (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA), 18.2 M CTAB], y 20 µl de albúmina sérica bovina (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA) al 20%.

Se mezcló ligeramente en vortex y se incubó a baño maría a 55 °C durante 20 min. Después de esto, se centrifugó a 10 625 x g por 5 min y se tomaron 600 µl del sobrenadante a los cuales se le agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA). Se mezcló por inversiones suaves durante 1-2 min y se centrifugó por 10 min a 10 625 x g para recuperar la fase acuosa a la cual se le agregaron 50 µl de acetato de amonio 7.5 M (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA) y 800 µl de etanol (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA) frío al 96%. Se mezcló por inversiones suaves y se colocó en un congelador por 60 min para llevar a cabo la precipitación del ADN. Posteriormente, se centrifugó a 10 625 x g por 5 min y se descartó el sobrenadante.

La pastilla obtenida fue lavada dos veces con etanol (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA) al 70% y finalmente se resuspendió en 80 µl de NaOH (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA) 8 Mm y se almacenó a -20 °C. La integridad del ADN extraído fue evaluada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer SB (Borato de Sodio 5 mM)

Then the material was macerated to a fine powder which was transferred to a 1.5 ml tube; added, 1 ml of CTAB extraction buffer [1.4 M NaCl (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA), 100 mM Tris-HCl (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA) pH= 8, 20 mM EDTA (SIGMA Aldrich St Louis MO, USA), 18.2 M CTAB], and 20 µl of bovine serum albumin (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA) at 20%.

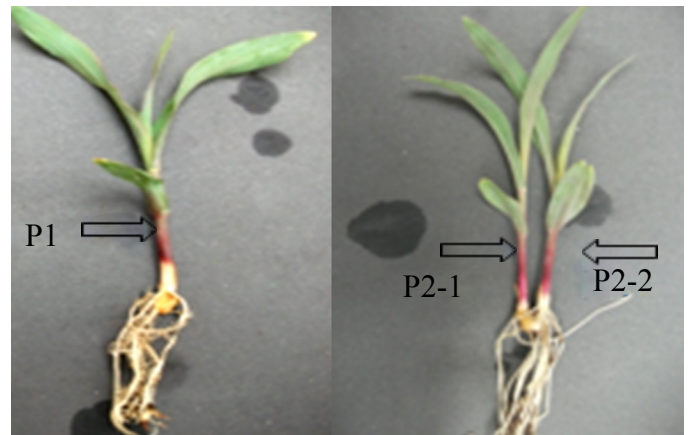


Figura 1. Progenie individual (P1) y doble (P2-1 y P2-2) de una línea S₁ de maíz poliembriónico.

Figure 1. Individual (P1) and double (P2-1 and P2-2) progeny of a S₁ line from poliembrionic corn.

Slightly mixed in vortex and incubated in a water bath at 55 °C for 20 min. Thereafter, it was centrifuged at 10,625 x g for 5 min and 600 µl of the supernatant were added with one volume of chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) (Sigma-Aldrich St Louis MO, USA). Was mixed by gentle inversions for 1-2 min and centrifuged for 10 min at 10 625 x g to recover the aqueous phase to which were added 50 µl of ammonium acetate 7.5 M (Sigma-Aldrich St Louis MO, USA) and 800 µl of cold ethanol (SIGMA-ALDRICH St Louis MO, USA) at 96%. Mixed by gentle inversions and placed in a freezer for 60 min for DNA precipitation. Subsequently it was centrifuged at 10 625 x g for 5 min and the supernatant was discarded.

The pellet obtained was washed twice with ethanol (Sigma-Aldrich St Louis MO, USA) at 70% and finally resuspended in 80 µl of NaOH (Sigma-Aldrich St Louis MO, USA) 8 Mm and stored at -20 °C. The integrity from DNA extracted was assessed through electrophoresis in agarose gel at 1% (w/v) in SB buffer (Sodium Borate 5 mM) for 30 min at 90 V and visualized under UV light by staining with ethidium bromide (0.5 µg⁻¹ml). The quality of DNA extracted was estimated by the absorbance ratio at 260 and 280 nm read in a spectrophotometer Epoch™ (Bio-Tek) and quantified by reading at 320 nm.

por 30 min a 90 V y visualizada bajo luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). La calidad del ADN extraído se estimó mediante la relación de las absorbancias a 260 y 280 nm leídas en un espectrofotómetro Epoch™ (Bio-Tek) y se cuantificó mediante la lectura a 320 nm.

Amplificación y secuenciación de ITS. Para la amplificación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) se emplearon los iniciadores N18L (5'-AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3') (Eldenäs *et al.*, 1998) y C26 A (5'-GTTTCTTTTCCTCCGCT-3') (Oliveira *et al.*, 2007). La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25 μl que contenía: Buffer 1X (Invitrogen, Carlsbad CA), 2 mM MgCl_2 (Invitrogen, Carlsbad CA a), 50 μM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad CA.), 0.8 pmol de iniciador N18L y 0.8 pmol de iniciador C26 A, 2.5 U de *Taq* Platinum (Bioline, London UK); el volumen de ADN se ajustó para alcanzar una concentración de 100 ng. La reacción de amplificación (PCR) se llevó a cabo en un termociclador P x 2 Thermal cycler® con un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 50.3 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min), y por último una extensión final a 72 °C por 5 min.

Los productos de PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer SB (Borato de Sodio 5 mM) por 30 min a 90 V y visualizados bajo luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$). El tamaño de los amplicones se estimó mediante la comparación con un marcador de peso molecular de 100 bp DNA molecular Ladder (Invitrogen Carlsbad CA. USA). Los productos de PCR fueron secuenciados en un equipo Perkin Elmer de Applied Biosystems Modelo 3730 por el método de terminadores fluorescentes (Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing).

Para la secuenciación de las regiones ITS se seleccionaron al azar tres familias S₁ (S3, S5 y S7) y tres PL (PL2, PL4 y PL5), donde se incluyó en cada familia, la planta madre (v.g. S3), una planta individual (proveniente de una sola semilla-v.g. S3P1) y plantas dobles (dos plantas provenientes de una sola semilla, v.g. S3P21 y S3P22), las cuales en el resto del documento serán mencionadas con su clave respectiva.

Análisis de polimorfismo de secuencias. Las secuencias obtenidas se compararon mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de la base de datos del NCBI, optimizando para las secuencias altamente

Amplification and sequencing of ITS. For amplification of ITS region (Internal Transcribed Spacer) N18L primers (5'-AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG'3') (Eldenäs *et al.*, 1998) and C26 A (5'-GTTTCTTTTCCTCCGCT-3') (Oliveira *et al.*, 2007); the amplification was carried out in a volume of 25 μl containing: 1X Buffer (Invitrogen, Carlsbad CA), 2 mM MgCl_2 (Invitrogen, Carlsbad CA a), 50 μM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad CA), 0.8 pmol of primer N18L and 0.8 pmol of primer C26 A, 2.5 U *Taq* Platinum (Bioline, London UK); DNA volume was adjusted to reach a concentration of 100 ng. The amplification reaction (PCR) was conducted on a P x 2 Thermal Cycler with an initial step of denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles (denaturation at 94 °C for 1 min, aligning at 50.3 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min), and finally a final extension at 72 °C for 5 min.

PCR products were resolved in agarose gel 1% (w/v) in SB buffer (Sodium Borate 5 mM) for 30 min at 90 V and visualized under UV light by staining with ethidium bromide ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$). The size of amplicons was estimated through comparison with a molecular weight marker of 100 bp DNA molecular ladder (Invitrogen Carlsbad CA USA). PCR products were sequenced on a Perkin Elmer from Applied Biosystems Model 3730 by the method of fluorescent terminators (Taq Fs Dye Terminator Cycle Sequencing FS Fluorescence-Based Sequencing).

For sequencing of the ITS regions, three families S₁ (S3, S5 and S7) and three PL (PL2, PL4 and PL5) were randomly selected, on each family was included the mother plant (v.g. S3), an individual plant (coming from a single seed-v.g. S3P1) and double plants (two plants from a single seed, v.g. S3P21 and S3P22), which in the rest of the document will be mentioned with their respective key word.

Analysis of polymorphism sequences. The obtained sequences were compared using the Basic Local alignment Search Tool (BLAST) from the NCBI database, optimizing for highly similar sequences to verify that corresponded to the ITS region. Subsequently, the sequences were aligned using the MAFFT v6 program (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>) using pre-set parameters, and the alignment was visualized through the program sequence editor BioEdit v7.13. In these alignments mother and progeny sequences (individual and polyembryonic plants) were compared. For the analysis of polymorphism in nucleotide sequences the DnaSP DNA Sequence Polymorphism program version 5.10.01 (Librado and Rozas, 2009) was used.

similares para verificar que correspondieran a la región ITS. Posteriormente, las secuencias fueron alineadas mediante el programa MAFFT v6 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>) utilizando los parámetros pre-establecidos, y el alineamiento obtenido se visualizó con el editor de secuencias BioEdit v7.13. En estos alineamientos se compararon las secuencias de la madre y su descendencia (plantas individuales y poliembriónicas). Para el análisis de polimorfismo en las secuencias nucleotídicas se utilizó el programa DnaSP DNA Sequence Polymorphism versión 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009).

Resultados y discusión

Poliembrionia en familias PL y S₁

En las progenies de las familias (F₁ de PL y las S₁ de autofecundación) generadas, los porcentajes de germinación fueron superiores al 90%, condición deseable en materiales derivados de una población poliembriónica y más aún en líneas poliembriónicas S₁, debido al proceso de endogamia, que influye para deprimir la expresión fenotípica. Se encontró una frecuencia de plantas PE de entre 55 y 68% (Cuadros 1 y 2) lo cual coincide con las proporciones esperadas en estas poblaciones poliembriónicas del IMM-UAAAN (Espinoza *et al.*, 1998). De hecho, la PE en algunas familias S₁ fue de 100%, lo cual es poco usual en casos previos de la misma condición endogámica (Rebolloza *et al.*, 2011). Esto podría deberse a que el proceso de uniformidad genética que se involucra en autofecundaciones conduce a poner en homocigosis a los genes que influyen en la poliembrionía, pero también a los genes que la obstruyen, lo cual causa la penetrancia incompleta del carácter (Rebolloza *et al.*, 2011).

En este sentido, las familias S₁ presentan una expresión variable y errática de la PE y en muchos casos el porcentaje de PE es inusualmente bajo o alto. En este estudio el rango de porcentajes de PE fue más amplio en las familias S₁ que en las familias PL; los porcentajes de PE observados en estas últimas familias se ajustaron más a los valores típicos de la población de origen UA-IMM-BAP (Espinoza y Vega, 2000). El número de plántulas anormales fue menor que aquellos valores (15-32%) reportados por Rebolloza *et al.* (2011) en poblaciones F₂. Estos autores sugieren que la naturaleza de la poliembrionía produce anomalías en las plántulas, lo cual obstruye su desarrollo.

Results and discussion

Polyembryony in PL and S₁ families

In the progeny from families (F₁ from PL and S₁ from self-fertilization) generated, germination percentages were above 90%, a desirable condition in materials derived from a polyembryonic population and even more in polyembryonic lines S₁, due to the inbreed process, that influences to depress phenotypic expression. A frequency of PE plants between 55 and 68% (Tables 1 and 2) was found, which coincides with the expected ratios in these polyembryonic populations from IMM-UAAAN (Espinoza *et al.*, 1998). In fact, PE in some S₁ families was 100%, which is unusual in previous cases with the same inbreeding condition (Rebolloza *et al.*, 2011). This could be due to the process of genetic uniformity that is involved in self-fertilization, leads to place the genes in homozygous, influencing in polyembryony, but also the genes that obstruct them, causing incomplete penetrance from the trait (Rebolloza *et al.*, 2011).

In this sense, S₁ families show a varying and erratic expression of PE and in many cases the percentage of PE is unusually low or high. In this study the percentage range of PE was wider in S₁ families than in PL families; observed PE rates in the latter families are fit to typical values of the population of origin UA-IMM-BAP (Espinoza and Vega, 2000). The number of abnormal seedlings was lower than those values (15-32%) reported by Rebolloza *et al.* (2011) in F₂ populations. These authors suggest that polyembryony nature produce abnormalities in seedlings, which obstructs their development.

Comparison of nucleotide sequences of ITS regions in S₁ and PL families

Three S₁ (S3, S5 and S7) and three PL (PL2, PL4 and PL5) families were selected, from which plant tissue of the mother plant and their progeny (a plant from one seed and two twin plants from one seed) was taken. After the amplification and sequencing of the ITS region, the similarity of invariable sites (monomorphic), variable sites (polymorphic) and nucleotide diversity among all individuals in the selected families (Table 3) was compared.

The percentage of invariable sites (monomorphic) in PL2 family, generated by PL was found in a range of 78% to 90%, indicating that both sequences from the mother as the progeny have high genetic similarity but are not identical

Cuadro 1. Porcentajes promedio en las 20 familias de polinización libre (PL).
Table 1. Mean percentages in 20 open-pollinated families (PL).

Repetición	Germinación (%)	Poliembrionía (%)	Plántulas anormales (%)	Poliembrionía (mínima)	Poliembrionía (máxima)
I	92 ± 8	55 ± 13	10 ± 6	35	72
II	90 ± 7	61 ± 15	8 ± 5	30	82

Cuadro 2. Porcentaje promedio en las 20 familias S₁.
Table 2. Mean percentage in 20 S₁ families.

Repetición	Germinación (%)	Poliembrionía (%)	Plántulas anormales (%)	Poliembrionía (mínima)	Poliembrionía (máxima)
I	92 ± 7	63 ± 19	12 ± 8	26	88
II	93 ± 7	68 ± 21	9 ± 7	23	100

Comparación de las secuencias nucleotídicas de regiones ITS en familias S₁ y PL

Se seleccionaron tres familias S₁ (S3, S5 y S7) y tres PL (PL2, PL4 y PL5), de las cuales se tomó tejido vegetal de la planta madre y de sus descendientes (una planta proveniente de una semilla y dos plantas gemelas provenientes de una semilla). Después de la amplificación y secuenciación de la región ITS, se comparó la similitud de los sitios invariables (monomórficos), sitios variables (polimórficos) y la diversidad nucleotídica entre todos los individuos de las familias seleccionadas (Cuadro 3).

(Table 3). This could be attributed to that polymorphic sites are given by the complementarity of the genes contributed by the diverse sources of pollinators, adding that the mother is genetically partially homogeneous, since it comes from a family of half siblings, so it can also be a source of variability. Given the reproductive management of PL group where there was no control of pollinators, the origin of male parent was unknown, indicating that the proportion of similarity between DNA sequences from the mother and daughters fit the genetic endowment that through female gamete that the mother gave to each of the daughters.

Cuadro 3. Comparación de secuencias nucleotídicas de las regiones ITS entre los integrantes de las diversas familias PL.
Table 3. Comparison of nucleotide sequences of ITS regions between members of different PL families.

Familia PL 2	S inv (%)	S (%)	G+C (%)	Familia PL 4	S inv (%)	S (%)	G+C (%)	Familia PL 5	S inv (%)	S (%)	G+C (%)
PL2m vs PL2p1	78	22	69	PL4m vs PL4P1	76	24	64	PL5m vs PL5P1	86	14	69
PL2m vs PL2p21	87	13	68	PL4m vs PL4P21	75	25	64	PL5m vs PL5P21	87	13	69
PL2m vs PL2p22	87	13	69	PL4m vs PL4P22	76	24	64	PL5m vs PL5P22	86	14	65
PL2p1 vs PL2p21	87	13	66	PL4P1 vs PL4P21	86	14	66	PL5P1 vs PL5P21	90	10	69
PL2p1 vs PL2p22	90	10	69	PL4P1 vs PL4P22	86	14	65	PL5P1 vs PL5P22	82	18	66
PL2p21 vs PL2p22	90	10	67	PL4P21 vs PL4P22	92	8	66	PL5P21 vs PL5P22	86	14	67

S inv= sitios invariables (monomórficos); S= sitios polimórficos; G+C= proporción del contenido de guanina y citosina; PL2m= explica a la planta madre de la familia de polinización libre 2; PL2p1= cita a la planta individual de la familia de polinización libre 2; PL2p21= explica a la primera de las plantas dobles de la familia de polinización libre 2; PL2p22= se refiere a la segunda de las plantas dobles de la familia de polinización libre 2 y así sucesivamente para las demás familias.

El porcentaje de sitios invariables (monomórficos) en la familia PL2, generada por PL se encontró en un rango de 78% a 90%, indicando que tanto las secuencias de la madre como las de los hijos son de alto parecido genético pero no son idénticas (Cuadro 3). Esto podría atribuirse a que los sitios polimórficos estén dados por la complementariedad de los genes aportados por la variada fuente de polinizadores, aunado a que la madre es genéticamente parcialmente homogénea, ya que proviene de una familia de medios hermanos, por lo que también puede ser fuente de variabilidad. Dado el manejo reproductivo del grupo de PL donde no existió un control de los polinizadores, la procedencia del progenitor masculino fue desconocida, lo que indica que la proporción de similitud entre las secuencias de ADN de la madre e hijas se ajustan a la dotación genética que por la vía de gameto femenino otorgó la madre a cada una de las hijas.

En esta familia se observó que entre los cuatro genotipos (madre y tres hijas) ningún par comparado fue idéntico, aún entre las plantas dobles PE generadas de la misma semilla que, aunque mostraron una similitud de 90%, no fueron idénticas. Estos resultados sugieren que el origen genético de cada una de las plantas doble es diferente, siendo las plantas dobles más parecidas a la planta madre que la planta individual. Por lo tanto, la relación entre la planta hija del tipo individual con las hermanas PE debe ser tal que refleje la diferencia del polen fecundante, por lo que se esperarían diferencias genéticas entre las plantas hermanas. El promedio general de sitios monomórficos para la familia fue 86% con desviación estándar de ± 4.5 . En estas comparaciones se emplearon secuencias con una longitud de 261 a 297 nucleótidos.

Para la familia PL4 y PL5 los porcentajes de similitud fueron de 76 a 92% y de 82 a 90%, respectivamente (Cuadro 3), y se apreció que las plantas PE hermanas provenientes de la misma semilla, en la familia PL4 presentan el parecido más alto; sin embargo, no son idénticas lo que sugiere que los embriones contemporáneos que les dan origen tienen una base genética distinta. Si las plantas gemelas provinieran del mismo embrión deberían ser idénticas (100% de similitud), mientras que cuando tienen origen muy diferente, sea de célula gamética o somática la similitud será menor a 100%. En ambas familias PL4 y PL5 la similitud entre la madre y las plantas hijas (individual y doble) fue igual. Las secuencias de ADN que se compararon en la familia PL4 tuvieron una longitud de 282 a 299 nucleótidos, mientras que las secuencias de ADN que se compararon en la familia PL5 fueron en un rango de 288 a 299 nucleótidos.

In this family was observed that in between the four genotypes (mother and three daughters) no compared pair was identical, even among double PE plants generated from the same seed, although showed a similarity of 90%, were not identical. These results suggest that the genetic origin of each of the double plants is different, double plants being the most similar to mother plant to plant that individual plant. Therefore, the relationship between the daughters plants from the individual type with PE sisters must be such that reflects the difference in fertilizing pollen, so genetic differences between sister plants would be expected. The overall average of monomorphic sites for the family was 86% with a standard deviation of ± 4.5 . In these comparisons, sequences with a length of 261 to 297 nucleotides were used.

For PL4 and PL5 families the similarity percentages were from 76 to 92% and from 82 to 90%, respectively (Table 3), and observed that PE sister plants from the same seed, show the highest resemblance in PL4 family; however, are not identical suggesting that contemporary embryos that gives origin have a different genetic background; if twin plants came from the same embryo plants should be identical (100% similarity), whereas when they have very different origin, whether from a somatic or gametic cell the similarity will be less than 100%. In both PL4 and PL5 families the similarity between mother and daughter plants (individual or double) was equal. DNA sequences were compared in PL4 family that had a length of 282 to 299 nucleotides, while DNA sequences, compared in PL5 family were in the range of 288 to 299 nucleotides.

The group of families from self-fertilization (Table 4), the S₃ family showed invariable sites ranging from 62 to 100% similarity, highlighting that sequence comparison of mother vs a polyembryonic daughter (S3 vs S3P22) showed 100% similarity. This could be explained as: 1) the polyembryonic daughter 2 originated from a somatic cell, probably from the nucellus, which was developed as diploid embryo adventitious, same genotypic nature as the somatic tissue of the mother; or 2) from two PE sister seedlings, the polyembryonic 1 was originated by means of double fertilization (embryo 2n and endosperm 3n) while the polyembryonic daughter 2 originated atypically in the embryo sac, from a non-reduced germinal cell, endowment of 2n, identical to the mother. On the other hand, the comparison of mother- double plant 1 (S3 vs S3P21) showed the lowest value (62%). Similarly as in previous cases, double plants were different.

En el grupo de familias procedente de autofecundaciones (Cuadro 4), la familia S3 presentó sitios invariables que van de 62 a 100% de similitud, resaltando que la comparación de la secuencia madre contra una hija poliembriónica (S3 vs S3P22) presentó 100% de similitud. Esto podría explicarse por: 1) la planta hija poliembriónica 2 se originó de una célula somática, probablemente de la nucela, que se desarrolló como embrión adventicio diploide, de la misma naturaleza genotípica que el tejido somático de la madre; ó 2) de dos plántulas hermanas PE, la poliembriónica 1 se originó por la vía de la doble fecundación (embrión 2n y endospermo3n) mientras que la planta-hija poliembriónica 2 se originó de manera atípica en el saco embrionario, a partir de una célula germinal no-reducida, de dotación 2n, idéntica a la madre. Por otro lado, la comparación madre-planta doble 1 (S3 vs S3P21) presentó el valor más bajo (62%). Igualmente que en los casos anteriores, las plantas dobles fueron diferentes entre sí.

In S5 family the monomorphic sites were found in a range of 85 to 91% (Table 4), where the comparison between double plants sequences showed a higher percentage of polymorphic sites (15%), than comparisons from individual plant sequences with any of the double plants v. g. individual plant with double-1 plant (91%, S5P1 vs S5P21). As in the S3 case, in S7 family there is a consistency in the ratio of similarity, showing 100% similarity between the mother and one of the PE daughters (S7m vs S7P22), while the other PE daughter shows a low proportion of similarity; similarity interval for this family ranged from 72 to 100%.

The recurrent selection made in reproductive management in BAP population has allowed concentrating a high frequency of recessive alleles that determine the manifestation of polyembryony, according to the inheritance model proposed by Rebolloza *et al.* (2011). However, cataloging hitherto PE frequency in a given family, given a generation, has been

Cuadro 4. Comparación de secuencias nucleotídicas de las regiones ITS entre los integrantes de las diversas familias S₁.
Table 4. Comparison of nucleotide sequences of ITS regions between members of different S₁ families.

Familia	S inv	S	G+C	Familia	S inv	S	G+C	Familia	S inv	S	G+C
S3	(%)	(%)	(%)	S5	(%)	(%)	(%)	S7	(%)	(%)	(%)
S3m vs S3P1	90	10	65	S5m vs S5P1	91	9	64	S7m vs S7P1	82	18	68
S3m vs S3P21	63	37	68	S5m vs S5P21	88	12	63	S7m vs S7P21	72	28	67
S3m vs S3P22	100	0	69	S5m vs S5P22	86	14	66	S7m vs S7P22	100	0	69
S3P1 vs S3P21	66	34	64	S5P1 vs S5P21	91	9	64	S7P1 vs S7P21	87	13	65
S3P1 vs S3P22	88	12	66	S5P1 vs S5P22	89	10	65	S7P1 vs S7P22	82	18	68
S3P21 vs S3P22	62	38	67	S5P21 vs S5P22	85	15	66	S7P21 vs S7P22	72	28	69

S inv= sitios invariables (monomórfismos); S= sitios polimórficos; G+C= proporción del contenido de guanina y citosina; S3m= se refiere a la planta madre de la familia de autofecundación 3; S3P1= describe a la planta individual de la familia de autofecundación 3; S3P21= describe a la primera de las plantas dobles de la familia de autofecundación 3; S3P22= se refiere a la segunda de las plantas dobles de la familia de autofecundación 3 y así sucesivamente para las demás familias.

En la familia S5 los sitios monomórficos se encontraron en un intervalo de 85 a 91% (Cuadro 4), en donde la comparación entre las secuencias de las plantas dobles mostró un mayor porcentaje de sitios polimórficos (15%), que las comparaciones de la secuencias de la planta individual con cualquiera de las plantas dobles v. g. planta individual con la planta doble-1 (91%, S5P1 vs S5 P21). Como en el caso S3, en la familia S7 existe una consistencia en la proporción de semejanza presentando una similitud de 100% entre la madre y una de las hijas PE (S7m vs S7P22), mientras que

only phenotypic, since the classification of seed from which germinate two or seven seedlings simultaneously, it is only through a careful and experienced visual observation. So, this is the first study of genomic sequences to determine the identity of polyembryonic plants and one parent. In addition to the manifestation of PE, a lower proportion, although noticeable, from cases of multiple seedlings showing multiple rootlets (Espinoza *et al.*, 2011); whatever the meaning in modifying the seminal root system, polyembryony genes seem to have a pleiotropic effect.

con la otra hija PE sólo presenta una semejanza de baja proporción; el intervalo de similitud para esta familia fluctuó en un rango de 72 a 100%.

La selección recurrente practicada en el manejo reproductivo en la población BAP ha permitido concentrar una alta frecuencia de los alelos recesivos que determinan la manifestación de la poliembriónia, de acuerdo al modelo de herencia propuesto por Rebolloza *et al.* (2011). Sin embargo, la catalogación hasta ahora de la frecuencia de PE en una familia determinada, dada una generación, ha sido solamente fenotípica, ya que la clasificación de las semillas de las que germinan simultáneamente dos y hasta siete plántulas, es sólo por observación visual cuidadosa y experimentada. Así, este es el primer estudio de las secuencias genómicas para determinar la identidad entre plantas poliembriónicas y uno de sus progenitores. Adicionalmente a la manifestación de la PE, una proporción menor, aunque notable, de casos de plántulas múltiples presentan también radículas múltiples (Espinoza *et al.*, 2011). Cualquiera que fuera el significado en la modificación del sistema radical seminal, los genes de la poliembriónia parecieran tener un efecto pleiotrópico.

La propuesta de Erldeska (1996) sobre el origen de semillas poliembriónicas en maíz incluye la formación de gemelos o tripletes a partir de una célula huevo pro-embriónica, originados por la división de la célula huevo de manera espontánea o después de alguna inducción, los cuales comparten un suspensor común, parte del escutelo y capas superficiales de radícula. Por ello, los embriones germinan con plúmulas separadas pero con un solo complejo radicular, lo que sugiere que las plantas gemelas serían genéticamente idénticas. Aunque este tipo de origen es uno entre varios de los que se han observado fenotípicamente en la población BAP (Espinoza *et al.*, 1998; Espinoza *et al.*, 2008; Espinoza *et al.*, 2012), en este estudio en ningunas de las familias se pudo comprobar que las plantas gemelas fueran idénticas en sus secuencias nucleotídicas.

El otro tipo de origen son los casos de gemelos o tripletes que provienen de células huevo individual del saco embrionario o de células con capacidades multi-huevo que están estrechamente adheridas, pero separados por capas epidérmicas, con un endospermo en común; las plúmulas y radículas son independientes. En poca proporción, este tipo de surgimiento de plántulas se puede ver en las poblaciones poliembriónicas en estudio. Esta hipótesis tiene más relación con los resultados de las comparaciones

The proposal from Erldeska (1996) on the origin of polyembryonic seeds in corn includes the formation of twins or triplets from a pro-embryonic egg cell, originated by a spontaneous division of the egg cell or after some induction, which share a common suspensor, part of scutellum and surface layer of radicle. Therefore, embryos germinate with separate plumules but with only one root complex, suggesting that twin plants would be genetically identical. Although this type of origin is one among several that have been observed phenotypically in BAP population (Espinoza *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2012), in this study in none of the families was able to confirm that twin plants were identical in their nucleotide sequences.

The other type of origin are twins or triplets cases that come from single egg cells of the embryo sac or cells with multi-egg capabilities that are tightly attached, but separated by epidermal layers, with an endosperm in common; the plumules and rootlets are independent. In small proportion, this type of seedling emergence can be seen in polyembryonic populations under study. This hypothesis is more related with the results obtained from the comparisons of nucleotide sequences in this work. Also PE can originate through twin embryos from multi-embryo sacs which are commonly located on opposite sides, or at distance in the grain, which lack of common tissue and germinate independently. It is very unlikely to find this type of origin in polyembryonic populations under investigation but exist, in very low proportions. Moreover, it has been reported that polymorphism levels increases as GC content increases, at least in short genomic sequences.

Sachidanandam *et al.* (2001) reported that GC content between 45-55% has a positive correlation with nucleotide diversity. However, in this study a negative correlation of -0.52 ($p < 0.05$) was found between GC content and nucleotide diversity in PL families, with a GC content between 64 and 69%. In S₁ families was not found significant correlations between the variables described above, even though GC content was very similar to PL families (63 to 69%).

Conclusions

In the assessed polyembryonic corn populations was corroborated through sequence analysis of the ITS region that in some cases the sequence of a double seedling (two

de secuencias nucleotídicas obtenidos en el presente trabajo. También la PE puede originarse por embriones gemelos de sacos multi-embriónicos que comúnmente están ubicados en lados opuestos, o a distancia en el grano, los cuales carecen de tejidos comunes y germinan independientemente. Es poco común encontrar este tipo de origen en las poblaciones poliembriónicas bajo investigación pero existen, en proporciones muy bajas. Por otra parte, se ha reportado que los niveles de polimorfismo se incrementan a medida que el contenido de GC aumenta, al menos en secuencias genómicas cortas.

Sachidanandam *et al.* (2001) reportaron que contenidos de GC entre 45 a 55% tienen una correlación positiva con la diversidad nucleotídica. Sin embargo, en este estudio se encontró una correlación negativa de -0.52 ($p < 0.05$) entre el contenido de GC y la diversidad nucleotídica en las familias PL, con un contenido de GC entre 64 y 69%. En las familias S₁ no se apreció una correlación estadísticamente significativa entre las variables antes descritas, a pesar de que el contenido de GC fue muy similar al de las familias PL (63 a 69%).

Conclusiones

En la población de maíz poliembriónico evaluada se comprobó mediante el análisis de secuencias de la región ITS que, en algunos casos, la secuencia de una plántula doble (dos plantas provenientes de una sola semilla) tenían 100% de similitud a la planta madre. Por otra parte, también se apreció que plantas dobles (provenientes de una sola semilla) no necesariamente tienen el mismo origen, dado que difieren en su secuencia ITS. En algunas familias una de las plantas dobles, mostró mayor similitud con la planta individual (provenientes de una sola semilla) que con su planta gemela.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Universidad autónoma Agraria Antonio Narro y la Universidad Autónoma de Coahuila. M A S, A G L, y A C F G agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico proporcionado en forma de beca para sus estudios de postgrado.

plants from a single seed) had 100% similarity to mother plant. Moreover, it was also observed that double plants (from a single seed) not necessarily have the same origin, since they differ in their ITS sequence. In some families one of the double plants showed greater similarity with individual plant (from a single seed) with its twin plant.

End of the English version



Literatura citada

- Ausubel, T. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. and Struhl, K. 1992. Short protocols in molecular biology (a compendium of methods from current protocols in molecular biology). Section II: electrophoretic separation of proteins. Second Edition. John Wiley & Sons. 917 p.
- Baldwin, B. G.; Sanderson, M. J.; Porter, J. M.; Wojciechowski, M. F.; Campbell, C. S. and Donoghue, M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Garden.* 82:247-277.
- Bhojwani, S. and Bhatnagar, S. 1974. The embryology of angiosperms. Vikas Publishing House PVT LTD. India. 355 p.
- Castro, G. M. E. 1979. Estudio sobre herencias y valores nutritivos de semillas con doble embrión, Avances de investigación en maíz. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Buenavista. Coahuila. México. 24-25 pp.
- CETENAL (Centro de Estudios del Territorio Nacional). 1975. Carta topográfica G14C33, escala 1:50 000. Saltillo, Coahuila. Secretaría de Programación y Presupuesto (SPP) del Gobierno Federal de los Estados Unidos Mexicanos. México, D. F. 1 p.
- Eldenas, P.; Anderberg, A. A. and Kallersjö, M. 1998. Molecular phylogenetics of the tribe Inuleae s. str. (Asteraceae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Plant System. Evol.* 210:159-173.
- Erdelska, O. 1996. Polyembryony in maize-histological analysis. *Acta Soc. Bot. Pol.* 65:123-125.
- Erdelska, O. and Vidovencova, Z. 1992. Cleavage polyembryony in maize. *Sex. Plant Reprod.* 5:224-226.
- Espinoza, J.; Vega, M. C.; Navarro, E. y Burciaga, G. 1998. Poliembriónia en maíces de porte normal y enano. *Agron. Mesoam.* 9(2):83-88.
- Espinoza, V. J. y Vega, S. M. C. 2000. Maíces de alta frecuencia poliembriónica. *In:* Zavala, G. F.; Ortega, P. R.; Mejía, C. J. A.; Benítez, R. I. y Guillén, A. H. (Eds.). *In:* Memorias del XVIII Congreso Nacional de Fitogenética: notas científicas. SOMEFI. Chapingo, México. 4 p.
- Espinoza, V. y de León, H. 2005. Apomixis, ¿un fenómeno en proceso de adopción natural en maíz? *In:* Valdez, R. J. 2005. Resultados de proyectos de investigación 2004. 245-252 pp. Dirección de investigación, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 245-252 pp.

- Espinoza, V. J. L.; Valdéz- L. V. M.; González, V. N.; Musitó, R.; Gallegos, S. J. E; Villarreal, C. J. A. y Alcalá, R. M. 2008. Estudios genéticos sobre la poliembriónia en maíz. Análisis retrospectivo. *In*: Libro científico anual de ganadería, agricultura y ciencia forestal “resultados de investigación 2006”. Universidad autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 5-11 pp.
- Espinoza, V.J.; Valdés, R. J. y Alcalá, R. J. 2012. Morfología y anatomía de radículas múltiples en plántulas de maíz derivadas de cariopsis con poliembriónia. *Polibotánica*. 33(1):207-221.
- González, V. V. M.; Espinoza, V. J.; Mendoza, V. R.; De León, C. H. y Torres T. M. A. 2011. Caracterización de germoplasma de maíz que combina alto contenido de aceite y poliembriónia. *Universidad y Ciencia*. 27(2):1-11.
- Kempton, J. H. 1913. Floral abnormalities in maize. *Bull. U.S. Bur. Pl. Ind.* Núm. 278.
- Kieselbach, T. A. 1926. False polyembryony in maize. *Am. J. Bot.* 13:33-36.
- Leblanc, O.; Grimanelli, D.; Islam-Faridi, N.; Berthaud, J. and Savidan, Y. 1996. Reproductive behavior in maize-tripsacum polyhaploid plants: implications for the transfer of apomixis into maize. *J. Heredity*. 87:108-111.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Oliveira, L. O.; Huck, R. B.; Gitzendanner, M. A.; Judd, W. S.; Soltis, D. E. and Soltis, P. S. 2007. Molecular phylogeny, biogeography, and systematics of *Dicerandra* (Lamiaceae), a genus endemic to the Southeastern United States. *Am. J. Bot.* 94(6):1017-1027.
- Pilu, R. 2000. The twin trait in maize. *Maize Genetics Corporation Newsletter*. 74:51.
- Randolph, L. F. 1936. Developmental morphology of the caryopsis in maize. *J. Agric. Res.* 53:881-916.
- Rebolloza, H. H.; Espinoza, V. J.; Sámano, G. D. y Zamora, V. V. M. 2011. Herencia de la poliembriónia en dos poblaciones experimentales de maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* 34(1):27-33.
- Skovsted, A. 1939. Cytological studies in twin plants. *Comp. Rend. Lab. Carlsberg (Copenhagen)*. Ser. Phys. 22:427-446.
- Weatherwax, P. 1921. Anomalies in maize and its relatives-I. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 48(9):253-255.
- Webber, J. M. 1940. Polyembryony, *Botany Review*. 6(11):575-598.
- Weingartner, U.; Kaeser, O.; Long, M. and Stamp, P. 2002. Combining cytoplasmic male sterility and xenia increases grain yield of maize hybrids. *Crop Sci.* 42:1848-1856.