

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



“Megagametogénesis, fecundación, formación del cigoto y desarrollo temprano del embrión de *Agave tequilana* Weber var. Azul”

Tesis

que para obtener el título de licenciada en Biología

P R E S E N T A

Alejandra Guillermina González Gutiérrez

Director: Dr. Benjamín Rodríguez Garay

Asesora: Dra. Ana Lilia Viguera Guzmán

Zapopan, Jalisco, febrero de 2013.



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD. BIOL. 236/2012

C. ALEJANDRA GUILLERMINA GONZÁLEZ GUTIÉRREZ
PRESENTE

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción: **TESIS**, con el título "**Megagametogénesis, fecundación, formación del cigoto y desarrollo temprano del embrión del Agave tequilana Weber var. Azul**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director(a) de dicho trabajo al **Dr. Benjamín Rodríguez Garay**, y como asesor a la **Dra. Ana Lilia Viguera Guzmán**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 30 de noviembre, del 2012

DRA. TERESA DE JESUS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIATURA EN BIOLÓGICA

M.C. VERÓNICA PALOMERA AVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias
Presidente del Comité de Titulación
Licenciatura en Biología
CUCBA
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de tesis e informes, opción Tesis con el título "**Megagametogénesis, fecundación, formación del cigoto y desarrollo temprano del embrión del *Agave tequilana* Weber var. Azul**" que realizó la pasante Alejandra Guillermina González Gutiérrez con número de código 302190982 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
Las Agujas, Zapopan, Jal. 09 de enero, del 2013

Firma
Dr. Benjamín Rodríguez Garay

Firma 
Dra. Ana Lilia Viguera Guzmán

Nombre completo de los Guacajatos asignados por el Comité de Titulación

Firma de aprobación

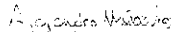
Fecha de aprobación

Dr. Liberato Portillo Martínez



09 enero 2013

Dr. Alejandro Muñoz Urias



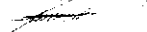
09 enero 2013

Dr. Carlos Ramirez Serrano

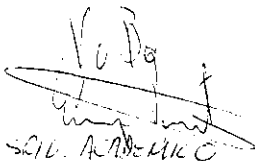


09 enero 2013

Supl. Dra. Ana Lilia Viguera Guzmán



09 enero 2013


SOL. A. ABELEUCO

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

“Hay dos formas de ver la vida: una es creer que no existen milagros, la otra es creer que todo es un milagro”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guadalajara por haberme dado cobijo y por las lecciones que aprendí en ella, asimismo, por haberme dado su voto de confianza y por todo el apoyo otorgado a lo largo de mi formación profesional.

A mi director de tesis, el Dr. Benjamín Rodríguez Garay por su paciencia, apoyo y confianza en mi trabajo. Gracias por sus consejos personales y académicos.

Un agradecimiento especial a mi asesora y maestra la Dra. Ana Lilia Viguera Guzmán por su invaluable apoyo y confianza.

A mis sinodales: Dr. Alejandro Muñoz Urias, Dr. Liberato Portillo Martínez y Dr. Carlos Ramírez Serrano por sus valiosas sugerencias. Gracias por todo su tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

DEDICATORIAS

Hay una gran cantidad de personas que, sin quererlo y tal vez sin imaginárselo, han contribuido de una u otra forma a la realización de este trabajo; a quienes me acompañan a lo largo de la empresa que pone fin a esta etapa de mi formación profesional:

Gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
RESUMEN	II
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. ANGIOSPERMAS.....	2
2.1.1. Características generales de las Angiospermas (División Magnoliophyta).....	2
2.1.2. Formación de los gametos en Angiospermas.....	2
2.1.2.1. Formación del polen.....	3
2.1.2.2. Formación del saco embrionario (tipo Polygonum).....	3
2.1.3. Reproducción sexual en angiospermas: la doble fecundación.....	5
2.1.4. Cigoto y desarrollo temprano del embrión.....	6
2.2. AGAVE.....	7
2.2.1. El orden Asparagales.....	7
2.2.2. El género <i>Agave</i>	7
2.2.3. <i>Agave tequilana</i>	8
3. ANTECEDENTES.....	11
3.1. DESARROLLO DEL GAMETÓFITO FEMENINO EN ESPECIES DENTRO DEL ORDEN ASPARAGALES	11
3.2. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DEL GAMETÓFITO FEMENINO EN ANGIOSPERMAS.....	11
4. HIPÓTESIS.....	13
5. OBJETIVOS	14
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	14
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
6. JUSTIFICACIÓN.....	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS	16

7.1. MATERIAL VEGETAL.....	16
7.3. PREPARACIÓN DE FLORES EN ANTESIS.....	17
7.4. VIABILIDAD DEL POLEN PARA LA POLINIZACIÓN.....	17
7.5. POLINIZACIÓN DE FLORES Y EXTRACCIÓN DE OVARIOS.....	17
7.6. TINCIÓN Y CLARIFICACIÓN DE LOS ÓVULOS.....	18
7.7. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LOS ÓVULOS.....	18
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
8.1. BOTONES FLORALES.....	21
8.1.1. Final de la megasporogénesis.....	21
8.1.2. Megagametogénesis.....	23
8.2. FLORES CON ESTIGMAS RECEPTIVOS (MOMENTO 0).....	28
8.2.1. Formación y caracterización del saco embrionario maduro.....	28
8.2.1.1. Antípodas.....	30
8.2.1.2. Núcleos polares.....	30
8.2.1.3. Aparato ovular.....	32
8.3. SEGUNDO DÍA DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN.....	34
8.3.1. Célula central: cariogamia de los núcleos polares.....	34
8.4. TERCERO Y CUARTO DÍA DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN.....	36
8.4.1. El proceso de la doble fecundación.....	36
8.5. QUINTO DÍA DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN.....	39
8.5.1. Formación del cigoto y el endospermo.....	39
8.6. SEXTO DÍA DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN.....	41
8.6.1. Caracterización del saco embrionario post-fecundación.....	41
8.6.2. Alargamiento del cigoto.....	41
8.7. OCTAVO DÍA DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN.....	43
8.7.1. Desarrollo temprano del embrión (primera división del cigoto).....	43
8.8. NOVENO DÍA DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN.....	44
9. CONCLUSIONES.....	45
10. PERSPECTIVAS.....	46
11. LITERATURA CITADA.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Saco embrionario maduro tipo Polygonum.....	4
Figura 2. Esquema que comprende las partes que forman el carpelo y la trayectoria que recorre el tubo polínico hacia el saco embrionario.....	6
Figura 3. Flor de <i>Agave tequilana</i>	10
Figura 4. Mantenimiento de paniculas con flores de <i>Agave tequilana</i> en laboratorio.....	16
Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología para el muestreo y el estudio microscópico del desarrollo del megagametofito de <i>Agave tequilana</i>	19
Figura 6. Final de la megasporogénesis.....	22
Figura 7. Megaspóra funcional.....	24
Figura 8. Primer división mitótica del saco embrionario.....	26
Figura 9. Segunda división mitótica del saco embrionario.....	27
Figura 10. Organización y dimensiones promedio del saco embrionario maduro.....	29
Figura 11. Núcleos polares.....	31
Figura 12. Célula huevo.....	33
Figura 13. Núcleo de la célula central.....	35
Figura 14. Proceso de doble fecundación.....	37
Figura 15. Proceso de doble fecundación.....	38
Figura 16. Cigoto.....	40
Figura 17. Saco embrionario 6 DDP.....	42
Figura 18. Cigoto 6 DDP.....	42
Figura 19. Primera división del cigoto.....	43
Figura 20. Semilla inmadura de <i>Agave tequilana</i> a 8DDP.....	44

RESUMEN

El *Agave tequilana* Weber var. Azul es una planta comercial de gran importancia económica, ya que es utilizada como materia prima para la producción del tequila. Su cultivo se ha realizado tradicionalmente a través de la reproducción asexual, lo que ha derivado en la reducción de la variabilidad genética y lo ha vuelto vulnerable a diversos tipos de estrés bióticos y abióticos. La realización sistemática de hibridaciones permitiría obtener variación en la población, sin embargo, debido al largo ciclo de vida de la planta (6 a 12 años) y a la práctica de remover la inflorescencia en las plantaciones comerciales, la información disponible respecto a la fisiología y genética de su reproducción es escasa. El objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización del proceso de formación del saco embrionario, el proceso de fecundación, formación del cigoto y el desarrollo temprano del embrión de *A. tequilana* Weber var. Azul mediante la adaptación de una técnica de clarificación-tinción que permita el análisis de un gran número de muestras, en un periodo de tiempo corto, sin que los tejidos analizados sean alterados.

Se analizó un total de 5,000 óvulos tomados a partir de botones florales, flores en anthesis y flores polinizadas. El desarrollo del saco embrionario de *A. tequilana* sigue de manera general el patrón monospórico del tipo "*Polygonum*". Se observó por primera vez el proceso de doble fecundación en esta especie así como la formación del cigoto y el embrión en *A. tequilana*. Los resultados obtenidos permiten conocer los aspectos básicos de los patrones de desarrollo embrionario del agave y su fecundación. Esto permite abrir nuevas vías de investigación básica y aplicada en las áreas de la biología del desarrollo y reproducción. Además esta información puede ser usada directamente en programas de mejoramiento genético brindando herramientas para la fecundación *in vitro*, obtención de líneas homocigotas e hibridaciones intra e intergenéricas.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Agave* es uno de los grupos de plantas más reconocidos por los mexicanos y uno de los que más identifican a México en todo el mundo. Dentro de este grupo se encuentra *Agave tequilana* Weber var. Azul, la cual es una variedad comercial importante a nivel económico, social y comercial ya que es utilizada para la producción del tequila (Rodríguez-Garay y col., 2004).

Desde 1995 el cultivo de agave se ha posicionado como uno de los cultivos más importantes, principalmente en el estado de Jalisco, debido a la creciente demanda de tequila derivada de la Denominación de Origen Tequila, la promoción en los mercados internacionales por el Consejo Regulador del Tequila (CRT) y el aumento en el número de empresas productoras (CRT, 2000).

Por más de 200 años, *A. tequilana* ha sido propagado asexualmente, lo que ha permitido seleccionar y mantener a través del tiempo plantas con características deseables como precocidad, poco contenido de fibra y mayor cantidad de azúcares. Sin embargo, este tipo de propagación tiene como consecuencia la reducción de la variabilidad genética y por lo tanto una alta vulnerabilidad a diversos tipos de estrés biótico y abiótico. Una manera de obtener variación en la población y el mejoramiento genético de plantas de agave, es mediante la práctica sistemática de hibridaciones, sin embargo, la investigación realizada con respecto a la fisiología y genética de su reproducción es escasa, debido principalmente al largo ciclo de vida de la planta (6 a 12 años), al difícil acceso a sus flores y a la práctica de remover la inflorescencia en las plantaciones comerciales para mantener las reservas de azúcares para el proceso de fermentación (Escobar-Guzmán y col., 2008).

En este sentido, resulta necesario el establecimiento de técnicas sencillas que permitan el estudio de la biología reproductiva en particular los patrones de desarrollo de los embriones del agave y su fecundación, lo cual puede abrir nuevas vías de investigación básica y aplicada en las áreas de la biología del desarrollo y reproducción, además de brindar conocimiento y herramientas para su manipulación genética.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ANGIOSPERMAS

2.1.1. Características generales de las Angiospermas (División Magnoliophyta)

Las angiospermas (plantas con flores) son uno de los principales grupos de plantas con semillas y posiblemente el más abundante y diverso del planeta, del cual se han descrito al menos 260.000 especies vivientes clasificadas en 415 familias (APG III, 2009).

Este tipo de plantas están altamente diversificadas en cuanto a su morfología vegetativa y reproductiva, tamaño, organización del genoma y ocupan una gran diversidad de ecosistemas; además son cruciales para la existencia humana, ya que la gran mayoría de los cultivos en el mundo son angiospermas, los cuales, son fuente de alimentos, fibras naturales, medicamentos y obtención de madera entre muchos otros productos útiles para el hombre (Soltis y Soltis, 2004; Soltis y col., 2004).

La principal característica que define a este grupo es el poseer semillas contenidas o encerradas dentro de un fruto el cual deriva del ovario de la flor. La flor está formada principalmente de tejidos esporofíticos y por los gametófitos tanto el femenino como el masculino (Li y Ma, 2002).

2.1.2. Formación de los gametos en Angiospermas

El ciclo de vida de las angiospermas presenta alternancia de generaciones y se divide en dos fases, una fase esporofítica dominante (diploide) y una fase gametofítica (haploide) (Haig, 1990; Rodríguez-Garay y col., 2000; Fan y col., 2008; Ma y Sundaresan, 2010). En comparación con el esporófito, las funciones del gametófito son más cortas y relativamente menos complejas, su función principal se centra en producir gametos haploides ya sean masculinos o femeninos (Reiser y Fischer, 1993; Yadegari y Drews, 2004; Fan y col., 2008).

2.1.2.1. Formación del polen

Los estambres forman en su conjunto el órgano sexual masculino o androceo. El desarrollo temprano del gametofito masculino (microsporogenesis) se lleva a cabo dentro de las anteras (Mascarenhas, 1989), las cuales están situadas generalmente en el extremo de un filamento delgado y en el interior de éstas se encuentran los sacos polínicos o microesporangios. Aquí, se produce el arqueosporio consistente en un tejido esporógeno que por mitosis y citocinesis genera las células madres del polen, cada una de las cuales se divide meióticamente para formar una tétrada de células llamadas microsporas (haploides) (Bedinger, 1992). Cada uno de los componentes de la tétrada se encuentran unidos por una pared de calosa, las microsporas incrementan rápidamente en volumen, y finalmente la calosa es degradada por medio de la actividad de la enzima calasa lo que las libera de la tétrada para madurar cada una como un grano de polen (Bedinger, 1992; Honys y col., 2006, Li y Ma, 2002).

El polen es una estructura bicelular: la mitosis del polen (seguida de una citocinesis) genera dos células hijas con estructuras completamente diferentes, una célula vegetativa y una germinativa este proceso es llamado como microgametogénesis: la célula generativa posee un núcleo bien condensado y una cantidad reducida de citoplasma en comparación con la célula vegetativa. Durante la fecundación, la célula vegetativa es la encargada de la formación y crecimiento del tubo polínico mientras que la germinativa sufre una segunda división mitótica para formar los núcleos espermáticos que poseen la capacidad de fecundar uno a la célula huevo del gametófito femenino y otro al núcleo de la célula central (Mc Cormick, 1993, 2004).

2.1.2.2. Formación del saco embrionario (tipo *Polygonum*)

El gametófito femenino llamado también megagametófito o saco embrionario se desarrolla dentro del carpelo que se conforma de tres elementos: el ovario, el estilo y el estigma (Fig. 2). El ovario puede contener uno o varios óvulos los que a su vez contienen al saco embrionario. Cada óvulo está unido al ovario por el funículo y se encuentra recubierto o protegido por dos capas celulares denominadas tegumentos que lo rodean parcialmente dejando libre la región micropilar y en su interior se encuentra una masa de tejido compacto llamada nucela (Gutiérrez-Mora y col., 2012).

Cada óvulo contiene una sola célula madre de la megaspora, la cual después de dos divisiones meióticas forma una tétrada de megasporas, generalmente tres de ellas degeneran, mientras que la célula más cercana a la calaza permanece y se convierte en la megaspora funcional la cual después de tres divisiones mitóticas sin citocinesis formarán el saco embrionario maduro (Chasan y Walbot, 1993; Li y Ma, 2002).

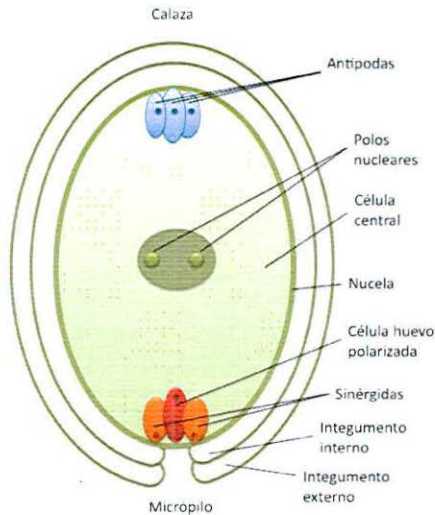


Figura 1. Saco embrionario maduro tipo *Polygonum*. Modificado de Gutiérrez-Mora y col. (2012).

El saco embrionario puede presentar diversos patrones de desarrollo, sin embargo, el más común consiste de cuatro tipos celulares, arreglados de la siguiente forma: tres células antípodales (en el extremo calazal), una célula central formada por los dos núcleos polares (que generalmente migran hacia el centro del saco), dos células sinérgidas y la célula huevo (localizadas en extremo micropilar) (Fig. 1) (Maheshwari, 1937; Dresselhaus, 2006; Kägi y Groß-Hardt, 2007; Sundaresan y Alandete-Saez, 2010; Yang y col., 2010). Este tipo de desarrollo del saco embrionario es conocido como tipo “*Polygonum*,” ya que fue en la especie

Polygonum divaricatum donde el modelo fue descrito por primera vez (Maheshwari, 1937). Este modelo de desarrollo está presente en más del 70% de las especies de angiospermas incluyendo *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* (Russell, 1978; Webb y Gunning, 1990).

2.1.3. Reproducción sexual en angiospermas: la doble fecundación

Durante la reproducción sexual de las angiospermas, mediante el proceso de polinización (vía polinización cruzada o autopolinización), el grano de polen es transferido desde la antera hasta el estigma donde germina mediante rehidratación y forma el tubo polínico (Yadegari y Drews, 2004; Boavida y col., 2005), el cual viaja largas distancias dirigido primeramente por las señales emitidas por el esporófito y luego por el gametófito femenino (Wetering y Russell, 2004) hasta llegar al micrópilo del óvulo en el ovario (Fig. 2) donde se guía por las señales generadas por las células sinérgidas mediante elevadas concentraciones de calcio (Tian y Russell, 1997). Al llegar al saco embrionario, el tubo polínico detiene su crecimiento y la punta del mismo se rompe para liberar las células espermáticas que son descargadas dentro de una de las sinérgidas a través del aparato filiforme (Higashiyama y col., 2000; Yadegari y Drews, 2004). Dos agregados de actina llamados "coronas" son formadas, una en las cercanías del núcleo de la célula huevo y la otra en la interfase de la célula huevo y el núcleo de la célula central; estas coronas parecen estar involucradas en el movimiento de los núcleos espermáticos (los cuales no poseen motilidad propia) a través del saco embrionario (Huang y col., 1993; Huang y Russell, 1994; Russell, 1993; Russell, 1996; Ye y col., 2002; Weterings y Russell, 2004). Uno de los núcleos espermáticos fecunda a la célula huevo para dar origen al cigoto (diploide) que posteriormente dará origen al embrión, mientras que el segundo núcleo espermático se fusiona con los núcleos polares de la célula central para dar lugar a la célula madre del endospermo (triploide) que posteriormente formará el endospermo de la semilla (Berger y col., 2008), el cual actúa como un elemento nutritivo y de protección para el embrión (Dumas y Rogowsky, 2008). Este proceso donde un núcleo espermático se une al núcleo de la célula central y el otro al núcleo de la célula huevo es conocido como "doble fecundación" y fue descubierto y descrito por primera vez de manera independiente por dos investigadores, Sergius Nawashin (1898) en Rusia en las especies *Lilium martagon* y *Fritillaria tenella* y por León Guignard (1899) en Francia con sus estudios en *L. martagon* y *L.*

pyrenaicum, este proceso se considera característico de las angiospermas (Russell, 1993; Li y Ma, 2002; Dumas y Rogowsky, 2008).

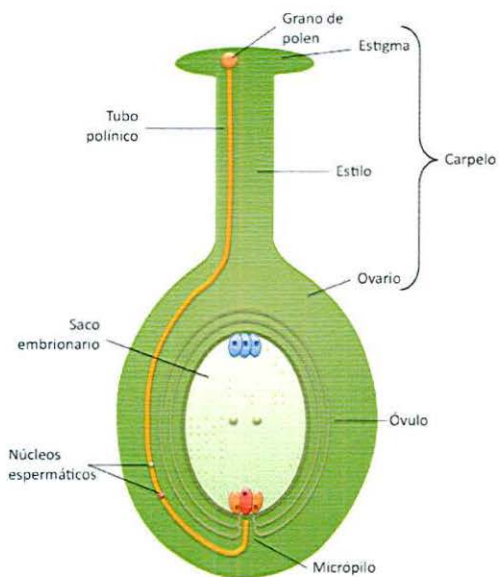


Figura 2. Esquema que comprende las partes que forman el carpelo y la trayectoria que recorre el tubo polínico hacia el saco embrionario. Modificado de Gutiérrez-Mora y col. (2012).

2.1.4. Cigoto y desarrollo temprano del embrión

Se llama desarrollo temprano al conjunto de eventos que suceden desde la fecundación de la célula central y la célula huevo por los núcleos espermáticos hasta la formación de los dos órganos multicelulares altamente diferenciados con planos corporales elaborados, es decir, el embrión y el endospermo (Dumas y Rogowsky, 2008). El plano corporal básico de la planta es establecido desde el cigoto durante la embriogénesis (Lau y col., 2012).

En las plantas con flor, el cigoto es el resultado de la fusión de la célula huevo con uno de los núcleos espermáticos. Al igual que la célula huevo, el cigoto está usualmente polarizado con respecto a la posición relativa de su núcleo y vacuola (Dumas y Rogowsky, 2008; Lau y col., 2012), se alarga en el sentido apical-basal y se divide simétrica o asimétricamente dependiendo de la especie, generando dos células hijas, una célula apical y una célula basal (Sivaramakrishna, 1978; Yeung y Meinke, 1993). La célula más pequeña (apical) generará al embrión mediante una serie de divisiones en diferentes planos, mientras que la más grande y alargada (la célula basal) continuará dividiéndose de manera horizontal dando lugar al suspensor extra-embriionario, el cual conecta al embrión con el tejido materno (Mansfield y Briarty 1991; 1994; Rao, 1996; Toonen y de Vries, 1996; Gutiérrez-Mora y col., 2004); solo la célula superior del linaje basal, la hipófisis será incorporada en el plano del embrión dando lugar al meristemo radicular (Dolan y col., 1993).

2.2. AGAVE

2.2.1. El orden Asparagales

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

2.2.2. El género *Agave*

El género *Agave* pertenece a la familia Agavaceae la cual a su vez forma parte del orden Asparagales y está dividida en dos subfamilias (Agavoideae y Yuccoideae)

constituidas por nueve géneros y 303 especies endémicas de América (García-Mendoza, 2004). Este género se distribuye desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta Colombia y Venezuela, cabe remarcar que alrededor del 75% de todas las especies conocidas son nativas de México (Eguiarte y col., 2000; García-Mendoza, 2002), por lo cual se considera este país el centro de origen con la mayor parte de la riqueza y diversidad genética. En este género, se incluyen 166 especies (*sensu stricto*), siendo el mayor de la familia Agavaceae; este género es parafilético a los géneros *Manfreda*, *Prochnyantes* y *Polianthes* que constituyen un clado de 208 especies que es llamado *Agave (sensu lato)* (Good-Avila y col., 2006).

Desde la época prehispánica, muchas especies de este género han sido importantes elementos culturales y económicos en México, donde han sido utilizados como alimentos, bebidas, medicamentos, combustibles, plantas ornamentales (García-Mendoza, 2004) y principalmente en la producción de diferentes tipos de bebidas alcohólicas como el tequila y el mezcal (Vázquez-García y Cházaro, 2007; Narváez-Zapata y Sánchez-Teyer, 2009).

El género *Agave* se divide taxonómicamente en dos subgéneros *Littaea* y *Agave*, según el tipo de inflorescencia ya sea con forma de espiga o racimo para el primero y aquellas con inflorescencia ramificada o paniculada para el segundo (Gentry, 1982). Son plantas herbáceas que forman una gran roseta de hojas gruesas y carnosas, generalmente terminadas en una afilada aguja en el ápice y, a menudo, también con márgenes espinosos. El robusto tallo leñoso suele ser muy corto, por lo que las hojas aparentan surgir de la raíz (CRT, 2004; Rodríguez-Garay y col., 2004).

La mayoría de las plantas son monocárpicas, es decir que tienen un solo evento reproductivo después del cual mueren, por lo que la planta depende de la eficiencia de los polinizadores para su éxito reproductivo, sin embargo, existen también plantas perennes (Rodríguez-Garay y col., 2004).

2.2.3. *Agave tequilana*

El *Agave tequilana* Weber var. Azul, también conocido como agave tequilero debe su nombre a la región donde comenzó a producirse y al naturalista alemán Franz Weber, quien a finales del siglo XVIII tras casi siete años de estudio seleccionó las plantas más adecuadas para la producción de tequila y lo tipificó como *A. tequilana*

(Macías-Macías, 2001). Pertenecen al subgénero *Agave* y a la sección *Rigidae*, a la cual también pertenecen una gran cantidad de especies mezcleras y productoras de fibra que se extienden desde México hasta Centroamérica. Este grupo es reconocible por la forma de sus hojas angostas y muy rígidas (Gentry, 1982).

Las plantas de *A. tequilana* presentan hojas lanceoladas de color azul-verdoso, delgadas y casi planas, de aproximadamente 1.25 m de largo por 8 a 10 cm de ancho; la espina terminal es de color rojo oscuro de 2 cm. Los dientes son rojizos, triangulares, de 3 a 4 mm y separados a una distancia de 1 a 1.5 cm y el margen que los une es ligeramente de color blanco. Esta especie posee una característica pigmentación color azul, que le permite diferenciarse de las demás especies presentes en la región, todo lo cual lo caracteriza para ser la única materia prima del tequila y debe ser cultivado en la región de la DOT (Denominación de Origen Tequila) (CRT, 2004; DOF, 2012).

Su reproducción se puede dar de manera asexual o de manera sexual mediante semilla. La asexual se suele dar mediante bulbillos, (pequeñas plántulas que se generan de la inflorescencia) o más comúnmente mediante vástagos o "hijuelos" (que emergen de rizomas de la planta madre, y que crecen cerca de la base de la roseta) (Rodríguez-Garay y col., 2004). Los individuos obtenidos mediante este tipo de reproducción constituyen un clon (Ramírez y del Real-Laborde, 2007) y estos clones, son generalmente similares genéticamente a la planta madre (Díaz-Martínez y col., 2012).

En el ciclo sexual se realiza la propagación por semilla para obtener nuevas plantas individuales con las características que presentan los genes propios de los gametos masculinos y femeninos. En la reproducción por semillas se presenta variación genética o segregación entre las plantas hijas (Ramírez y del Real-Laborde, 2007). *A. tequilana* florece sólo una vez al final de su ciclo de vida que es de aproximadamente 6 a 12 años (CRT, 2004). La reproducción sexual inicia en los meses de febrero o marzo con la emisión de la inflorescencia de tipo paniculada comúnmente llamada "quioté" que nace del centro de la roseta y que alcanza alturas de 5 a 6 metros (Gentry, 1982). Las flores de agave son perfectas, esto es, flores que poseen ambas estructuras reproductivas, masculina y femenina, se componen de un ovario ínfero, seis tépalos y seis anteras las cuales están sujetas a la flor por medio de los estambres que son más largos que los tépalos y el estilo (García-Mendoza, 2007). El ginceo

tiene tres carpelos y un ovario trilobular, cada lóculo posee dos hileras de numerosos óvulos anátropos de placentación axilar (Fig. 3) (Gentry, 1982).

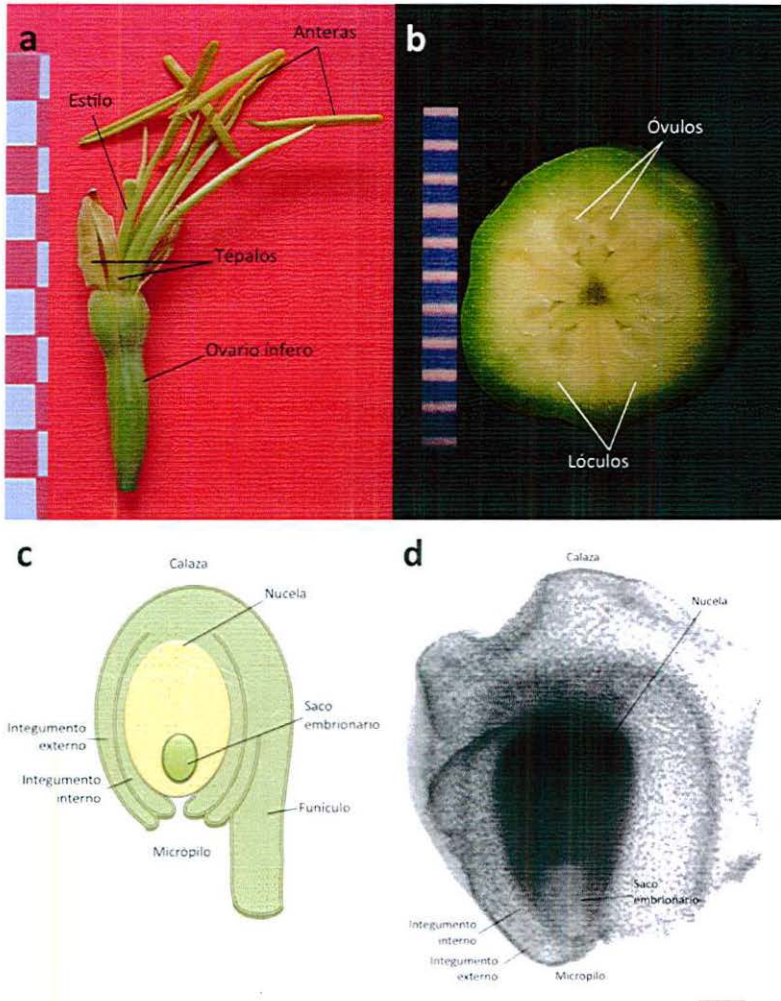


Figura 3. Flor de *Agave tequilana*. **a)** Partes que componen la flor de *Agave tequilana*. **b)** Corte transversal que muestra el arreglo de los óvulos dentro del ovario de *A. tequilana*. **c)** Esquema del ovulo del tipo anátropo y sus partes. **d)** Óvulo anátropo de *A. tequilana*. Barra 50 μ m.

3. ANTECEDENTES

3.1. DESARROLLO DEL GAMETÓFITO FEMENINO EN ESPECIES DENTRO DEL ORDEN ASPARAGALES

Estudios particulares se han realizado en diferentes géneros y especies del orden Asparagales respecto al desarrollo del gametofito femenino, donde la mayoría de los autores reportan sacos embrionarios con un desarrollo normal tipo “*Polygonum*”, tal es el caso de las especies *Yucca rupicola* (Watkins, 1937); *Y. aloifolia* (Wolf, 1940); *Agave lechuguilla* (Grove, 1941), *A. virginica* (Regen, 1941), *Hesperocallis undulata* y *Leucocrinum montanum* (Cave, 1948) y *Comospermum yedoense* (Rudall, 1999). Sin embargo, recientemente Piven y col. (2001) reportaron para las especies *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* un desarrollo del saco embrionario del tipo “bispórico” el cual es similar al desarrollo del megagametófito que se observa en el género *Allium*.

Con respecto a la especie *A. tequilana* solo se cuenta con un estudio previo donde Escobar-Guzmán y col. (2008) reportaron que el desarrollo del gametofito femenino se da a partir de la megaspóra más cercana a la calaza, la cual forma un saco embrionario con siete células por lo que el desarrollo del gametofito femenino es del tipo *Polygonum*, sin embargo, los autores no reportaron el proceso de divisiones mitóticas que da origen a este saco heptanucleado (proceso de megagametogénesis). También, es importante destacar que en esta especie no se tienen antecedentes de sobre el proceso de fecundación, así como la formación del cigoto y por lo tanto el desarrollo temprano del embrión.

3.2. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DEL GAMETÓFITO FEMENINO EN ANGIOSPERMAS

De manera tradicional, los estudios citológicos del megagametofito se han llevado a cabo mediante seccionamiento por medio de micrótopo de muestras embebidas en parafina o resinas (Stelly y col., 1984). Sin embargo, las técnicas de microtomía suelen ser laboriosas, el posicionamiento de las células en relación a las células vecinas suele perderse y los planos de sección resultantes son difíciles de reconstruir

en una sola imagen tridimensional (3-D) (Haseloff, 2003; Barrell y Grossniklaus, 2005). Una alternativa a los métodos de seccionamiento, es proporcionada por una variedad de técnicas de clarificación donde masas gruesas de tejido se hacen translúcidas a través de un tratamiento químico específico (Herr, 1993). Agentes como el xileno y el hidrato de cloral han sido adoptados como sustancias clarificantes, los cuales tienen un alto índice de refracción (similar al del vidrio). Como resultado de estos tratamientos de clarificación, los tejidos generalmente se vuelven transparentes, lo que reduce en gran medida los problemas de dispersión de la luz y aberración esférica. Esto permite una alta resolución de imagen de óvulos completos (Haseloff, 2003). Un ejemplo del uso de estas sustancias se encuentra en el estudio realizado por Stelly y col. (1984), quienes desarrollaron una técnica de clarificación-tinción, donde se utilizó Hematoxilina de Mayer (colorante de carácter básico utilizado para teñir el núcleo de las células las cuales tienen carácter ácido por la presencia de los ácidos nucleicos); y salicilato de metilo como agente clarificante en el género *Solanum* y donde reportan que el uso de un colorante específico como la Hematoxilina para los núcleos aunado a la clarificación además de tener las ventajas antes mencionadas aumenta el contraste de las muestras haciéndolas fáciles de observar y analizar.

4. HIPÓTESIS

El desarrollo del saco embrionario de *Agave tequilana* Weber var. Azul sigue de manera general el patrón conocido como tipo “*Polygonum*” observado en otras especies del género *Agave*, mientras que la fecundación, formación del cigoto y desarrollo temprano del embrión se dan de manera semejante a los descritos para la mayoría de las plantas Angiospermas.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar y caracterizar el proceso de formación del saco embrionario (megagametogénesis), el proceso de fecundación, formación del cigoto y el desarrollo temprano del embrión de *Agave tequilana* Weber var. Azul.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir el proceso de megagametogénesis en *Agave tequilana*.
2. Caracterizar el saco embrionario maduro de *A. tequilana*.
3. Describir el proceso de fecundación y la formación del cigoto en *A. tequilana*.
4. Describir el desarrollo temprano del embrión de *A. tequilana*.
5. Adaptar una técnica de tinción y clarificación para *A. tequilana* que permita el análisis microscópico/histológico de un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo donde las células no pierdan su posición original y los tejidos no sufran daño alguno.

6. JUSTIFICACIÓN

Debido a que existe muy poca información acerca del estudio del desarrollo del gametofito femenino y la reproducción sexual en el agave tequilero, el generar conocimiento básico de los patrones de desarrollo del megagametófito así como la embriogénesis cigótica en esta especie de gran relevancia económica, resulta de suma importancia ya que abrirá nuevas vías en la investigación básica y aplicada en las áreas de biología del desarrollo, evolución y la reproducción, además de la futura aplicación en procesos de mejoramiento genético de *Agave tequilana*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal fue colectado entre los meses de mayo a junio del 2010. Se utilizaron las inflorescencias de seis plantas maduras de *Agave tequilana* Weber var. Azul obtenidas dentro de la zona de denominación de origen tequila (DOT, 1993).

Las inflorescencias de agave fueron cortadas y transportadas al laboratorio donde cada panícula fue separada del eje central y colocada en recipientes con agua corriente, a luz y temperatura ambiente (Fig. 4) (Rodríguez-Garay, 2011).



Figura 4. Mantenimiento de panículas con flores de *Agave tequilana* en laboratorio.

7.2. BOTONES FLORALES: COLECTA DE ESPECÍMENES Y FIJACIÓN

Al inicio de la floración se seleccionaron cinco panículas de cada inflorescencia colectada, los cuales contenían botones florales de distintos tamaños para abarcar diferentes estados de desarrollo (Fig. 5).

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

etanol al 70% donde se mantuvieron almacenados a una temperatura de 5 °C hasta el momento de su procesamiento (Fig.5) (Stelly y col. 1984; Palser y col. 1992).

7.3. PREPARACIÓN DE FLORES EN ANTESIS

Para mantener la polinización controlada, todas las flores fueron emasculadas al momento de la antesis y cubiertas con bolsas de papel "glassine" para evitar la polinización no deseada (Fig. 5).

7.4. VIABILIDAD DEL POLEN PARA LA POLINIZACIÓN

Las anteras extraídas de las flores se mantuvieron a temperatura ambiente, en un lugar seco y fresco hasta el momento de la dehiscencia. cuando el polen maduró, se recuperó de las anteras y se almacenó a 5 °C en envases de plástico (Fig. 5).

Para asegurar que el polen utilizado en las polinizaciones fuera viable se utilizó el método para germinación *in vitro* de polen para *A. tequilana* descrito por López-Díaz y Rodríguez-Garay (2008).

7.5. POLINIZACIÓN DE FLORES Y EXTRACCIÓN DE OVARIOS

Cuando los estigmas de las flores previamente emasculadas fueron receptivos, se seleccionaron 20 flores por panícula, se realizó la extracción de los óvulos contenidos en los ovarios de estas flores y se procesaron de la misma manera que los botones florales, los óvulos provenientes de estas flores se consideraron como el momento 0. El resto de las flores en este estado se polinizaron manualmente con la ayuda de un pincel (Fig. 5). Los estigmas se consideraron receptivos al mostrar la secreción de un exudado translúcido en su superficie (Tilton, 1978; Shivanna y Sastri, 1981; Edlund y col., 2004). Se realizó polinización cruzada para asegurar la fecundación.

Después de realizada la polinización y con el fin de dar seguimiento al proceso de fecundación, la formación del cigoto y del embrión de *A. tequilana* se tomó una serie de diez frutos inmaduros de cada panícula a distintos días después de la polinización (DDP) (2, 3, 4, 5, 6, 8 y 9 d) (Fig. 5).

En cada día se muestrearon los óvulos, se extrajeron del ovario y después de fijados se almacenaron en etanol 70% a una temperatura de 5 °C hasta el momento de ser procesados.

7.6. TINCIÓN Y CLARIFICACIÓN DE LOS ÓVULOS

La tinción y clarificación de todos los especímenes previamente fijados en FAA y mantenidos en etanol al 70% se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Stelly y col. (1984) (Fig. 5) con algunas modificaciones:

Los óvulos y las semillas conservados en etanol al 70% se tiñeron con solución de Hematoxilina de Mayer por un periodo de 10-24 h y posteriormente se trataron con ácido acético 2% durante 16 h para eliminar el exceso de colorante. Se realizaron varios lavados con bicarbonato de sodio al 0.1% hasta que la solución se observó cristalina, después de lo cual se renovó la solución y se dejaron reposar durante 24 h.

Posteriormente, las muestras fueron sometidas a una serie de deshidratación en etanol: 25%, 50%, 70%, 85% 95% y 100% por 15 min y finalmente etanol al 100% durante 2 h.

La clarificación se llevó a cabo mediante series de solución de metil salicilato-etanol 3:1, 1:1, 1:3 por periodos de una hora en cada serie (en esta última solución las muestras pueden ser almacenadas por un periodo de 2 meses o más a 5 °C).

7.7. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LOS ÓVULOS

Para su observación, los óvulos fueron montados en solución de metil salicilato 100%. Las muestras fueron analizadas con un microscopio Leica[®] DMR (Wetzlar, Alemania) acoplado a una cámara fotográfica EvolutionQEi[™] (Media-Cybernetics, Bethesda, EUA) y las imágenes manejadas con el software Image-Pro[®] (Media-Cybernetics, Bethesda, EUA) (Fig. 5).

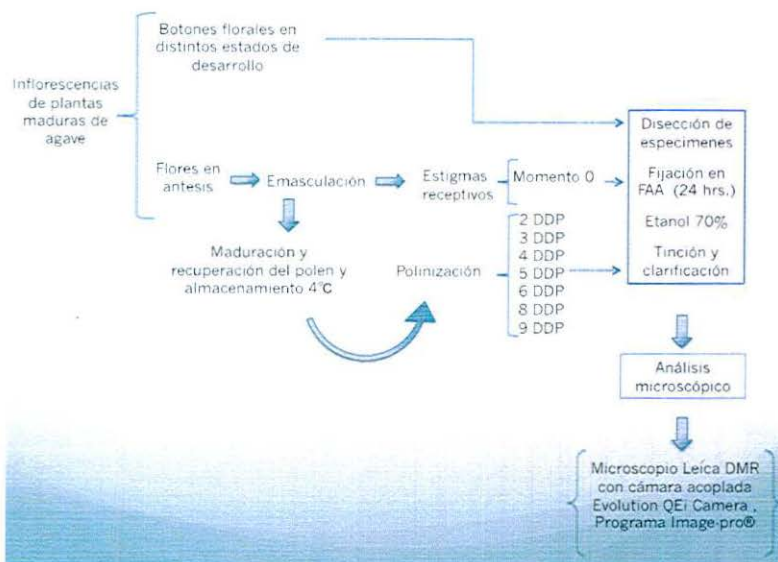


Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología para el muestreo y el estudio microscópico del desarrollo del megagametófito de *Agave tequilana*.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó un total de 5,000 óvulos tomados a partir de botones florales, flores en antesis y flores polinizadas colectadas a los días 2, 4, 5, 7, 9 y 12 DDP en los cuales se encontraron estados que incluyeron desde la etapa final de la megasporogénesis hasta la primera división del embrión.

El desarrollo del saco embrionario de *A. tequilana* sigue de manera general el patrón descrito por Maheswari (1937; 1948) donde a partir de una de las cuatro megasporas producidas durante la meiosis (la más cercana al extremo calazal) se forma un saco embrionario monospórico del tipo "*Polygonum*" del cual esta reportado que ocurre en al menos 70% de las plantas angiospermas estudiadas.

Se observó por primera vez el proceso de doble fecundación, la formación del cigoto y el embrión en *Agave tequilana*.

La adaptación de la técnica de clarificación-tinción propuesta por Stelly y col. (1984) permitió el análisis de un gran número de muestras, en un periodo de tiempo corto, sin que los tejidos analizados fueran alterados y las células contenidas dentro del saco perdieran su posición original. La solución de Hematoxilina de Mayer contrasta los núcleos del material citoplasmático lo que facilita el análisis y la toma de fotografías de las muestras. Además las muestras procesadas con esta técnica pueden ser almacenadas durante al menos dos meses a una temperatura de 5 °C.

8.1. BOTONES FLORALES

En los óvulos analizados procedentes de los botones florales colectados a distintos tamaños se observó parte del final de la megasporogénesis así como el proceso de megagametogénesis.

8.1.1. Final de la megasporogénesis

En los óvulos correspondientes a los botones florales más pequeños se logró observar el final del proceso de megasporogénesis. Estos óvulos mostraron cuatro megasporas dispuestas en forma linear en el sentido calazal-micropilar (Figs. 6a y b). El acomodo en forma linear de la tétrada ha sido previamente reportado en especies de otras familias del orden Asparagales tales como *Scilla greilhuberi* y *S. puschkinoides* (Svoma y Greilhuber, 1987), *Triteleia* (Berg, 2003), *Hymenocallis caribaea* (Raymúndez y col., 2008) e *Iris mandshurica* (Zhang y col., 2011) y más cercanamente en la especie *Yucca rupicola* (Watkins, 1937) y *Agave lechuguilla* (Grove, 1941) pertenecientes a la familia Agavaceae. sin embargo, Regen (1941) reportó para *A. virginica* que el arreglo de la tétrada se puede dar tanto de forma linear como en forma de "T" al igual que en *Hesperocallis undulata* (Cave, 1948), mientras que Wolf (1940) reportó la aparición de la tétrada en forma linear de manera poco frecuente siendo la formación en "T" la regla para la especie *Y. aloifolia*.

Las observaciones realizadas demuestran que tres de las megasporas de la tétrada, las más cercanas al extremo micropilar degeneran y sus restos permanecen en ocasiones en el extremo micropilar del óvulo las cuales se observan como manchas intensamente teñidas pudiendo ser observadas en óvulos que contenían sacos embrionarios hasta el estado de dos núcleos. Estos resultados pueden compararse con los reportados por Regen (1941) en *Agave virginica* y por Wolf (1940) en *Yucca aloifolia* donde mencionan que tras la muerte y degradación de las tres megasporas, los residuos se observaron hasta el estado desarrollo del saco embrionario de cuatro núcleos.

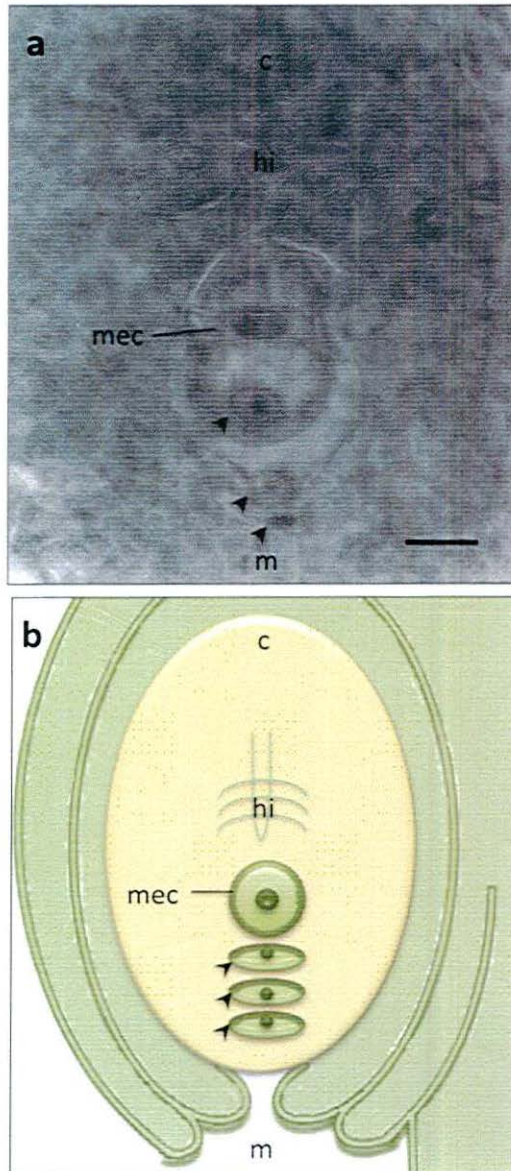


Figura 6. Final de la megasporogénesis. **a)** Formación en línea de la tétrada y degradación de las tres megasporas micropilares **b)** Representación esquemática de la tétrada. *c*=calaza, *m*=micrópilo, *mec*=megaspóra calazal, *hi*=hipostasa, cabezas de flecha=megasporas en proceso de degradación. Barra=12,5 μ m.

Así mismo, se apreció que al momento de la degeneración de las megasporas solo la más cercana a la calaza permanece viable, este proceso en el que solo una de las megasporas sobrevive se da de manera semejante en la mayoría de las plantas con flor incluyendo *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* (Yang y col., 2010) y de manera más cercana en las especies *Scilla greilhuberi* y *S. puschkinoides* (Svoma y Greilhuber, 1987), *Agave virginica* (Regen, 1941) y *Y. aloifolia* (Wolf, 1940). sin embargo, no siempre es la megaspora más cercana la que sobrevive. Reed (1903) mencionó que en la especie *Y. filamentosa* es la segunda megaspora en el sentido calazal-micropilar de la tétrada la que madura y da origen al saco embrionario. Recientemente, Piven y col. (2001) reportaron que el saco embrionario de las especies *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* pertenecientes al género *Agave*, se desarrolla a partir de las dos megasporas más cercanas al extremo micropilar dando origen a un saco embrionario de tipo Bisporico.

8.1.2. Megagametogénesis

Yang y col. (2010) observaron que el proceso de la megagametogénesis inicia con un aumento en tamaño de la megaspora funcional, crecimiento que fue observado en las preparaciones estudiadas en este trabajo, donde la megaspora funcional (Fig.7) (43µm de largo y 23µm de ancho) mostró un tamaño similar al observado en *Tofieldia glutinosa* (Holloway y Friedman, 2008), donde la megaspora funcional mide de 35-50µm de largo y 12-20µm de ancho. En esta etapa del desarrollo comienza a observarse la formación de la hipostasa (Figs. 7a y b) que se detecta como un grupo bien definido de células que se encuentran inmediatamente adyacentes al saco embrionario (es decir, que se extiende justo por encima de las antipodas del saco embrionario maduro), normalmente pobre en contenido citoplásmico y con paredes celulares engrosadas o parcialmente lignificadas (Maheswari, 1950, Rudall, 1997).

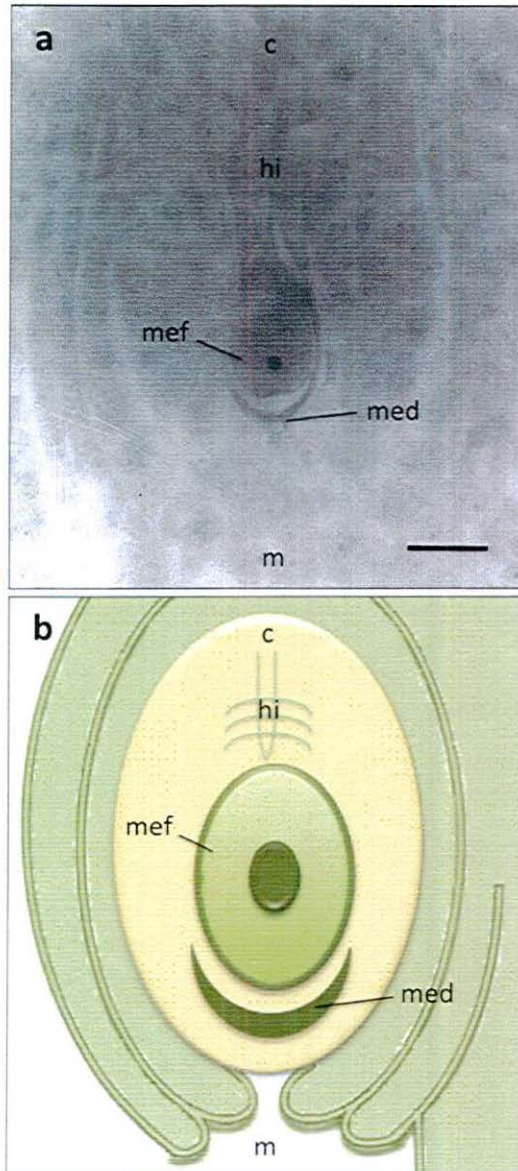


Figura 7. Megaspora funcional. **a)** Megaspora funcional del gametófito femenino, en el extremo calazal (mef) arriba de ella se observa la hipostasa (hi) y en el extremo micropilar los restos de las megasporas no funcionales (med) **b)** Diagrama de la megaspora funcional. c=calaza, m=micrópilo, mef=megaspora funcional, med=megasporas degradadas, hi=hipostasa. Barra=15 μ m.

Por otra parte, Tilton (1980) menciona que la primera indicación visible de la formación de la hipostasa ocurre durante la interfase meiótica-mitótica de la megaspora funcional, donde las células nucleares alrededor de la parte inferior de la calaza se observan teñidas más densamente que las células vecinas. El desarrollo de esta estructura está reportado como frecuente entre miembros de la familia *Agavaceae* (Tilton y Morgensen, 1980), y al estar conectado con el tejido vascular del óvulo es probable que tenga una función integral en la translocación de nutrientes en el gametofito femenino antes y después de la fertilización (Tilton, 1980).

La megaspora funcional sufre una primera división mitótica dando como resultado un saco embrionario con dos núcleos, los cuales se sitúan uno en cada polo: el núcleo calazal primario y el núcleo micropilar primario, estos se encuentran separados por una vacuola central relativamente grande (Figs. 8a y b). El tamaño promedio del saco embrionario en esta etapa fue de aproximadamente 50 μm de largo por 35 μm de ancho. Estos dos núcleos hijos se dividen nuevamente dando origen a cuatro núcleos, los cuales se sitúan dos en el extremo calazal y dos en el extremo micropilar mientras la vacuola permanece al centro del saco embrionario (Figs. 9a y b), la división de los núcleos se da de manera sincrónica en ambos extremos del saco, proceso que se da de manera semejante en los óvulos de maíz (*Zea mays*) (Huang y Sheridan, 1994). El saco embrionario en este estado alcanza un tamaño de 60 μm de largo por 42 μm de ancho, datos comparables a los presentados por Holloway y Friedman (2008) en *Tofieldia glutinosa* en la cual el saco mide 50–65 μm de largo y 20–30 μm de ancho. En ambos estados de desarrollo el saco embrionario es de forma ovoide. Una tercera división mitótica daría origen a un saco embrionario de ocho núcleos, situados cuatro en el extremo calazal y cuatro en el extremo micropilar, sin embargo este estado no pudo ser observado.

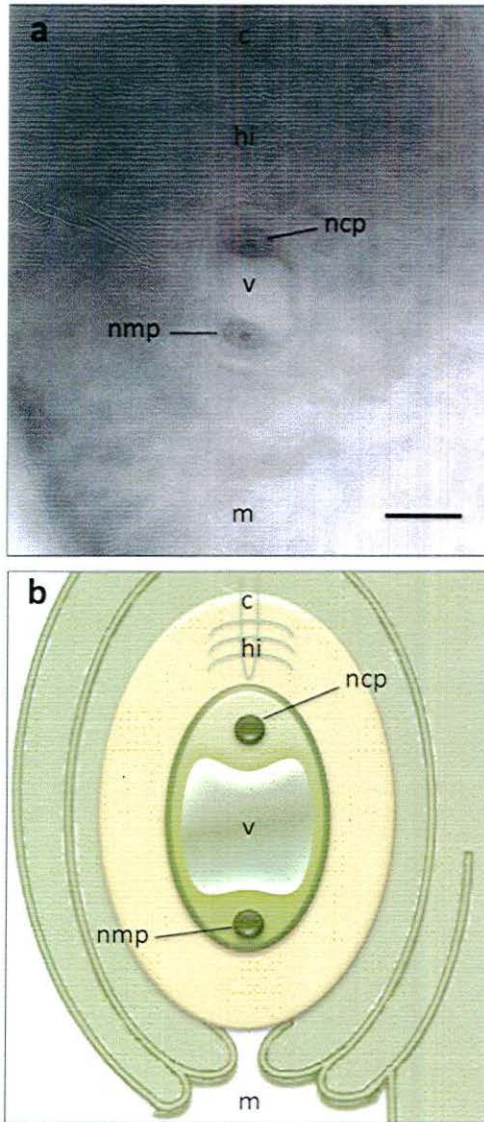


Figura 8. Primera división mitótica del saco embrionario. a) Núcleos hijos originados a partir de la primera división mitótica del saco, uno en cada extremo del saco embrionario en el eje calazal-micropilar separados mediante una vacuola central (v). b) Representación esquemática de la primera división mitótica. m=micrópilo, c=calaza, ncp=núcleo calazal primario, nmp=núcleo micropilar primario, hi=hipostasa, v=vacuola. Barra=20 μ m.

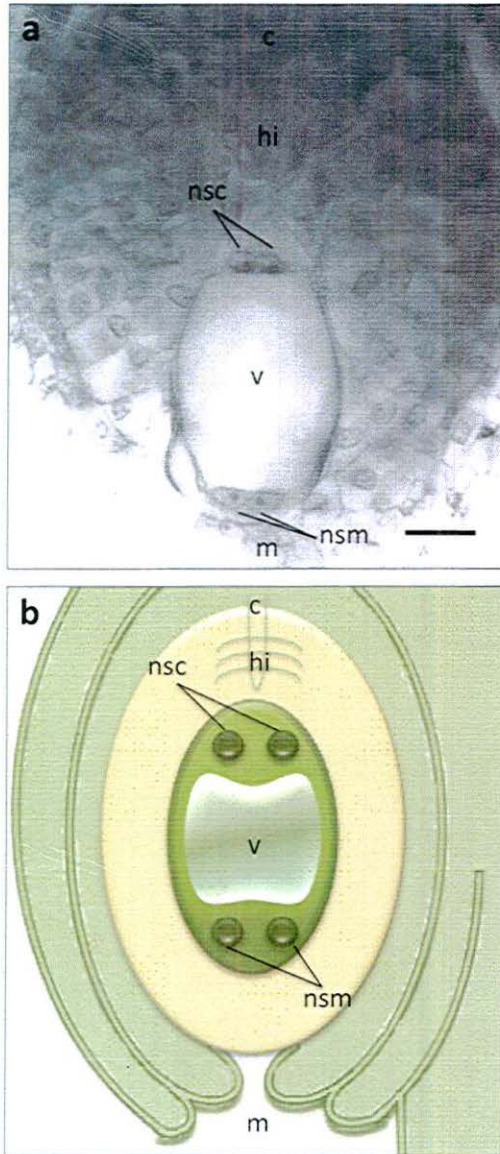


Figura 9. Segunda división mitótica del saco embrionario. **a)** Saco embrionario en etapa de cuatro núcleos, dos de ellos situados en el polo calazal (nsc) y dos en el polo micropilar (nsm) separados mediante una vacuola central (v). **b)** Diagrama que representa la segunda división mitótica del saco. c=calaza. m=micrópilo. nsc=núcleos calazales, nsm=núcleos micropilares, hi=hipostasa, v=vacuola. Barra=20 μ m.

8.2. FLORES CON ESTIGMAS RECEPTIVOS (MOMENTO 0)

8.2.1. Formación y caracterización del saco embrionario maduro

Las observaciones realizadas en los óvulos correspondientes al momento 0 mostraron la etapa de formación del saco maduro etapa que corresponde a las flores con estigmas receptivos, esto coincide con las observaciones hechas por Carlone (1962) que menciona que la receptividad del estigma de la manzana suele estar sincronizada con el momento de la madurez del saco embrionario.

Al momento 0 el saco embrionario aumenta su tamaño a 247 μm de largo por 106 μm y cambia de forma siendo más ancho en su extremo calazal que en el micropilar, dando el efecto de una forma bulbosa y con un pequeño "tubo" estrecho (tubo haustorial) en el extremo calazal (Figs.10a y b) similar a la reportada por Tilton (1978) en *Ornithogalum caudatum* donde menciona que la forma del saco es piriforme (en forma de pera), con la hipostasa rodeando el tubo haustorial en el extremo calazal. Este tubo haustorial ha sido reportado en un gran número de sacos embrionarios de plantas monocotiledóneas (Rudall, 1997). El tubo penetra en las células de la nucela cerca del haz fibrovasecular por lo que se ha reportado que podría cumplir funciones nutritivas sirviendo como haustorio (Reed, 1903; Watkins, 1937; Wolf, 1940; Rudall, 1997). En el extremo micropilar se observa una extensión del tejido nucelar a manera de una capa uniseriada de células que cubren la parte del saco cercana a los integumentos, esta estructura es similar a la observada por Tilton y Mogensen (1980) en *Agave parryi*. En esta etapa, el saco embrionario se compone de ocho núcleos (siete células) y se organiza 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 micropilar, dos sinérgidas y una célula huevo, las cuales conforman el aparato ovular (Figs. 10a y b).

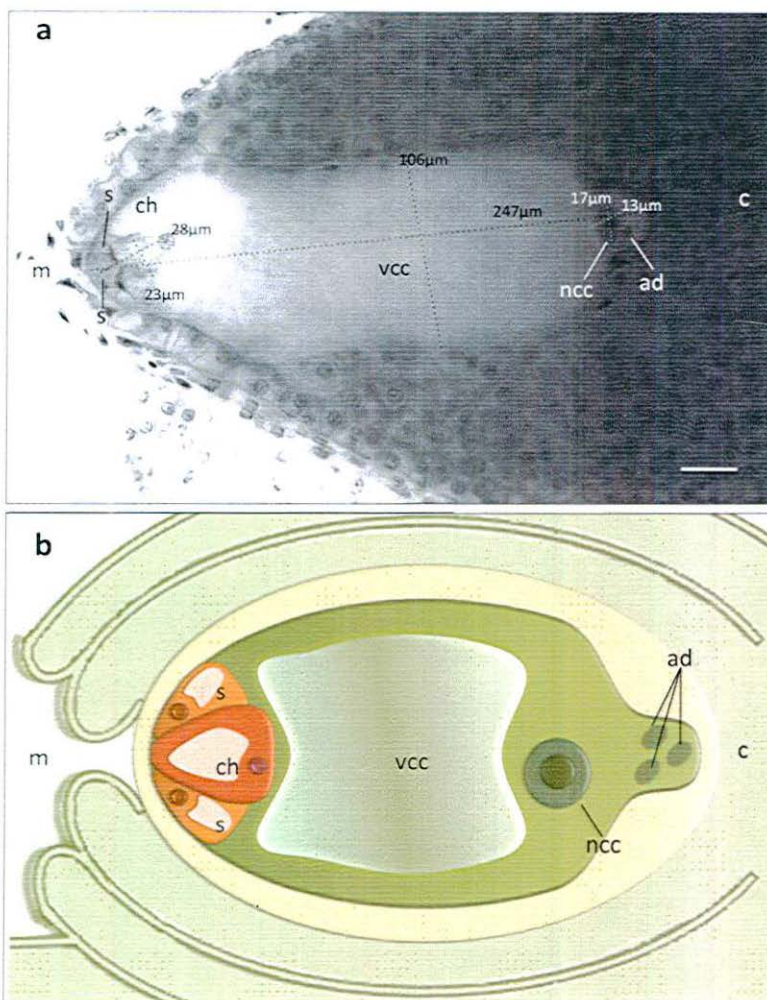


Figura 10. Organización y dimensiones promedio del saco embrionario maduro. **a)** Organización y dimensiones de las células del saco maduro, dentro del tubo haustorial se encuentran los restos de las antipodas (ad), debajo de ellas el núcleo de la célula central (ncc), en el extremo micropilar del saco se encuentra el aparato ovular formado por dos sinérgidas (s) y la célula huevo (ch). **b)** Representación esquemática del saco maduro. c=calaza, m=micropilo, ad=antipodas degradadas, ncc=núcleo de la célula central, vcc=vacuola, s=sinérgida, ch=célula huevo. Barra=25 μm .

8.2.1.1. Antípodas

En el presente análisis no fue posible observar las antípodas del saco embrionario, sin embargo, se logran observar restos intensamente teñidos de estas células degradadas, los cuales se localizan en el tubo haustorial calazal (Figs. 10a y b, 13a y b). Maheswari (1948, 1950) menciona que ocasionalmente son encontrados sacos con menos de ocho núcleos y que esto puede deberse a la rápida degeneración de las antípodas o incluso aún cuando están presentes pueden pasar desapercibidas por estar situadas al final del tubo calazal del saco embrionario.

Es probable que este fenómeno de rápida degeneración por parte de las antípodas esté presente en el gametófito femenino de *A. tequilana* por lo que los tiempos de muestreo de los óvulos no permitieron realizar las observaciones de las mismas. Este fenómeno de la pronta desintegración de las antípodas ha sido reportado de igual manera en especies como *Agave virginica* (Regen, 1941), *Glycine max* (Kennell y Horner, 1985) *Scilla persica* y *S. fuscorum* (Svoma y Greilhuber, 1987), *Triticum aestivum* (Whei-cheng y col., 1988; Li-Hua y Rui-Lin, 2004), *Arabidopsis thaliana* (Murguía y col., 1993), *Passiflora edulis* (Magalhães de Souza y col., 2002), *Sargentodoxa cuneata* (Wang y col., 2009) y *Cichorium intybus* (Chehregani y col., 2011). Según Tilton (1978), en las angiospermas, las antípodas son las células que más varían en su comportamiento dentro del megagametófito maduro, el único rasgo que comparten entre sí es su ubicación en el extremo calazal del saco: las antípodas pueden ser efímeras, degradándose poco después de su formación o persistir incluso después del evento de fecundación (Williams y Friedman, 2004). En *Tofieldia glutinosa* las antípodas incluso proliferan en la etapa de maduración del saco embrionario, encontrándose hasta ocho núcleos antípodales (Holloway y Friedman, 2008).

8.2.1.2. Núcleos polares

Los núcleos polares se observan uno al lado del otro situados justo debajo del tubo haustorial calazal (Figs. 11a y b), siendo muy similares en forma y tamaño entre ellos como lo explican Maheswari (1950) y Tilton y Lersten (1981).

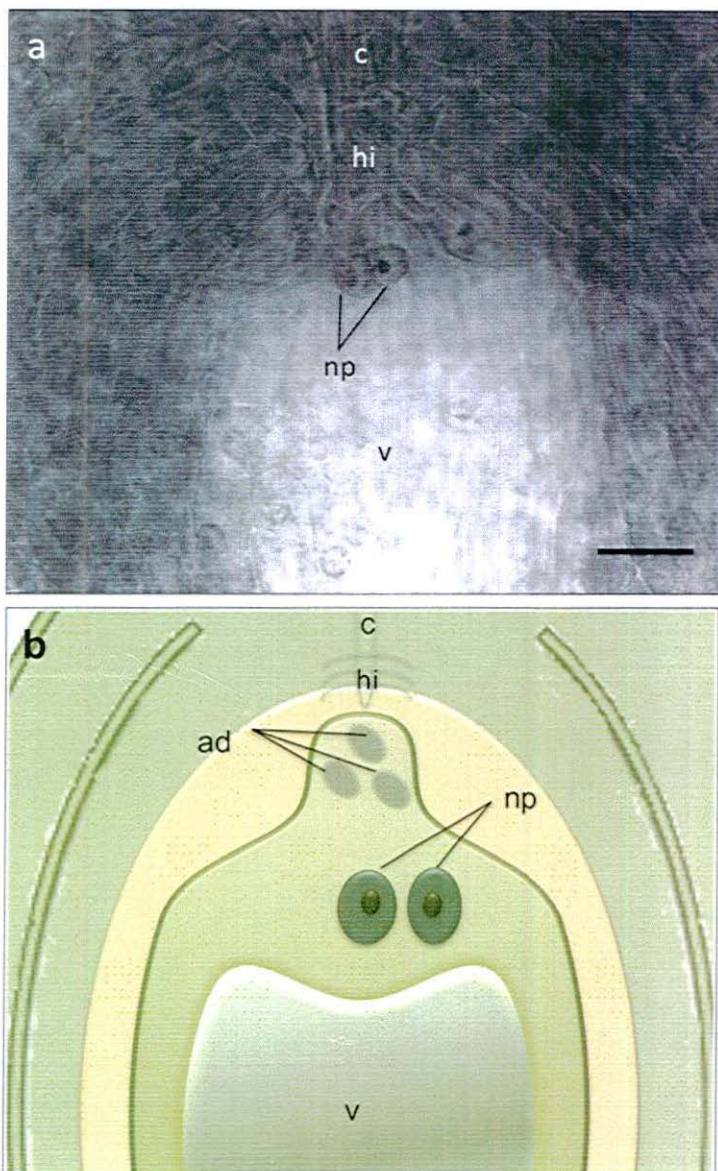


Figura 11. Núcleos polares. **a)** Núcleos polares uno al lado del otro, situados debajo del tubo haustorial en el extremo calazal del saco embrionario. **b)** Esquema de la localización de los núcleos polares. c=calaza, np=núcleos polares, hi=hipostasa, v=vacuola, ad=antípodas degradadas. Barra=2 μm .

La posición de los núcleos polares es similar a la observada en *Hemiphylacus alatostylus* (Rudali y col., 1997) donde se encuentran en el extremo calazal dentro de un tubo o cuello (haustorio calazal) y *Tofieldia glutinosa* (Holloway y Friedman, 2008) donde los polos nucleares se sitúan a dos tercios de distancia del extremo micropilar del saco embrionario.

8.2.1.3. Aparato ovular

En el extremo micropilar las dos sinérgidas yacen una al lado de la otra y pueden observarse en el mismo plano focal, mientras que la célula huevo se encuentra por lo regular en un plano focal diferente y por lo general se posiciona en medio de las dos sinérgidas. Las tres células del aparato ovular tienen una de sus paredes en contacto con el borde del gametofito femenino, de manera similar a lo que se observa en el aparato ovular del megagametófito de *Tofieldia glutinosa* (Holloway y Friedman, 2008) y *Ornithogalum caudatum* (Tilton, 1978).

Las sinérgidas poseen una forma muy similar entre ellas. Cada sinérgida posee una vacuola polarizada hacia el extremo calazal y el núcleo hacia el extremo micropilar (Tian y col., 2005). En el presente estudio no fue posible observar el aparato filiforme, debido probablemente a que la técnica de clarificación-tinción no lo hizo visible (Magalhães de Souza y col., 2002).

La célula huevo presentó distintas formas durante las observaciones realizadas, sin embargo, de manera general en todas se visualizó un núcleo denso, bien polarizado hacia el extremo calazal y también una gran vacuola que ocupa casi todo el espacio de la célula situada en el extremo micropilar (Figs. 12a, b y c) de modo semejante a lo mostrado por Tilton (1978) en *Ornithogalum caudatum* donde menciona que una gran vacuola situada en el extremo micropilar ocupa la mayor parte del volumen de la célula mientras la mayor parte del contenido citoplasmático y el núcleo se sitúan en el extremo calazal de la célula huevo. Resultados similares fueron obtenidos por Mogensen y Suthar (1979) y Tian y col. (2005) en *Nicotiana tabacum*. En promedio, el tamaño que presenta la célula huevo es de 28 μm de largo por 23 μm de ancho.

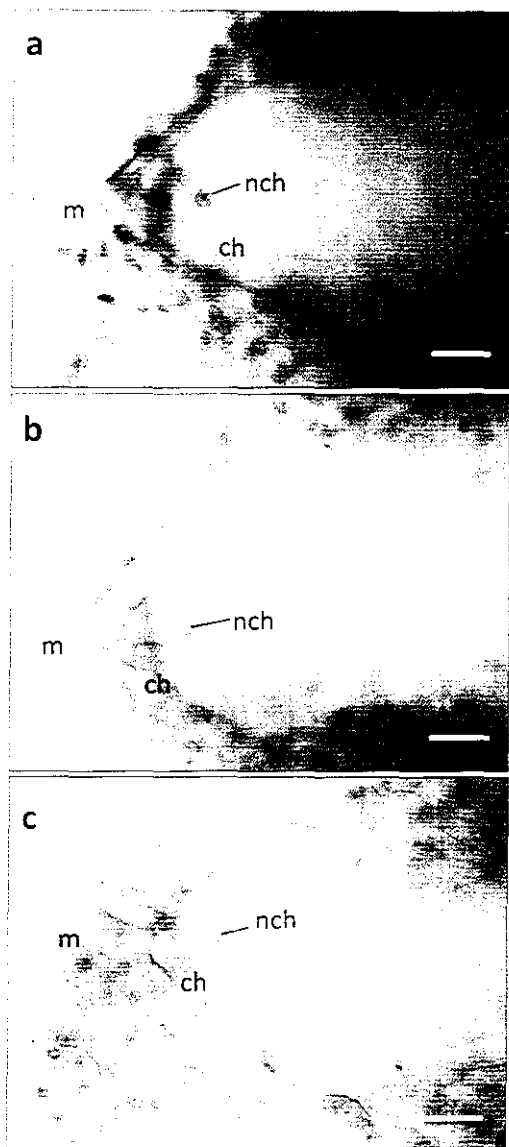


Figura 12. Célula huevo. a), b) y c) Diferentes formas que presentó la célula huevo en los sacos embrionarios maduros. El núcleo de la célula huevo se encuentra polarizado hacia el extremo calazal en los tres casos. m=micrópilo, ch=célula huevo, nch=núcleo de la célula huevo. Barras=25 μ m.

8.3. SEGUNDO DÍA DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN

8.3.1. Célula central: cariogamia de los núcleos polares

Al segundo día después de la polinización los óvulos analizados no mostraron cambios en el tamaño y forma del saco, sin embargo, se observó la unión de los dos núcleos polares (cariogamia) para generar el núcleo de la célula central. La cariogamia de los núcleos polares antes de la fecundación ha sido observada de la misma manera en los óvulos de *Capsella bursa-pastoris* (Schulz, 1973), *Tofieldia glutinosa* (Holloway y Friedman, 2008) y *Arabidopsis thaliana* (Hamamura y col., 2012). El núcleo de la célula central permanece localizado al igual que los núcleos polares en el extremo calazal del saco embrionario (Figs. 13a y b), sin embargo Piven y col. (2001) reportaron en *Agave fourcroydes* y *A. angustifolia* que la posición de los núcleos polares y el núcleo de la célula central se encuentran al centro del saco embrionario patrón que se observa de la misma manera en gran parte de las plantas angiospermas (Tilton 1978; Russell, 1993), particularmente en maíz (Huang y Sheridan, 1994), otros cereales y en *Arabidopsis thaliana* (Olsen, 2004). Por otra parte, la polaridad del núcleo de la célula central cargada hacia el polo calazal del saco embrionario fue observada en las especies de la *Yucca rupicola* (Watkins, 1937), *Persea americana* (Tomer y Gottreich, 1976) y *Tofieldia glutinosa* (Holloway y Friedman, 2008). Según Maheswari (1950) la posición del núcleo de la célula central cercana a las antípodas indica que una vez fecundada el desarrollo de endospermo será del tipo helobial. El núcleo de la célula central presenta una forma semi-circular a ovalada y tiene un tamaño aproximado de 17 μm por 13 μm .

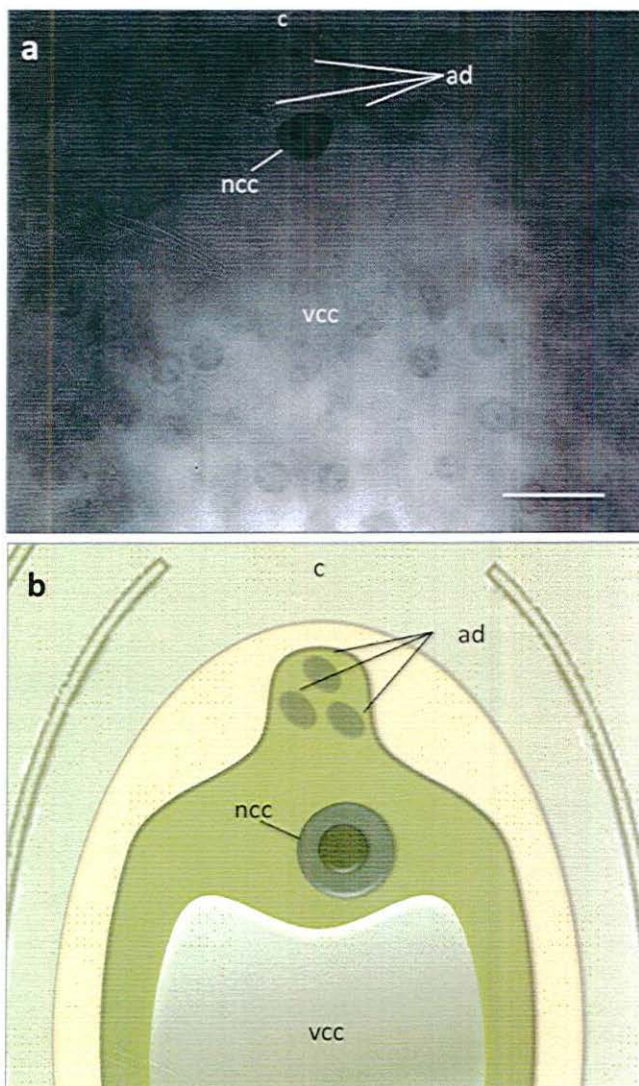


Figura 13. Núcleo de la célula central y restos de las antípodas. **a)** Núcleo de la célula central en el extremo calazal del saco embrionario debajo del tubo haustorial donde se observan los restos de las antípodas degradadas. **b)** Esquema de la localización de la célula central y los restos de las antípodas. c=calaza, ncc=núcleo de la célula central, vcc=vacuola de la célula central, ad=antípodas degradadas. Barra=25 μ m.

8.4. TERCERO Y CUARTO DÍA DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN

8.4.1. El proceso de la doble fecundación

En las preparaciones correspondientes a óvulos extraídos y fijados tres y cuatro días después de la polinización fue posible observar el proceso de la doble fecundación.

En el extremo micropilar de los óvulos analizados se pudo apreciar la entrada del tubo polínico al saco embrionario del óvulo, a manera de una hendidura u orificio (Figs. 14a y b) formado en la capa nucelar micropilar uniseriada: esta modificación del tejido nucelar en el extremo micropilar es similar a la reportada en *Agave parryi* (Tilton y Mogensen, 1980). 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: este proceso puede ser observado en las figuras 14 y 15 donde se puede apreciar el recorrido que realizan los núcleos espermáticos a través del saco a manera de una línea de color oscuro la cual parece estar teñida con la Hematoxilina de Mayer. La primera marca que se observa es a partir de la base de una de las sinérgidas hasta hacer contacto con el núcleo de la célula huevo (Fig. 14a), mientras que la segunda se observa a partir de la célula huevo y continua a lo largo del saco embrionario hasta encontrarse con el núcleo de la célula central (Figs. 15a y b) recorriendo así una distancia de aproximadamente 210 μm . Este proceso de doble fecundación parece ser diferente al reportado en *Arabidopsis thaliana* (Hamamura y col., 2012) donde después de descargar ambos núcleos espermáticos en la sinérgida (la cual degenera al ser alcanzada por el tubo polínico) permanecen juntos e inmóviles en las cercanías de la sinérgida degenerada durante 7.4 min aproximadamente y después reinician su movimiento, uno directamente hacia el núcleo de la célula huevo y el otro al núcleo de la célula central que se sitúa en el extremo calazal del óvulo muy cercano a la célula huevo, sin que el segundo núcleo espermático pase a través de la célula huevo para llegar al núcleo de la célula central. Un estudio de la ultraestructura del ovulo de *Agave parryi* (Tilton y Mogensen, 1980) el cual posee un saco embrionario maduro con un arreglo similar al observado en *A. tequilana* muestra que existe una ausencia en la continuidad de la pared celular alrededor del extremo calazal de la célula huevo, lo que podría facilitar la transferencia del segundo núcleo espermático hacia el núcleo de la célula central.

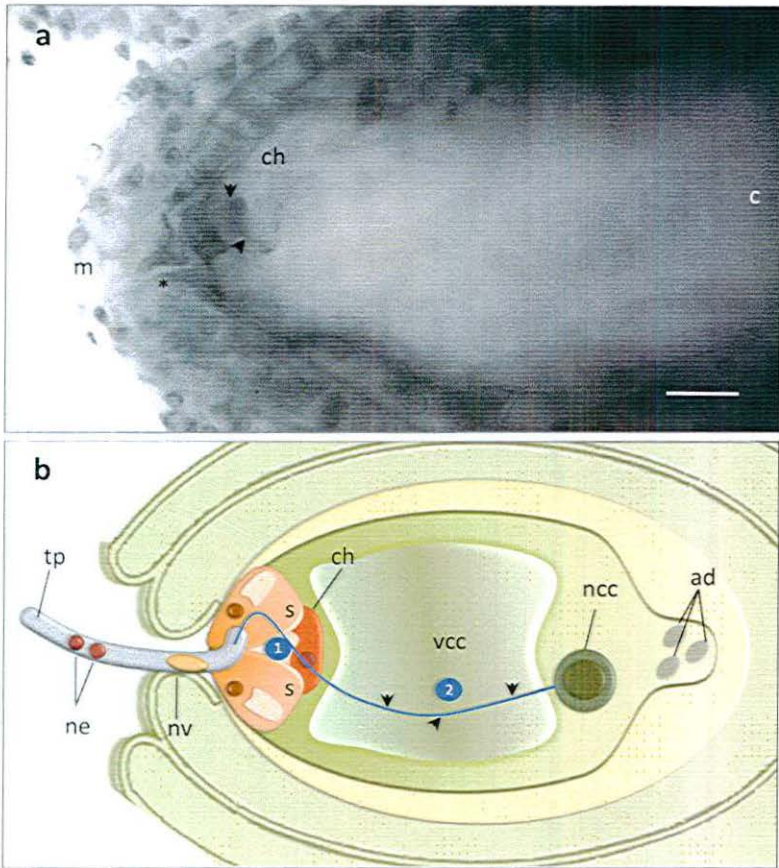


Figura 14. Proceso de doble fecundación: fecundación de la célula huevo. **a)** Fecundación de la célula huevo por uno de los núcleos espermáticos, se observa el punto de entrada en el tejido nucelar uniseriado micropilar (asterisco) y el camino que recorre el núcleo espermático dentro de la célula huevo. **b)** Representación esquemática de la doble fecundación. c=calaza, m=micrópilo, ad=antípodas degradadas, nnc=núcleo de la célula central, vcc=vacuola de la célula central, s=sinérgida, ch=célula huevo, tp=tubo polínico, nv=núcleo vegetativo, ne=núcleos espermáticos, cabezas de flecha=rastro de los núcleos espermáticos a través del saco, asterisco=punto de entrada del tubo polínico, 1=fecundación de la célula huevo, 2=fecundación de la célula central. Barra=25 μ m.

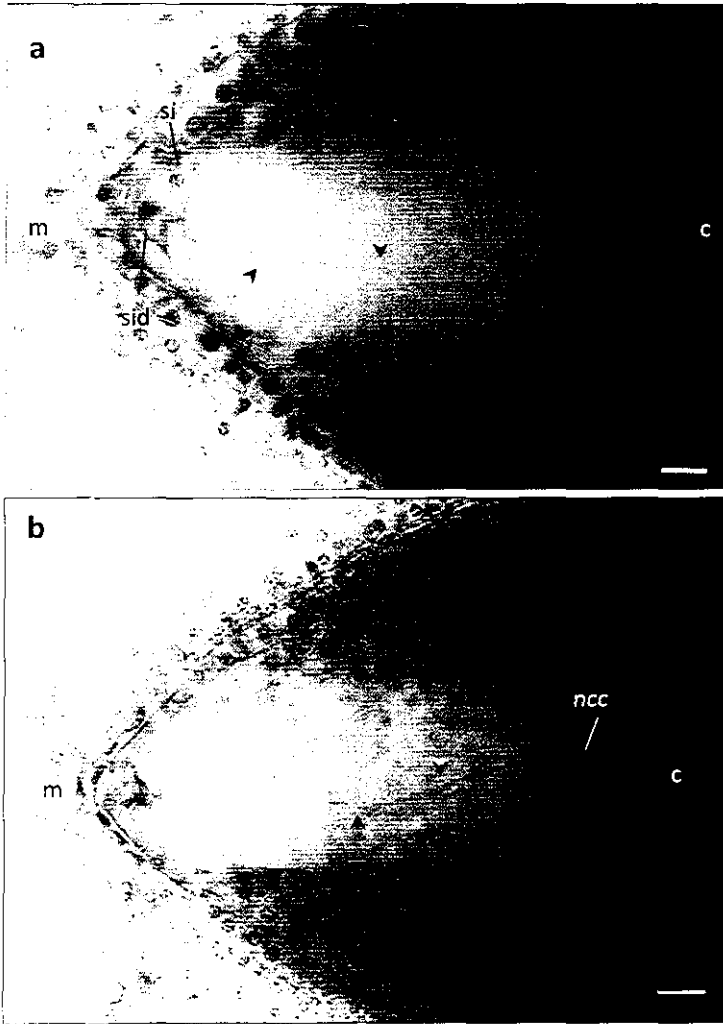


Figura 15. Proceso de doble fecundación: fecundación de la célula central. **a)** Se observa la degeneración de la sinérgida por donde entraron los núcleos espermáticos así como el camino que sigue el segundo núcleo espermático hasta la primera mitad del saco embrionario. **b)** Se aprecia el camino que recorre el segundo núcleo espermático a partir de la segunda mitad del saco hasta encontrarse con el núcleo de la célula central en el extremo calazal del saco embrionario. c=calaza, m=micrópilo, si sinérgida, sid=sinérgida degradada, ncc= núcleo de la célula central, cabezas de flecha=rastro de los núcleos espermáticos a través del saco. Barras= 20 μ m.

En *Arabidopsis thaliana* (Hamamura y col., 2012) la diferencia en tiempo entre ambos eventos de fecundación es de 2.5 min en promedio, por lo que se dan de manera casi simultánea (Hamamura y col. 2011). Sin embargo, dada la lejanía del núcleo de la célula central en *Agave tequilana* este evento podría tomar mucho más tiempo.

8.5. QUINTO DÍA DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN

8.5.1. Formación del cigoto y el endospermo

Al quinto después de la polinización el saco embrionario aumenta su tamaño a 280 μm de largo y 125 μm de ancho en promedio. La forma del saco embrionario comienza a cambiar, las paredes del saco cercanas a la calaza y que rodean el tubo haustorial comienzan a recorrerse en sentido calazal hacia el tejido nucelar (Figs. 16a y b).

En estas preparaciones se pudo observar la formación del cigoto como resultado de la fecundación de la célula huevo por uno de los núcleos espermáticos. El cigoto posee una forma semiesférica de gran tamaño 40 μm de largo por 38 μm de ancho con un núcleo bien polarizado hacia el extremo calazal (Figs. 16a y b). La posición del núcleo en el extremo calazal del cigoto asemeja a la observada en las células huevo, esto ocurre de manera similar en los cigotos de *Capsella bursa-pastoris* (Schulz y Jensen, 1968), *Nicotiana tabacum* (Mogensen y Suthar, 1979) y *Arabidopsis thaliana* (Mansfield y Briarty, 1991; Mansfield y col., 1991). Así mismo, dispersas en el saco embrionario se puede observar la formación de las células del endospermo producto de la fecundación de la célula central por el otro núcleo espermático. El endospermo es del tipo helobial (Figs. 16a y b y 18) de igual manera al reportado por Cave (1948) en *Hesperocallis undulata* (orden Asparagales).

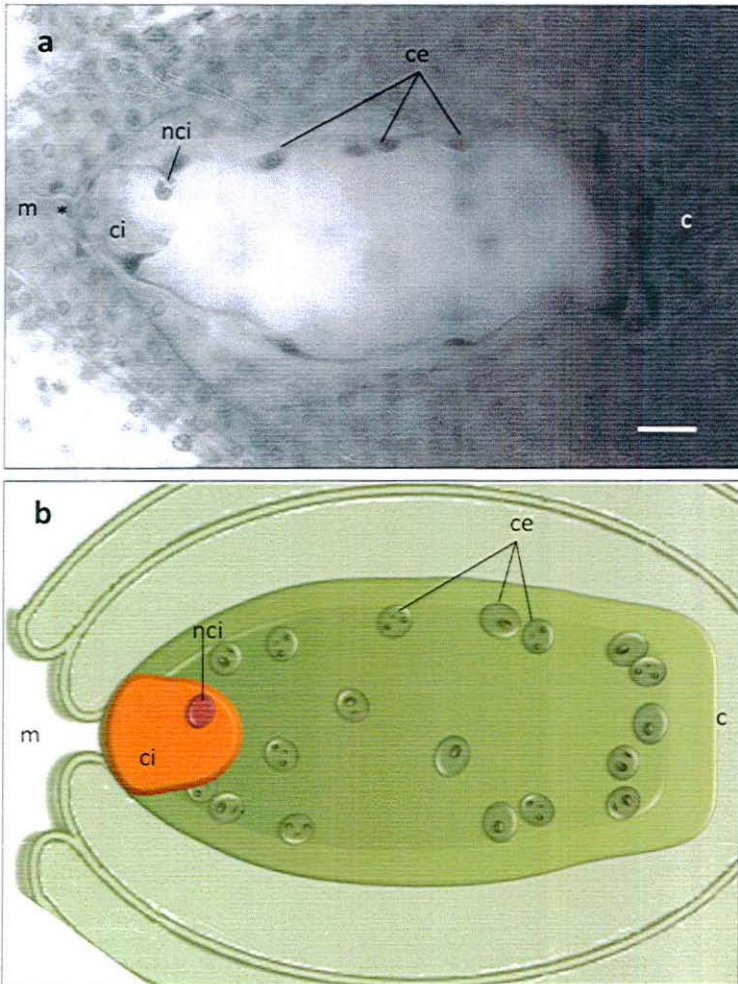


Figura 16. Cigoto 5DDP. **a)** Cigoto situado en el extremo micropilar del saco embrionario con su núcleo altamente polarizado hacia el extremo calazal y células del endospermo distribuidas a lo largo del saco embrionario. **b)** Representación esquemática del cigoto y las primeras células del endospermo. c=calaza, ce=células del endospermo, ci=cigoto, nci=núcleo del cigoto, m=micrópilo, asterisco=punto de entrada del tubo polínico. Barra=20 μ m.

8.6. SEXTO DÍA DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN

8.6.1. Caracterización del saco embrionario post-fecundación

Al sexto día después de la polinización el saco embrionario cambia radicalmente tanto en forma como tamaño, su forma es irregular y asemeja la de un corazón, las paredes que rodeaban al tubo haustorial calazal siguen empujando hacia la parte de la calaza abarcando el tejido nuclear formando de esta manera dos nuevos haustorios uno a cada lado del extremo calazal del saco divididos por un remanente de tejido que corresponde a un tejido llamado pedestal o “*postament*” (Fig. 18) y que incluye a su vez parte de la hipostasa del ovulo la cual conectaba al antiguo haustorio calazal con los tejidos vasculares del mismo. Existen varios registros acerca de la formación de haustorios calazales en especies del orden Asparagales, donde el endospermo en desarrollo invade secciones laterales de la nucela proximal, destruyendo el tejido lateral y dejando libre al centro al *postament* (Rudall, 1997). De manera similar, en el extremo micropilar se puede observar como la parte micropilar del saco donde se sitúa el cigoto comienza a recorrerse formando otro haustorio (haustorio micropilar).

8.6.2. Alargamiento del cigoto

Así mismo, se pudo apreciar el alargamiento del cigoto de 40 μm (5 DDP) a 60 μm aproximadamente (Fig. 19), sin embargo el ancho permanece constante al observado al quinto DDP (38-40 μm en promedio). Este alargamiento del cigoto esta reportado en *Arabidopsis thaliana* (Mansfield, 1991) donde la célula del cigoto se alarga aproximadamente tres veces su tamaño original. Las células del endospermo continúan dividiéndose rápidamente situándose mayormente en la región media y calazal del saco embrionario. Varias divisiones del endospermo ocurren antes de que se observe la primera división del cigoto, observaciones comparables a las hechas en *Amaranthus hypochondriacus* (Coimbra y Salema, 1999), lo que sugiere que la célula central es precoz en su desarrollo post fecundación.

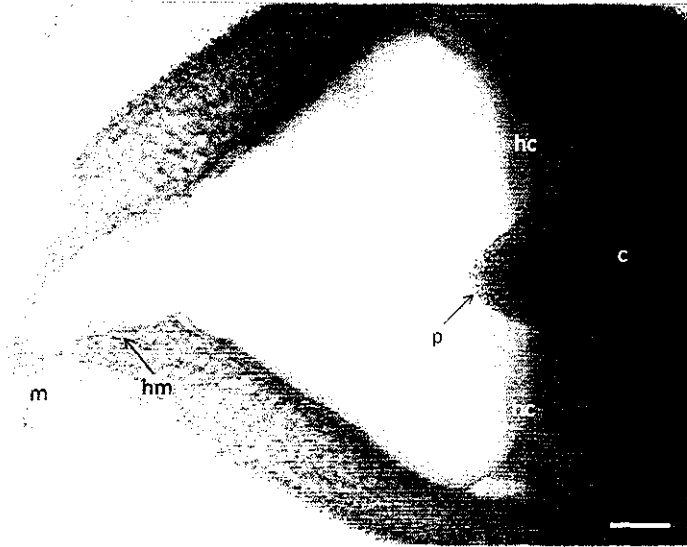


Figura 17. Saco embrionario 6 DDP. En el extremo calazal se observan los dos haustorios calazales divididos mediante el *postament*, en el extremo micropilar se forma el haustorio micropilar. c=calaza, p=*postament*, hc=haustorio calazal, hm=haustorio micropilar, m=micrópilo. Barra= 100 μ m.

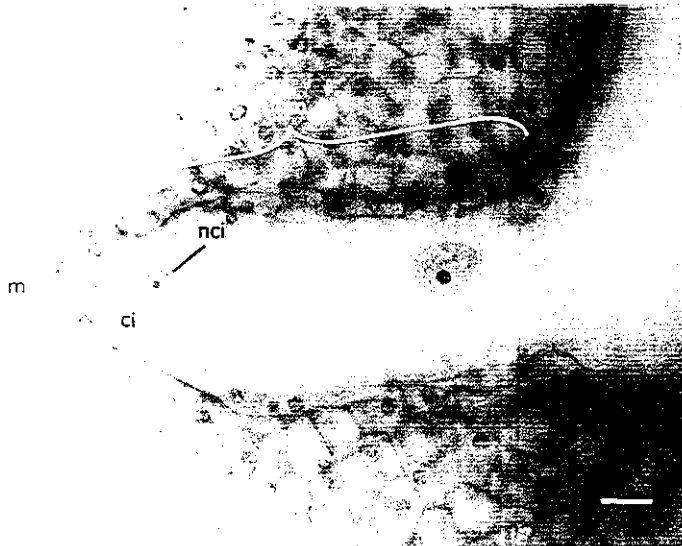


Figura 18. Cigoto 6 DDP. Alargamiento del cigoto. ci=cigoto, nci=núcleo del cigoto, e=célula del endospermo, m=micrópilo, hm=haustorio micropilar. Barra= 25 μ m.

8.7. OCTAVO DÍA DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN

8.7.1. Desarrollo temprano del embrión (primera división del cigoto)

Al octavo día después de la polinización se observa la primera división del cigoto (Fig. 20). Esta primera división se da en forma transversal y da lugar a dos células una basal y una apical la cual formará la cabeza embrional, proceso similar al descrito en la mayoría de las angiospermas (Lau y col., 2012). Al igual que en el cigoto el núcleo de la célula apical del embrión muestra una alta polaridad hacia el extremo calazal, esta polaridad mostrada desde el estado de cigoto resulta en la división asimétrica del embrión por lo que la célula apical se observa es de menor tamaño a la célula basal, y posee un gran núcleo bien definido, mientras la célula basal parece estar altamente vacuolada, lo cual ocurre de manera similar en gran parte de las plantas con flor (Rodríguez-Garay y col., 2000).

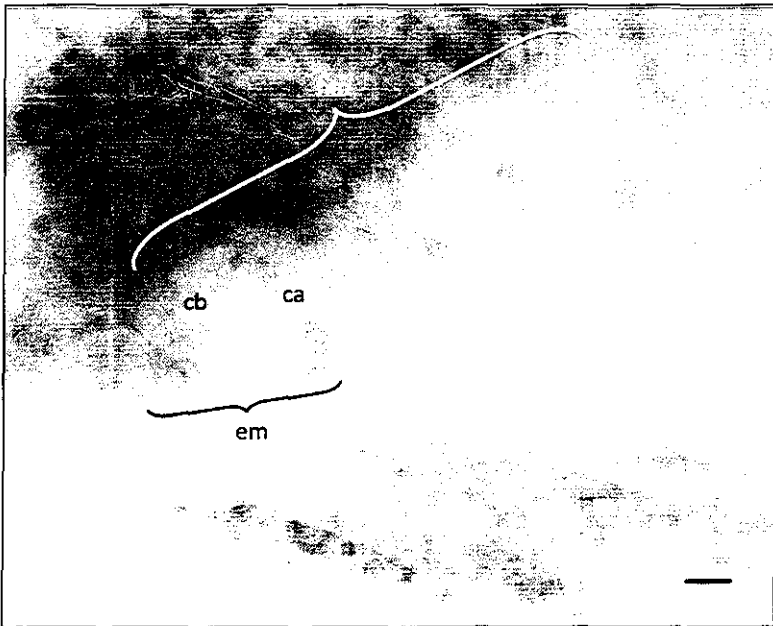


Figura 19. Primera división del cigoto. Primera división del cigoto, lo que da lugar a un embrión de dos células, la célula apical y la célula basal.. em=embrión, ca=célula apical, cb=célula basal hm=haustorio micropilar.. Barra=20 μ m.

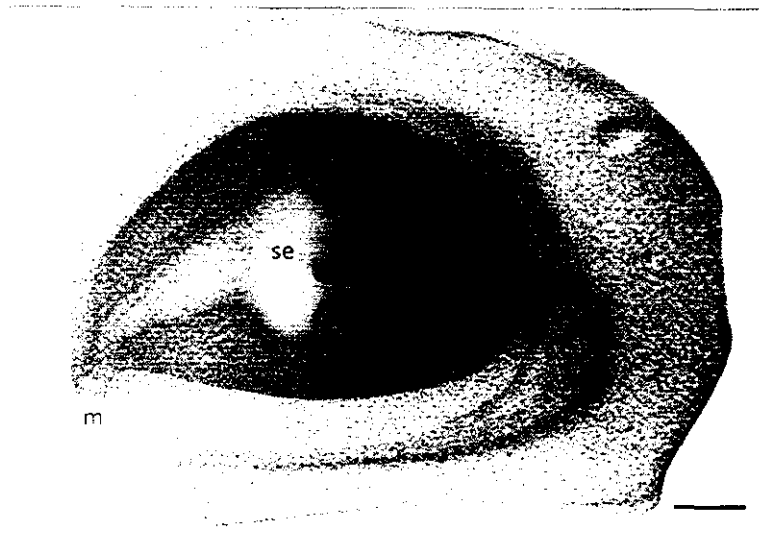


Figura 20. Semilla inmadura de *Agave tequilana* a 8 DDP. e=calaza, se=saco embrionario, m=micrópilo. Barra 200 μ m.

8.8. NOVENO DÍA DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN

En los óvulos pertenecientes a las preparaciones 9 DDP ninguna observación microscópica pudo ser realizada debido a la gran cantidad de endospermo dentro del saco embrionario así como al gran tamaño de las muestras.

9. CONCLUSIONES

1. El saco embrionario de *Agave tequilana* se desarrolla de acuerdo al patrón tipo Polygonum.
2. El saco maduro de *A. tequilana* coincide con la receptividad de los estigmas de las flores.
3. Las antípodas de los sacos maduros de *A. tequilana* son efímeras.
4. El núcleo de la célula central se encuentra altamente polarizado hacia el extremo calazal del saco embrionario.
5. El proceso de doble fecundación parece efectuarse de manera distinta a lo propuesto de manera general para la mayor parte de las plantas angiospermas, en *A. tequilana* el segundo núcleo espermático pasa a través de la célula huevo para llegar al núcleo de la célula central. Este proceso no había sido reportado en ninguna especie del género *Agave*.
6. La distancia que recorre el segundo núcleo espermático para fecundar la célula central es de aproximadamente 210 μm .
7. El núcleo del cigoto de *A. tequilana* se encuentra altamente polarizado hacia el extremo calazal al igual que el núcleo de la célula huevo.
8. En el saco embrionario post-fecundación se observa el desarrollo de estructuras representativas del orden Asparagales tales como el *postament*, los haustorios calazales y el haustorio micropilar.
9. La división del cigoto y formación del embrión se da de manera similar al patrón observado en la mayoría de las plantas angiospermas.
10. La adaptación de la técnica de clarificación-tinción propuesta por Stelly y col. (1984) permitió el análisis de un gran número de muestras sin que las células y tejidos analizados fueran alterados.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados del presente trabajo permiten proponer investigación adicional que complemente el estudio realizado. Las propuestas se resumen en los siguientes puntos:

1. Realizar un análisis ultraestructural de las células que conforman el saco embrionario maduro de *Agave tequilana*.
2. Realizar un análisis más detallado sobre el proceso de la doble fecundación, que incluya el uso de colorantes específicos que permitan detectar miosina y actina para observar el movimiento de los núcleos espermáticos a través del saco embrionario.
3. Realizar estudios de fertilización *in vitro* para lograr hibridaciones intra e intergenéricas en la familia Agavaceae para futuras investigaciones en el mejoramiento genético del género *Agave*.
4. Evaluar la homología entre embriogénesis somática y cigótica.

11. LITERATURA CITADA

- Angiosperm Phylogeny Group (APG III). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
- Barrell, P. J. y U. Grossniklaus. 2005. Confocal microscopy of whole ovules for analysis of reproductive development: the elongate1 mutant affects meiosis II. *Plant Journal* 43: 309-320.
- Bedinger, P. 1992. The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* 4: 879-887.
- Berg, R. F. 2003. Development of ovule, embryo sac, and endosperm in *Triteleia* (Themidaceae) relative to taxonomy. *Botany* 90: 937-948.
- Berger, F., Y. Hamamura, M. Ingouff y T. Higashiyama. 2008. Double fertilization-caught in the act. *Trends in Plant Science* 13: 437-443.
- Boavida, L. C., A. M. Vieira, J. D. Becker y J. A. Feijó. 2005. Gametophyte interaction and sexual reproduction: how plants make a zygote. *International Journal of Developmental Biology* 49: 615-632.
- Carlone, R. 1962. Research on the synchronism between the receptivity of the stigma and the macrosporogenesis in Golden delicious Apple. *Allitonia* 8: 1-18.
- Cave, M. S. 1948. Sporogenesis and embryo sac development of *Hesperocallis* and *Leucoocrinum* in relation to their systematic position. *American Journal of Botany* 35: 343-349.
- Chasan, R. y V. Walbot. 1993. Mechanisms of plant reproduction: Questions and approaches. *Plant Cell* 5: 1139-1146.
- Chehregani, A., F. Mohsenzade y M. Ghanad. 2011. Male and female gametophyte development in *Cichorium intybus*. *International Journal of Agriculture and Biology* 13: 603-606.

- Coimbra, S. y R. Salema. 1999. Ultrastructure of the developing and fertilized embryo sac of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Annals of Botany* 84: 781-789.
- Consejo Regulador del Tequila A. C. 2000. Anuario estadístico de producción del sistema Agave-Tequila. Consejo Regulador del Tequila. Guadalajara, Jalisco, México.
- Consejo Regulador del Tequila A. C. 2004. Inducción al Tequila. una tradición refinada. Consejo Regulador del Tequila. Guadalajara, Jalisco, México.
- Diario Oficial de la Federación: Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1993. Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial México. D. F.
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012. 2012. Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Secretaría de Economía. México. D. F.
- Díaz-Martínez, M., A. Nava-Cedillo, J.A. Guzmán-López, R. Escobar-Guzmán y J. Simpson. 2012. Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. Azul plants propagated asexually by three different methods. *Plant Science* 185-186: 321-330.
- Dolan, L., K. Janmaat, V. Willemsen, P. Linstead, S. Poethig, K. Roberts y B. Scheres. 1993. Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.
- Dresselhaus, T. 2006. Cell-cell communication during double fertilization. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 41-47.
- Dumas, C. y P. Rogowsky. 2008. Fertilization and early seed formation. *Comptes Rendus Biologies* 10: 715-725.
- Eguiarte, L., V. Souza y A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica Mexicana* 66: 131-150.
- Edlund, A. F., R. Swanson y D. Preuss. 2004. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant Cell* 16: S84-S97.

- Escobar-Guzmán, R. E., F. Zamudio-Hernández, K. Gil-Vega y J. Simpson. 2008. Seed production and gametophyte formation in *Agave tequilana* and *Agave americana*. *Botany* 86: 1343-1353.
- Fan, Y. F., L. Jiang, H. Q. Gong y C. M. Liu. 2008. Sexual reproduction in higher plants I: Fertilization and the initiation of zygotic program. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 860-867.
- García-Mendoza, A. J. 2002. Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and its endemic species in México. *Cactus and Succulent Journal* 74: 177-187.
- García-Mendoza, A. J. 2004. Agaváceas. pp.159-170. En: *Biodiversidad de Oaxaca* A.J. García-Mendoza, M.J. Ordóñez y M. Briones-Salas (eds.). Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wild Life Found, México.
- García-Mendoza, A. J. 2007. Los agaves de México. *Ciencias* 87: 15-23.
- Gentry, H. S. 1982. Agaves of Continental North America. University of Arizona. Press. Tucson Arizona.
- Good-Avila, S. V., V. Souza, B. S. Gaut y L. E. Eguiarte. 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 9124-9129.
- Grove, A. R. 1941. Morphological study of *Agave lechuguilla*. *Botanical Gazette* 103: 354-365.
- Guignard, M. L. 1899. Sur les anthérozoïdes et la double copulation sexuelle chez les végétaux angiospermes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 128: 864-871.
- Gutiérrez-Mora, A., D. Ruvalcaba-Ruiz, J. M. Rodríguez-Domínguez, M. M. Loera-Quezada y B. Rodríguez-Garay. 2004. Recent advances in the biotechnology of *Agave*: A cell approach. pp.17-36. En: *Recent Research Developments in Cell Biology*, S.G. Pandalai (ed.). Transworld Research Network, Kerala, India.
- Gutiérrez-Mora, A., A. G. González-Gutiérrez, B. Rodríguez-Garay, A. Ascencio-Cabral y L. Li-Wei. 2012. Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations. En: *Embryogenesis*, Ken-ichi Sato (ed.). InTech. Disponible en línea en:

<http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/somatic-embryogenesis-some-useful-considerations>.

- Haig, D. 1990. New perspectives on the angiosperm female gametophyte. *Botanical Review* 56: 236-274.
- Hamamura, Y., C. Saito, C. Awai, D. Kurihara, A. Miyawaki, T. Nakagawa, M. M. Kanaoka, N. Sasaki, A. Nakano, F. Berger y T. Higashiyama. 2011. Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 21: 497-502.
- Hamamura, Y., S. Nagahara y T. Higashiyama. 2012. Double fertilization on the move. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 70-77.
- Haseloff, J. 2003. Old botanical techniques for new microscopes. *Bio Techniques* 34: 1174-1182.
- Herr, J. M. Jr. 1993. Clearing techniques for the study of vascular plant tissues in whole structures and thick sections. pp.63-84. En: *Tested studies for laboratory teaching*, Volumen 5. C. A. Goldman, P. L. Hauta, M. A. O'Donnell, S. E. Andrews y R. van der Heiden (eds.). Proceedings of the 5th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE).
- Higashiyama, T., H. Kuroiwa, S. Kawano y T. Kuroiwa. 2000. Explosive discharge of pollen tube contents in *Torenia fournieri*. *Plant Physiology* 122: 11-13.
- Holloway, S. J. y W. E. Friedman. 2008. Embriological features of *Tofieldia glutinosa* and their bearing on the early diversification of monocotyledonous plants. *Annals of Botany* 102: 167-182.
- Honys, D., D. Reňák y D. Twell. 2006. Male gametophyte development and function. pp 76-87. En: Teixeira da Silva J. (ed.) *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*, 1ra edición Global Science Books, Londres
- Huang, B.-Q., E. S. Pierson, S. D. Russell, A. Tiezzi y M. Cresti. 1993. Cytoskeletal organization and modification during pollen tube arrival, gamete delivery and fertilization in *Plumbago zeylanica*. *Zigote* 1: 143-154.

- Huang, B.-Q. y S. D. Russell. 1994. Fertilization in *Nicotiana tabacum*: Cytoskeletal modifications in the embryo sac during synergid degeneration. A hypothesis for short-distance transport of sperm cells prior to gamete fusion. *Planta* 195: 200-214.
- Huang, B.-Q y W. F. Sheridan. 1994. Female gametophyte development in maize: microtubular organization and embryo sac polarity. *Plant Cell* 6: 845-861.
- Huber, H. 1969. Die Samenmerkmale und Verwandtschaftsverhältnisse der Liliifloren. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 8: 219-538.
- Kägi, C. y R. Groß-Hardt. 2007. How females become complex: cell differentiation in the gametophyte. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 633-638.
- Kennell, J. C. y H. T. Horner. 1985. Megasporogenesis and megagametogenesis in soybean, *Glycine max*. *American Journal of Botany* 72: 1553-1564.
- Kuhl, J. C., F. Cheung, Q. Yuan, W. Martin, Y. Zewdie, J. Mc Callum, A. Catanach, P. Rutherford, K. C. Sink, M. Jenderek, J. P. Prince, C. D. Town y M. J. Havey. 2004. A unique set of 11,008 Onion expressed sequence tags reveals expressed sequence and genomic differences between the monocot orders *Asparagales* and *Poales*. *Plant Cell* 16: 114-125.
- Lau, S., D. Slane, O. Herud, J. Kong y G. Jürgens. 2012. Early embryogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern. *Annual Review of Plant Biology* 63: 483-506.
- Li-Hua, A. y Y. Rui-Lin. 2004. Studies on nuclear degeneration programmed cell death of synergid and antipodal cells in *Triticum aestivum*. *Sexual Plant Reproduction* 17: 195-201.
- Li, W. y H. Ma. 2002. Gametophyte development. *Current Biology* 12: R718-R721.
- López-Díaz, S. y B. Rodríguez-Garay. 2008. Simple methods for *in vitro* pollen germination and pollen preservation of selected species of the genus *Agave*. *e-Gnosis* 6: 1-7.
- Ma, H. y V. Sundaresan. 2010. Development of flowering plant gametophytes. *Current Topics in Developmental Biology* 91: 379-412.

- Macías-Macías, A. 2001. El cluster en la industria del tequila en Jalisco, México. *Agroalimentaria* 13: 57-72.
- Magalhães de Souza, M., T. Santana-Pereira, M. Hoffmann, E. J. T. de Melo y R. Pereira-Louro. 2002. Embryo sac development in yellow passion fruit *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology* 25: 471-475.
- Maheshwari, P. 1937. A critical review of the types of embryo sacs in angiosperms. *New Phytologist* 36: 359-417.
- Maheshwari, P. 1948. The angiosperm embryo sac. *Botanical Review* 14: 1-56.
- Maheshwari, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. McGraw-Hill, New York, pp: 65-67.
- Mansfield, S. G. y L. G. Briarty. 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Canadian Journal of Botany* 69: 461-476.
- Mansfield, S. G., L. G. Briarty y S. Erni. 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac. *Canadian Journal of Botany* 69: 447-460.
- Mansfield, S. G., L. G. Briarty. 1994. Endosperm development. En: *Arabidopsis, an Atlas of Morphology and Development*. Bowman J. (ed.). Springer-Verlag, New York.
- Mascarenhas, J. P. 1989. The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell* 1: 657-664.
- Mc Cormick, S. 1993. Male gametophyte development. *Plant Cell* 5: 1265-1275.
- Mc Cormick, S. 2004. Control of male gametophyte development. *Plant Cell* 16: S142-S153.
- Mogensen, H. L. y H. K. Suthar. 1979. Ultrastructure of the egg apparatus of *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) before and after fertilization. *Botanical Gazette* 140: 168-179.
- Murguía, M., B.-Q. Iluang, S. C. Tucker y M. E. Musgrave. Embryo sac lacking antipodal cells in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 80: 824-838.
- Narvácz-Zapata, J. A. y F. L. Sánchez-Teyer. 2009. Agaves as a raw material: recent technologies and applications. *Recent Patents on Biotechnology* 3: 185-191.

- Nawashin, S. G. 1898. Resultate einer revision der befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella*. *Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de St-Petersbourg* 9: 377-382.
- Olsen, O-A. 2004. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: S214-S227.
- Palser, B. F., J.L. Rouse y E. G. Williams. 1992. Techniques for clearing ovules for studies of megagametophyte and early postfertilization development in *Rhododendron*. *Biotechnic and Histochemistry* 67: 207-218.
- Pires, J. C., I. J. Mauriceira, T. J. Givnish, K. J Sytsma, O. Seberg, G. Petersen, J. I. Davis, D. W. Stevenson, P. J. Rudall, M. F. Fay y M. W. Chase. 2006. Phylogeny, genome size and chromosome evolution of *Asparagales*. *Aliso* 22: 287-304.
- Piven, N. M., F. Barredo-Pool, I. C. Borges-Argáez, M. A Herrera-Alamillo, A. Mayo-Mosqueda, J. L. Herrera-Herrera y M. L. Robert. 2001. Reproductive biology of Henequén (*Agave furcroydes*) and its wild antecessor *Agave angustifolia* (Agavaceae). I Gametophyte development. *American Journal of Botany* 88: 1966-1976.
- Ramirez, I. V. y J. I. del Real-Laborde. 2007. Métodos de propagación del *Agave tequilana* Weber var. Azul. pp: 57-63. En: *Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana Weber en la zona de Denominación de Origen del Tequila*. Rulpho-Vilchis, F. O. (ed.). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, Jalisco, México.
- Rao, K. S. 1996. Embryogenesis in flowering plants: recent approaches and prospects. *Journal of Biosciences* 21: 827-841.
- Raymúndez, M. B., M. Escala y N. Xena de Enrech. 2008. Megasporogénesis y megagametogénesis en *Hymenocallis caribaea* (L.) Herb. (Amaryllidaceae) y algunas características de su desarrollo seminal. *Acta Botánica Venezolana* 31: 435-460.
- Reed, H. S. 1903. The development of the macrosporangium of *Yucca filamentosa*. *Botanical Gazette* 35: 209-214.

- Regen, L. 1941. The Development of the Embryo Sac in *Agave virginica*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 68: 229-236.
- Reiser, L. y R. L. Fischer. 1993. The ovule and the embryo sac. *Plant Cell* 5:1291-1301.
- Rodríguez-Garay, B., F. Santacruz-Ruvalcaba, M. M. Loera-Quezada y A. Gutiérrez-Mora. 2000. Embriogénesis sexual y somática en plantas. *Horticultura Mexicana* 8: 104-113.
- Rodríguez-Garay, B., A. Gutiérrez-Mora, M. M. Loera-Quezada y E. P. Flores-Berrios. 2004. La materia prima: *Agave tequilana* Weber var. Azul. pp:13-38. En: *Ciencia y Tecnología del Tequila: Avances y Perspectivas*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
- Rodríguez-Garay, B. 2011. Genetic improvement of agaves. 1st International Symposium on Agave. Agosto 29-Septiembre-2011. Guadalajara, Jalisco.
- Rudall, P. J. 1997. The nucellus and chalaza in monocotyledons: structure and systematics. *Botanical Review* 63: 140-181.
- Rudall, P. J. 1997. Embryology, cytology and systematics of *Hemiphylacus*, *Asparagus* and *Anemarrhena* (Asparagales). *Plant Systematics and Evolution* 211: 181-199.
- Rudall, P. J. 1999. Flower anatomy and systematics of *Comospermum* (Asparagales). *Systematics and Geography of Plants* 68: 195-202.
- Russell, S. D. 1978. Fine structure of megagametophyte development in *Zea mays*. *Canadian Journal of Botany* 57: 1093-1110.
- Russell, S. D. 1993. The egg cell: Development and role in fertilization and early embryogenesis. *Plant Cell* 5: 1349-1359.
- Russell, S. D. 1996. Attraction and transport of the male gametes for fertilization. *Sexual Plant Reproduction* 9: 337-342.
- Schulz, R. y W. A. Jensen. 1968. *Capsella* embryogenesis: the egg, zygote, and young embryo. *American Journal of Botany* 55: 07-19
- Schulz, P. 1973. *Capsella* embryogenesis: the central cell. *Journal of Cell Science* 12: 741-763.

- Shivanna, K. R. y D. C. Sastri. 1981. Stigma-surfase esterase activity and stigma receptivity in some taxa characterized by wet stigmas. *Annals of Botany* 47: 53-64.
- Sivaramakrishna, D. 1978. Size relationships of apical cell and basal cell in two-celled embryos in angiosperms. *Canadian Journal of Botany* 56: 1434-38.
- Soltis, P. S. y D. E. Soltis. 2004. The origin and diversification of angiosperms. *American Journal of Botany* 91: 1614-1626.
- Soltis, P. S., D. E. Soltis, M. W. Chase, P. K. Endress y P. R. Crane. 2004. The diversification of flowering plants. En: *Assembling the tree of life*. J. Crancraft y M. J. Donoghue (eds.). Oxford. University Press.
- Stelly, D. M., S. J. Peloquin, R. G. Palmer y C. F Crane. 1984. Mayer's Hemalum-Methyl Salicylate: A stain-clearing technique for observations within whole ovules. *Biotechnic and Histochemistry* 59: 155-161.
- Sundaresan, V. y M. Alandete-Saez. 2010. Pattern formation in miniature: the female gametophyte en flowering plants. *Development* 137: 179-189.
- Svoma, E. y J. Greilhuber. 1987. Studies on systematic embryology in *Scilla* (*Hyanthaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 161: 169-181.
- Tian, H. Q. y S. D. Russell. 1997. Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 202: 93-105.
- Tian, H. Q., T. Yuan y S. D. Russell. 2005. Relationship between double fertilization and the cell cycle in male and female gametes of tobacco. *Sexual Plant Reproduction* 17: 243-252.
- Tilton, V. R. 1978. A developmental and histochemical study of the female reproductive system in *Ornithogalum caudatum* Ait. using and electron microscopy. Tesis Doctoral. Iowa State University. Ames, Iowa.
- Tilton, V. R. 1980. Hypostase development in *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and notes on other types of modifications in the chalaza of angiosperm ovules. *Canadian Journal of Botany* 58: 2059-2066.

- Tilton, V. R. y H. L. Mogensen. 1980. Ultrastructural aspects of the ovule of *Agave parryi* before fertilization. *Phytomorphology* 29: 338-50.
- Tilton, V. R. y N. R. Lersten. 1981. Ovule development in *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) with a review of selected papers on angiosperm reproduction. III. Nucellus and megagametophyte. *New Phytologist* 88: 477-504.
- Tomer, E. y Y. M. Gottreich. 1976. Defective ovules in avocado cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101: 620-623.
- Toonen, M. A. J. y S. C. de Vries, 1996. Initiation of somatic embryos from single cells. pp. 173-189. En: *Embryogenesis: the generation of a plant*, T.L. Wang, y A. Cuming (eds.). Bios Scientific Oxford, Oxford, United Kingdom.
- Vázquez-García, J. A. y M. J. Cházaro. 2007. Agaves del Occidente de México. pp: 23-25. En: *Agaves del Occidente de México*, Vázquez-García J.A., Cházaro M.J., Hernández-Vera G., Flores-Berrios E. (eds.) Jalisco, México.
- Wang, H.-F., B. K. Kirchoff, H.-N. Qin y Z.-X. Zhu. 2009. Reproductive morphology of *Sargentodoxa cuneata* (Lardizabalaceae) and its systematic implications. *Plant Systematics Evolution* 280: 207-217.
- Watkins, G. M. 1937. Embryo-sac development in *Yucca Rupicola*. *American Journal of Botany* 24: 481-484.
- Webb, M. C. y B. E. S. Gunning 1990. Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*: Megasporogenesis, including the microtubular cytoskeleton. *Sexual Plant Reproduction* 3: 244-256.
- Wei-cheng, Z., Y. Wen-mei y L. Cheng-hou. 1988. The structural changes during the degeneration process of antipodal complex and its function to endosperm formation in wheat caryopsis. *Acta Botanica Sinica* 30: 457-462.
- Wetering, K. y S. D. Russell. 2004. Experimental analysis of the fertilization process. *Plant Cell* 16: S107-S118.
- Williams, J. H. y W. E. Friedman. 2004. The four-celled female gametophyte of *Illicium* (Illiciaceae; Austrobaileyales): implications for understanding the origin and early

- evolution of monocots, eumagnoliids, and eudicots. *American Journal of Botany* 91: 332-351.
- Wolf, F. T. 1940. Macrosporogenesis and the development of the embryo sac in *Yucca aloifolia*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 67: 755-761.
- Yadegari, R. y G. N. Drews. 2004. Female gametophyte development. *Plant Cell* 16: S133-S141.
- Yang, W. C., D. Q. Shi, y Y. H. Chen. 2010. Female gametophyte development in flowering plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 89-108.
- Ye, X.-L., E. C. Yeung y S.-Y. Zee. 2002. Sperm movement during double fertilization of a flowering plant, *Phaius tankervilleae*. *Planta* 215: 60-66.
- Yeung, E. C. y D. W. Meinke. 1993. Embryogenesis in Angiosperms: development of the suspensor. *Plant Cell* 5: 1371-1381.
- Zhang, D., L. Wang y L. Zhuo. 2011. Embryology of *Iris mandshurica* Maxim. (Iridaceae) and it's systematic relationships. *Plant Systematic Evolution* 293: 43-52.