

00346

8

2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACION
HISTOLOGICA Y BIOQUIMICA DE UN CULTIVO
EMBRIOGENICO DE MAIZ (*Zea mays L.*)
BAJO CONDICIONES *in vitro*."**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)**

P R E S E N T A :

BIOL. CRISTINA GARCIA FLORES



DIRECTORA DE TESIS: DRA. ESTELA SANCHEZ QUINTANAR.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA Y BIOQUÍMICA
DE UN CULTIVO EMBRIOGÉNICO DE MAÍZ (*Zea mays* L.) BAJO
CONDICIONES *in vitro*.**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM. Bajo la Dirección de la Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

Se agradece el valioso apoyo a las siguientes instituciones.

CONACYT

Por la beca otorgada con número de registro: 81531

Proyecto: Regulación de la expresión genética de Rubisco activasa en maíz y su relevancia en la producción de grano.
Clave: No. 400313-5-4825N

AI SNI

Por la beca otorgada como ayudante de investigador

A mi madre con amor

*A Columba por creer siempre en
mi y por el gran cariño que me
ha dado durante toda mi vida.*

A mis hermanos:
Adeleida, Rafael, Abelita, Columba,
Isabel, Paula, Guillermo y Rocio,
con mucho cariño

AGRADECIMIENTOS

Con un gran respeto y admiración quiero agradecer a la Dra. Estela Sánchez de Jiménez por toda su dedicación durante la realización de este trabajo de tesis.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán y al Dr. Abraham Rublío Islas, por formar parte de mi comite tutorial y el excelente asesoramiento durante la Maestría. Así mismo quiero agradecer a los integrantes de mi jurado: M. en C. Sonia Vazquez Santana, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Victor Manuel Chavez Avila, M. en C. Felipe Cruz García, por sus valiosas aportaciones durante la escritura de esta Tesis.

También agradezco a:

M. en C. Martín Vargas

M. en C. Raúl Aguilar

M. en C. Carlos Luna

Biól. Carlos Mujica

M. en C. Elpidio García

M. en C. Elvia Reynoso

Q. F. B. Aida Navas

Biól. Noé Alvarado

Ing. Teresa del Rosario

Por todo el apoyo que me han brindado para la realización de este trabajo, pero sobre todo por su gran amistad.

**De manera muy especial quiero manifestar mi agradecimiento a:
La Biól. Miriam Gonzales Varela y al M. en C. Fermín Pacheco Moisés
por todo su apoyo incondicional para la realización de este trabajo y
por su valiosa amistad.**

INDICE

	Página
RESUMEN.....	1
I.- INTRODUCCIÓN.....	3
II.- ANTECEDENTES.....	7
II.1. DIFERENCIACIÓN CELULAR EN PLANTAS SUPERIORES BAJO CONDICIONES <i>in vitro</i>	7
II.1.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN GRANÍNEAS.....	10
II.1.2. FACTORES IMPORTANTES PARA LA OBTENCIÓN DE CULTIVOS REGENERANTES.....	15
II.1.3. ASPECTOS BIOQUÍMICOS GENERALES, RELACIONADOS CON LA OCURRENCIA DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	17
II.2. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LA PARED CELULAR EN PLANTAS.....	20
II.3. ASPECTOS HISTOLÓGICOS DE CULTIVOS <i>in vitro</i> DE MAÍZ.....	26
III.- HIPÓTESIS.....	28
IV.- OBJETIVO GENERAL.....	28
IV.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
V.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
V.1. OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	30
V.2. TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN.....	32
V.3. SIEMBRA DE EMBRIONES.....	33
V.4. PREPARACIÓN Y BALANCE HORMONAL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	34
V.5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE DEL MEDIO Nº.....	37
V.6. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.....	38
V.7. RESIEMBRAS Y PARÁMETROS A EVALUAR.....	38

V.7.1. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA MICROSCOPIO OPTICO.....	40
V.7.2. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.....	45
VI.- RESULTADOS.....	55
VI.1. EFECTO DE LOS FITORREGULADORES EN LA INDUCCIÓN DE CALLO A PARTIR DE EMBRIÓN MADURO E INMADURO DE MAÍZ TUXPEÑO.....	55
VI.2. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA PARA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	59
VI.2.1. PRIMER EXPERIMENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO A PARTIR DE EMBRIONES MADUROS..DE MAÍZ.....	59
VI.2.2. SEGUNDO EXPERIMENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO A PARTIR DE EMBRIÓN MADURO.DE MAÍZ.....	68
VI.2.3. OBTENCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO A PARTIR DE EMBRIONES INMADUROS.DE MAÍZ TUXPEÑO.....	72
VI.3. EXPERIMENTO CON DIFERENTES FITORREGULADORES PARA INDUCIR LA GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.....	80
VI.4. OBTENCIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS A PARTIR DE EMBRIONES MADUROS E INMADUROS CON EL SISTEMA DE CIMMYT.....	83
VI.5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS.....	87
VI.6. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LA PARED CELULAR.....	103
VI.6.1. INFLUENCIA DE LAS AUXINAS EN EL RECAMBIO DE PROLINA- HIDROXIPROLINA EN PROTEÍNAS DE PARED DE MAÍZ TUXPEÑO MADURO.....	103
VI.6.2. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE PROLINA-HIDROXIPROLINA EN CULTIVOS <i>in vitro</i> DE MAÍZ PROVENIENTES DE EMBRIONES MADUROS E INMADUROS.....	114
VII.- DISCUSIÓN.....	118
VIII.- CONCLUSIONES.....	131
IX.- BIBLIOGRAFÍA.....	132

Índice de figuras

Figura		Página
1.-	Embrión maduro de maíz Tuxpeño (<i>Zea mays</i> L.), explante del cual se originó el tejido calloso.	31
2.-	Cultivos <i>in vitro</i> de maíz Tuxpeño	95
3.-	Histología de callo primario obtenido a partir de embrión inmaduro.	96
4.-	Histología de callo con 2 resiembras (T = 0), proveniente de embrión inmaduro.	97
5.-	Histología de callo que ha permanecido 6 (T = 6) días en medio de regeneración, proveniente de embrión inmaduro.	98
6.-	Histología de callo que ha permanecido 10 días en medio de regeneración, proveniente de embrión inmaduro.	99
7.-	Histología de callo primario obtenido a partir de embrión maduro.	100
8.-	Histología de callo que ha permanecido 10 días en medio de regeneración y que proviene de embrión maduro.	101
9.-	Histología de callo que ha permanecido 27 días en medio de regeneración y proviene de embrión maduro.	102
10.-	Proteínas totales de paredes celulares en ejes de embriones maduros de maíz Tuxpeño, germinados durante 48 h, a los cuales se les dió un pulso de Prolina- ¹⁴ C y se incubaron durante 5 h.	180
11.-	Proteínas totales de paredes celulares de callo embriogénico provenientes de embrión maduro de maíz Tuxpeño.	112
12.-	Representación gráfica de la relación Prolina - Hidroxiprolina de callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones maduros e inmaduros de maíz Tuxpeño.	117

Indice de diagramas de flujo

Diagrama		Pagina
1	Optimización de un sistema para embriogénesis somática, utilizando como explante al embrión complet y eje embrionario de maíz Tuxpeño maduro.	65
2	Optimización de un sistema para embriogénesis somática, empleando como explante al embrión completo de maíz Tuxpeño maduro.	70
3	Optimización de un sistema para embriogénesis somática, utilizando como explante al embrión inmaduro de maíz Tuxpeño.	74
4	Experimento con diferentes fitorreguladores e inducción de la germinación de embriones somáticos.	81
5	Obtención de callo embriogénico de maíz Tuxpeño utilizando el protocolo propuesto por CIMMYT.	85

Índice de tablas

tabla		Página
1 _____	Medio basal Chu <i>et al.</i> , 1975.	37
2 _____	Claves y requerimientos de los medios de cultivo utilizados.	38
3 _____	Técnica para la preparación de colorantes Safranina-Verde rápido, propuesta por Johansen (1974).	44
4 _____	Preparación de soluciones madre de inhibidores de proteasas.	48
5 _____	Inducción de callo a partir de embrión maduro (embrión completo y eje embrionario) e inmaduro de maíz Tuxpeño. En cada caso se presentan tanto las cantidades totales de callo obtenido al final del período de inducción, así como el rendimiento del explante utilizado en cada caso.	58
6 _____	Primera evaluación de los callos embriogénicos, obtenidos a partir de embriones completos y ejes embrionarios de maíz Tuxpeño.	66
7 _____	Segunda evaluación de callos embriogénicos para determinar la respuesta de regeneración.	67
8 _____	Evaluación de callos embriogénicos, obtenidos a partir de embriones maduros de maíz Tuxpeño.	71
9 _____	Primera y segunda evaluación de los cultivos obtenidos en ausencia de AgNO_3 .	78
10 _____	Primera y segunda evaluación de los cultivos obtenidos en presencia de AgNO_3 .	79
11 _____	Comportamiento del cultivo durante la inducción de la germinación y/o regeneración de embriones somáticos.	82
12 _____	Regeneración de plántulas de maíz Tuxpeño, en callos obtenidos a partir de embriones inmaduros.	86

13	Material utilizado para evaluar la influencia de las auxinas en la conversión de Prolina a Hidroxiprolina en ejes embrionarios de maíz Tuxpeño.	105
14	Resultados de la incorporación de Prolina ¹⁴ C en las proteínas de las paredes celulares de ejes germinados con diferentes concentraciones de auxinas.	106
15	Relación de Prolina-Hidroxiprolina (P/H) en las paredes celulares de ejes embrionarios maduros de maíz Tuxpeño.	107
16	Material utilizado para evaluar la transformación de Prolina a Hidroxiprolina en cultivos de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño.	111
17	Resultados de la cantidad de proteína y la incorporación de Prolina ¹⁴ C en las paredes celulares de cultivos embriogénicos provenientes de embriones maduros de maíz Tuxpeño.	111
18	Callo embriogénico obtenido de embriones maduros e inmaduros de maíz Tuxpeño.	116
19	Relación Prolina-Hidroxiprolina (P/H) en paredes celulares de callos embriogénicos, obtenidos a partir de embriones maduros e inmaduros de maíz Tuxpeño..	116

Abreviaturas utilizadas

2,4 - D	_____	Ácido 2, 4 diclorofenoxiacético
MCPP	_____	Ácido 2-(2-metil, 4-cloro fenoxi) propiónico
ABA	_____	Ácido abscísico
GA ₃	_____	Ácido giberélico
PMSF	_____	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
ppm	_____	Partes por millón
rpm	_____	Revoluciones por minuto
SDS	_____	Dodecil sulfato de sodio
N6	_____	Medio de cultivo de Chu
MS	_____	Medio Murashige y Skoog
AVG	_____	Aminoethoxivinil-glicina
ACC	_____	Ácido 1 aminociclopropano 1 carboxilo
AgNO ₃	_____	Nitrato de plata
STS	_____	Tiosulfato de plata
DFMO	_____	DL-alfa difluorometilornitina
ODC	_____	Ornitina descarboxilasa
ADC	_____	Arginina descarboxilasa
SAM	_____	S-adenosil metionina
KDa	_____	Kilodaltons
TCA	_____	Ácido tricloroacético
nm	_____	Nanómetros

HC	_____	Hidrolizado de caseína
μM	_____	Micrómolar
μl	_____	Micrólitro
μm	_____	micrómetros
μg	_____	Micrógramo
μCi	_____	Micrócuries
mCi	_____	Milicuries
mmol	_____	Milimoles
mM	_____	Millimolar
mg	_____	Miligramo
ml	_____	Millilitro

RESUMEN

El fenómeno de embriogénesis somática implica la formación de un embrión a partir de una célula que forma parte del cuerpo de la planta. Ésto tiene como base el principio de **totipotencialidad celular**, es decir, que cada célula es capaz de generar un organismo completo, dado que tiene toda la información genética para ello; lo que significa que una célula normal puede ser inducida a ser preembriogénica, posteriormente embriogénica y finalmente podrá generar un embrión somático.

El objetivo de este trabajo es generar callos embriogénicos a partir de embriones maduros e inmaduros de maíz criollo, así como el estudio de la ocurrencia del proceso embriogénico desde el punto de vista histológico y analizar parcialmente la constitución bioquímica de la pared celular de los callos normales (no embriogénicos) y embriogénicos.

Se utilizó una raza de maíz criollo de zonas tropicales de México conocido como Tuxpeño; el cual presenta una gran variabilidad genómica y por tal motivo se consideró importante para determinar la eficiencia de inducción de callo.

El mejor medio de inducción para los dos tipos de explantes fue el N6, suplementado de AgNO_3 y Dicamba. Las características de callo embriogénico las presentaron los cultivos que se originaron de embrión inmaduro. Más tarde cuando se optimizó el sistema para la obtención de embriones somáticos se observó que es determinante para este fin la presencia en el medio de AgNO_3 , siendo mejor su efecto cuando se adicionó durante la etapa de inducción de callo, otro aspecto importante fue la disminución de auxina y la adición de kinetina en el medio de cultivo.

En cuanto a la constitución bioquímica de la pared, se cuantificó la incorporación de L-prolina- ^{14}C a proteínas de pared celular y su transformación a

hidroxiprolina. Los resultados obtenidos indicaron que en los cultivos que se originaron de embriones inmaduros, la relación de prolina/hidroxiprolina fue siempre menor que la obtenida de embrión maduro. En los primeros cultivos la cantidad de hidroxiprolina fue alta y dos semanas después de pasados al medio de regeneración disminuye y se estabiliza. Los cultivos que provinieron de embrión maduro presentaron incremento en las cantidades de prolina, principalmente hacia la tercera semana en el medio de cultivo y ésto correlaciona con la baja eficiencia del cultivo para generar embriones somáticos.

Esto podría significar que en la célula, debe activarse la ruta correspondiente para que ocurra el proceso de hidroxilación en la prolina y entonces el cultivo pueda ser embriogénico, lo cual implicaría que la ocurrencia de dicho proceso podría ser un marcador de cultivos embriogénicos en maíz.

Al realizar el análisis histológico de los cultivos tanto con características embriogénicas como en las estructuras observadas en el medio de regeneración, se encontró que en los cultivos provenientes de embriones maduros se formaron centros meristemáticos y se conservaron restos de tejido del explante original. Cuando se encontraron en medio de regeneración sólo se formaron raíces y porciones de tejido limitado por una epidermis, en las células se observaron plastos y grandes vacuolas de almidón y/o lípidos. Esto último implica que ya existía un alto nivel de organización y especialización del tejido. En cuanto a los cultivos provenientes de embrión inmaduro, se localizaron abundantes centros meristemáticos y la formación de embriones somáticos alargados. De estos cultivos se regeneraron brotes que se desarrollaron a plantas completas, las cuales se llevaron a suelo y posteriormente a campo, pudiéndose obtener plantas maduras, que fueron capaces de producir semillas viables. Esto nos permite concluir que el estado fisiológico del explante es determinante para obtener una respuesta morfogénica (embrión somático y/o brote) y finalmente este evento puede ser independiente del genotipo de la especie en estudio.

I.- INTRODUCCIÓN

El desarrollo de plantas *in vitro* a partir de regiones meristemáticas es un fenómeno conocido desde años atrás. Las células meristemáticas proliferan, se distribuyen en capas, eventualmente se van diferenciando para formar tejidos y posteriormente órganos. Este fenómeno característico de las plantas, puede ocurrir por organogénesis (formación de primordios de tallo, seguida de la parte aérea de la plántula y su enraizamiento), o por embriogénesis somática (formación de embriones somáticos, los cuales sufren cambios en su estructura y organización semejantes a los que ocurren en la embriogénesis cigótica). Estos eventos pueden ocurrir en forma directa (a partir de un explante original) o bien indirecta (a partir de callo), y dependen de factores exógenos y endógenos que actualmente todavía no se conoce como puedan ser controlados en su totalidad. Es por tal motivo que las técnicas de cultivo *in vitro* están siendo ampliamente utilizadas y actualmente, el proceso de embriogénesis somática tiene perspectivas de estudio más amplias.

Bajo condiciones *in vitro*, este proceso se reportó en 1958 y a partir de esa fecha hasta la actualidad, se tiene la inquietud de esclarecer cuales son los factores responsables de su inducción, motivo por el cual se han estudiado aspectos como: tipo de explante, medio de cultivo, nutrientes, fitorreguladores, régimen de subcultivo, condiciones de incubación, genotipo, etc.

En sí, el estudio del procedimiento de embriogénesis indirecta implica el establecimiento de callos con división celular activa y la posterior selección a través de los subcultivos del tipo celular requerido. El medio y las condiciones de cultivo actúan como sistema selectivo, favoreciendo la multiplicación de algunos tipos celulares que llegan a ser dominantes en el sistema. Los callos así

seleccionados son estimulados para formar embrioides, por manipulaciones en la relación auxina-citocinina del medio (Anke *et al.*, 1993).

Aunque este método para lograr la diferenciación no se puede aplicar a todas las especies con igual grado de éxito, se ha logrado establecer que cuando la concentración de auxinas es alta en las fases iniciales de cultivo y posteriormente se elimina, se induce la diferenciación de embriones somáticos. A través de estas técnicas las células somáticas pueden ser inducidas hacia un proceso embriogénico por medio del cual se diferenciarán estructuras bipolares similares a los embriones cigóticos (Komamine *et al.*, 1982).

No se conocen con certeza cuales son las bases moleculares que rigen a los procesos de diferenciación. Se sabe por algunos reportes (Barrat *et al.*, 1991; Sterk *et al.*, 1991; Hilbert *et al.*, 1992;) que se producen cambios previos a las alteraciones morfológicas, lo cual se establece una selectividad en la expresión de la capacidad genética de las células. Ya han sido monitoreados con parámetros bioquímicos algunos aspectos metabólicos de la diferenciación. Los cambios más interesantes sugieren que en los tejidos en los que se inician procesos de diferenciación, se acelera la síntesis de ADN, ARN y de proteína; probablemente porque son requeridos para la estructuración del órgano en proceso de formación (Claparols *et al.*, 1993).

Aunque ya se sabe que el proceso de diferenciación celular está inducido por diversos elementos nutricionales, hormonales y ambientales, el conocimiento de como se induce y controla el proceso es todavía muy pobre y en general empírico. Por ejemplo, el cambio de concentración de hormonas en el medio es el factor que más se reconoce como iniciador del proceso, sin embargo, no se cuenta con información acerca de las concentraciones endógenas de estas hormonas en

los tejidos y no se comprende con claridad el mecanismo a través del cual se producen los cambios metabólicos que finalmente conducen a la embriogénesis somática o a la organogénesis.

En particular existen pocos estudios bioquímicos en relación a **embriogénesis somática en maíz**; sin embargo, ya se sabe que existen factores como el cambio de concentración hormonal, la fuente nitrogenada, la presencia de nitrato de plata y la presión osmótica del medio, que han demostrado ser determinantes para la manifestación de este proceso (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1979; 1981; Williams y Maheswaran, 1986; Duncan y Widholm, 1987; Roustan *et al.*, 1990; Emons *et al.*, 1993).

Existe la idea generalizada en relación a que el genotipo de maíz usado como fuente de explante es determinante de la capacidad celular para formar embrioides, y se consideran sólo unas pocas líneas celulares definidas como **embriogénicas** (Wilkson y Thompson, 1987; Sheridan, 1988; Smith y Krikorian, 1989 y Liu *et al.*, 1993).

Por otra parte, resultados obtenidos en nuestro laboratorio (García *et al.*, 1993), han demostrado que algunos genotipos de maíz criollo de alto nivel de consumo, y por tanto de gran importancia económica, responden favorablemente en condiciones *in vitro* a los incrementos de sacarosa y las concentraciones de nitrato de plata en los cultivos, para inducir la formación de embriones somáticos.

En la actualidad existen reportes que relacionan el proceso embriogénico con el ciclo de división celular a través del monitoreo con indicadores bioquímicos. Por este tipo de estudios se ha logrado registrar un incremento transitorio y específico de las enzimas involucradas en la vía de la biosíntesis de pollaminas, en la de pirimidinas; así como en las del ciclo de las pentosas, que se producen

solamente en cierta etapa del ciclo celular (Rao *et al.*, 1990). De esto se puede deducir que los procesos regulatorios de la síntesis de ADN, ARN y de otros elementos participantes del ciclo de división celular, son críticos para la inducción de embriogénesis.

También se ha sugerido que ocurren cambios en la constitución de la pared celular provocados por la adición de auxinas como Dicamba y 2,4-D (Kieliszewski y Lampert, 1987; 1992; Ludevid *et al.*, 1990 y Ruiz-Avila *et al.*, 1991), y por tanto el estudio de este último punto contribuya a una mejor comprensión de la ocurrencia del fenómeno de embriogénesis somática en plantas.

Dada la complejidad del fenómeno, se planteó la necesidad de realizar un estudio Interdisciplinario que permitiera establecer correlación entre los cambios bioquímicos y las modificaciones morfológicas que ocurren en los tejidos durante la diferenciación. Para completar estos estudios es necesario contar también con la caracterización a nivel microscópico de los cambios ocurridos a través de análisis histológico.

La importancia de este trabajo consistió por tanto en obtener cultivos embriogénicos a partir de embriones maduros e inmaduros de un maíz criollo para conocer la influencia del estado fisiológico del explante en la manifestación de la respuesta morfogénica y dar seguimiento al proceso, integrando el estudio histológico con aspectos bioquímicos. Además la significancia de este trabajo radica en haberlo realizado en maíz criollo, lo cual implica una gran variabilidad genómica (en comparación con las líneas embriogénicas) y una importancia económica para el país. Lo anterior significaría que las variedades criollas de maíz podrían ser un recurso de alto potencial económico, para que a través de su manipulación bajo condiciones *in vitro*, se pudiera mejorar esta especie.

II.- ANTECEDENTES

II.1.- DIFERENCIACIÓN CELULAR EN PLANTAS SUPERIORES BAJO CONDICIONES *in vitro*.

Los fenómenos de diferenciación y desdiferenciación celular en plantas se manifiestan ampliamente en la naturaleza. Para su estudio se requiere de un área interdisciplinaria, en donde la embriología y otras disciplinas relacionadas con el desarrollo han reportado los primeros avances y conocimientos científicos para su comprensión. Durante muchos años, los estudios y las investigaciones al respecto se habían limitado a ser de tipo descriptivo debido a la complejidad del mismo. Así entonces a medida que otras áreas de la ciencia progresan, el concepto de la diferenciación celular se va transformando, por lo cual en estos últimos años se han aportado conocimientos muy importantes que permiten un avance significativo en la comprensión de este fenómeno.

Los embriones cigóticos se originan normalmente a partir de la fecundación, es decir, un núcleo espermático fecunda a la ovocélula, formando al cigoto. Éste a través de divisiones celulares en planos definidos y a través de un proceso de crecimiento característico, produce el embrión cigótico. Dichas estructuras pueden también obtenerse a través de un proceso llamado **embriogénesis somática**, mediante el cual el embrión se origina a partir de cualquier célula de la planta. Este proceso se manifiesta bajo condiciones *in vitro* y los embriones somáticos pueden desarrollarse hasta formar una planta completa.

Un **embrión somático** se define como una estructura bipolar producida de manera asexual (Raghavan *et al.*, 1976), que carece de una conexión vascular con el tejido madre que puede ser desde un punto de vista funcional y anatómico similar

a un embrión producido de manera sexual, motivo por el cual será capaz de desarrollarse y generar una planta completa.

Los principales eventos de la embriogénesis somática pueden ser divididos en varias categorías: inducción, crecimiento temprano, maduración del embrión y germinación.

Uno de los primeros autores en describir el proceso de embriogénesis somática fue Steward y colaboradores (1958), en cultivos celulares de zanahoria (*Daucus carota* L.) en medio líquido y por Reinert y colaboradores (1959), en cultivos de callos en medio sólido de la misma especie. Hasta la fecha, en más de 30 familias de plantas se sabe de la manifestación de dicha respuesta, empleando para ello una gran variedad de explantes, tales como: hojas, tallos, peciolo, nucela, tegumento, sinérgidas, etc.

Para que los embriones somáticos se manifiesten existen dos vías: la directa, que no requiere de la formación de tejido caloso y la vía indirecta, cuyo requisito es la formación de tejido caloso antes de la formación del embrión somático.

El fenómeno de embriogénesis somática es una cualidad muy especial de las células vegetales, que se pueden manifestar tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo cual, es posible que dicho evento esté regulado por mecanismos represivos, la ausencia de los cuales podrían determinar su manifestación (Carman, 1990). Así entonces, los factores más importantes que inducen la formación de embriones somáticos son: el genotipo, el grado de diferenciación del explante (Tomes y Smith, 1985), los constituyentes del medio de cultivo (Duncan *et al.*, 1985), la presión osmótica en el medio de cultivo (Close y Luderman, 1987; Brown *et al.*, 1989), el metabolismo nitrogenado (Dougall y Verma, 1978), luz y temperatura.

Puede considerarse que para que se dé el proceso de embriogénesis somática (en el caso de la vía indirecta), primero debe de ocurrir la inducción de la

citodiferenciación de las células preembriónicas y posteriormente el desarrollo de estas células para formar al embrión somático (Carman, 1990). Esto implica que en el cultivo (callo) se debe promover una aceleración de divisiones celulares, de tal manera que se presente un cambio en la periferia del callo de liso a ondulado (Cure y Mott, 1978; Springer *et al.*, 1979; Botti y Vasil, 1983; Maheswaran y Williams, 1985 y Carman, 1990). Por tanto dicha ondulación es indicio de la proliferación activa de las células superficiales, las cuales se rigen por un patrón característico de segmentación, dando lugar a la formación de un embrión somático.

El proceso de embriogénesis somática (por vía directa o indirecta) es sumamente complejo, difícil de caracterizar y se le ha descrito como de tipo eminentemente plástico en su desarrollo (Geri *et al.*, 1994). En cuanto a los eventos bioquímicos que preceden a los cambios morfológicos observados, se conoce aún muy poco. Hay especies como zanahoria (Komamine *et al.*, 1990), en las cuales ya se han podido caracterizar muchas de las reacciones involucradas en este proceso, sin embargo, en la mayoría de las especies son pocos los avances al respecto.

Esta plasticidad es el resultado de cambios en el tiempo y extensión de los eventos de organización. En comparación con la secuencia normal, algunos cambios pueden ser prematuros o retrasados, la longitud de su expresión puede alargarse o acortarse y los efectos pueden ser manifestados a niveles celulares de tejidos o de órganos. Además de esto, los embriones somáticos responden a alteraciones en el medio de cultivo, motivo por el cual las secuencias morfogenéticas pueden ser afectadas (Anke *et al.*, 1993).

II.1.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN GRAMÍNEAS

Muchas de las especies que pertenecen al grupo de las gramíneas se han establecido bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Sin embargo en muy pocas de ellas se ha logrado que se manifiesten embriones somáticos. En particular este grupo de plantas presenta muchas dificultades para manipularse sin perder la viabilidad del cultivo. A pesar de todos los inconvenientes que implica trabajar con este grupo de plantas, se han reportado algunos avances:

Norstog *et al.* (1970) fueron los primeros que reportaron la formación de embriones somáticos, emplearon como explante inicial embriones inmaduros de cebada, pero no lograron el desarrollo de plantas completas.

El grupo de Green (1974) fue uno de los pocos que logró la obtención de cultivos (callos) a partir de embriones maduros de maíz, los mantuvieron durante 20 semanas, pero no observaron ninguna otra respuesta embriogénica en sus cultivos.

Más tarde se determinó que cuando se utilizan embriones inmaduros de gramíneas, el callo prolifera por divisiones de las células subepidérmicas del escutelo y del nudo escutelar. En el caso del tejido maduro o casi diferenciado se ha visto que no parece ser capaz de presentar una respuesta morfogénica (Vasil, 1982); esto podría deberse, a que en el momento en que se da la especialización de las células para formar parte del tejido maduro, el cambio que se produce es irreversible, motivo por el cual no se expresa tan fácilmente el potencial morfogénico de la célula.

Green y Phillips (1975) obtuvieron callos con capacidad morfogénica a partir de tejido escutelar, empleando embriones inmaduros de 14 días después de la polinización. En este caso el callo obtenido en presencia de 2,4-D, se colocó en un medio de cultivo libre de fitoreguladores y de los embriones obtenidos se formaron plantas completas, mismas que se pasaron a suelo, sin embargo, fueron muy pocas las que crecieron normalmente.

Mascarenhas *et al.* (1975) lograron establecer cultivos de maíz a partir de segmentos de raíz, de los cuales regeneraron plantas completas.

Sánchez de Jiménez y Albores (1979) reportaron el efecto del 2,4-D y MCPP, que son dos auxinas sintéticas, en la inducción de callo, a partir de varios tipos de explante (embrión maduro, tallo y raíz) de diferentes genotipos criollos de maíz, concluyeron que el MCPP puede reemplazar con grandes ventajas al 2,4-D, tanto en la inducción como en el mantenimiento del callo.

Lu *et al.* (1982) fueron los primeros en reportar la obtención de embriones somáticos en callos obtenidos de embriones inmaduros.

Green, (1982) logró obtener la misma respuesta, puntualizando que los callos empleados fueron friables, y con la finalidad de incrementar la osmolaridad en el medio de cultivo y favorecer la formación de embriones somáticos incrementa la concentración de sacarosa al 6 %.

Torné *et al.* (1984) obtuvieron plantas a partir de embriones inmaduros. En este caso germinaron embriones y utilizan células del mesocotilo como explante para la obtención de los callos regenerables de consistencia friable. Resaltando que la capacidad de expresión de la totipotencialidad celular en tejidos de maíz depende del grado de maduración del explante inicial. Sánchez de Jiménez *et al.* (1981) emplearon material maduro (embrión) y una citocinina para mejorar la respuesta de formación de callo.

Vasil *et al.* (1983) emplearon concentraciones altas de sacarosa al inicio del cultivo y posteriormente fueron disminuyendo porque observaron que este era importante para inducir embriogénesis somática. Además discutieron la importancia que tiene el genotipo para la obtención de una respuesta morfogénica bajo condiciones *in vitro*. En el siguiente año (Vasil *et al.*, 1984) obtuvieron callos embriogénicos a partir de embriones inmaduros, en este trabajo se hizo referencia a un callo friable y otro compacto, mismo que caracterizaron como callo embriogénico. Así en 1986, reportaron la regeneración de plantas a partir de

callos friables y de cultivos en suspensión, sin embargo el sistema no tuvo mucho éxito.

A partir de 1984 surgieron más grupos de investigación que reportaron investigaciones acerca de las aptitudes del maíz bajo condiciones *in vitro*, los trabajos sobresalientes al respecto son los presentados por Beckert y Qing (1984) quienes realizaron experimentos con varios genotipos de maíz, con la finalidad de evaluar su comportamiento bajo condiciones *in vitro*, ésto les permitió generar líneas celulares con características muy particulares.

Torné *et al.* (1984) obtuvieron cultivos totipotentes a partir de tejidos atrofiados y lograron obtener plantas completas. Santos *et al.* (1984) presentaron un método para la obtención de callo regenerable a partir de segmentos de plántulas de maíz. Lowe *et al.* (1985) obtuvieron callos con dos años de edad, en cuya superficie se encuentran embriones somáticos, mismos que regeneraron a plantas completas, además plantearon la existencia de varios tipos de callo embriogénico. Tomes (1985) indicó que el genotipo puede influir en la respuesta de regeneración y es en este reporte en el que realmente se hizo hincapié de manera detallada acerca de la existencia de dos tipos de callo embriogénico para maíz, el que se llamó tipo I: callo firme, generalmente compacto, de tamaño pequeño, constitución compleja, en ocasiones puede tener apariencia mucilaginoso y de crecimiento muy lento. El otro, llamado tipo II: es un tejido calloso friable, con los embriones somáticos bien definidos en su superficie, son de mayor tamaño que los callos tipo I y su crecimiento es rápido.

Kamo *et al.* (1985) reportaron que además de un incremento de sacarosa, el medio N6 fue favorable para la obtención de callo tipo II, de los cuales obtiene plantas con un fenotipo normal. Armstrong y Green (1985) obtuvieron callo embriogénico tipo II, en este caso emplearon el medio N6 adicionado de L-prolina, lo relevante fue que dicho compuesto incrementó la frecuencia de embriones somáticos, ya que puede ser una fuente importante de nitrógeno y es más efectivo que la glutamina.

Duncan *et al.* (1985) reportan un trabajo bastante amplio en el cual emplearon 202 genotipos, logrando regenerar plantas completas a partir de embriones inmaduros de maíz e incrementan por medio de cruzas (híbridos) la producción de semillas. Con base en sus resultados concluyeron que existen limitaciones genéticas que rigen el proceso de regeneración en plantas. Este grupo continuó con sus investigaciones con la finalidad de determinar la influencia de la L-prolina en el medio de cultivo, y observaron que dicho compuesto favoreció la respuesta embriogénica, como ya había sido reportado por Armstrong y Green (1985) y también hace a que los cultivos sean tolerantes a bajas temperaturas.

Como se puede observar cada vez se abordaron más aspectos que puedan modificar la respuesta de embriogénesis somática, motivo por el cual surgen grupos de trabajo que han tratado de buscar alternativas para lograr la regeneración de plantas de maíz, cuyo punto final es mejorar la producción de esta especie.

Surgieron trabajos como el de Novak y colaboradores (1987), quienes realizaron experimentos con líneas híbridas, abordaron el problema de la variabilidad genética inducida por radiaciones gama. Close y Luderman (1987), hicieron un estudio detallado del efecto de la asimilación de auxinas y los niveles altos de sacarosa, obtuvieron los mejores callos embriogénicos a concentraciones bajas de auxinas y observaron la misma respuesta cuando emplearon ABA en el medio de cultivo.

Kamo *et al.* (1987) fueron los primeros que reportaron la formación de callos embriogénicos a partir de protoplastos de maíz, empleando cultivos en suspensión, los cuales establecieron a partir del callo tipo II, obtenido de embriones inmaduros. Rhodes *et al.* (1988) y Shillito (1989) reportaron la obtención de plantas completas a partir de protoplastos aislados de callos embriogénicos.

Wilkinson y Thompson (1987) analizaron la interacción genotipo-medio de cultivo en la obtención de callo regenerable, postularon que la respuesta bajo condiciones *in vitro* es dependiente del genotipo por la variación genómica que representa.

Wang (1987) obtuvo de embriones somáticos a partir de embriones maduros y la regeneración de plantas adicionando Dicamba en el medio de cultivo.

Yong-Hwan y Janick (1991) reportaron que en presencia de ABA y prolina, los cultivos de callos presentaron una mejor tolerancia a la desecación, pero además se incrementó el contenido de ácidos grasos en las células que forman parte del embrión somático.

Barloy y Beckert (1993) obtuvieron embriones somáticos en callos originados de anteras jóvenes, indicando que su metodología fue eficiente para maíz.

Permingeat *et al.* (1994) publicaron un protocolo en el que resaltaron la importancia del contenido de aminoácidos y de giberelinas en el medio, proponiendo que estos elementos fueron determinantes para la germinación y la regeneración de plantas de maíz.

Durante todo este periodo se ha tratado de optimizar la composición de los medios de cultivo, determinar las características del explante del cual debe partirse para establecer el cultivo *in vitro* y caracterizar la variabilidad de la respuesta utilizando nuevos genotipos.

Hasta este momento se han logrado avances importantes que tratan de explicar los procesos involucrados en el establecimiento, mantenimiento, expresión de la totipotencialidad y la variabilidad de los cultivos de callos de maíz. Se reconoce que no todos los genotipos son capaces de producir estructuras regenerativas y que según sea la vía de regeneración (organogénesis y embriogénesis), los sistemas de cultivo varían en sus requerimientos (Petolino y Cowen, 1994).

II.1.2.- FACTORES IMPORTANTES PARA LA OBTENCIÓN DE CULTIVOS REGENERANTES

Desde hace ya muchos años se ha tratado de elucidar cuales son los factores que determinan que un cultivo *in vitro* manifieste su potencial morfogénico (organogénesis y/o embriogénesis). Actualmente existe ya un consenso en algunos aspectos del cultivo *in vitro* de maíz que se pueden resumir en la siguiente forma:

I.- El embrión inmaduro (de no más de 2 semanas después de la polinización) es el explante más adecuado para el establecimiento de un cultivo de maíz bajo condiciones *in vitro*.

II.- El 2,4-D, MCPP y el Dicamba son las auxinas que más favorecen la formación de tejido calloso.

III.- La disminución de los niveles de auxina, o bien su eliminación, contribuye a la formación de embriones somáticos y/o regeneración de brotes.

IV.- Los medios de cultivo utilizados son los propuestos por Murashige y Skoog, (1962) y por Chu *et al.* (1975), a los cuales se les hacen algunas modificaciones, dependiendo del tipo de estudio que se quiera abordar.

V.- La sacarosa se emplea como fuente de carbono y osmorregulador, manejándose concentraciones que van desde el 2 hasta el 12 % .

VI.- Para mejorar la fuente de nitrógeno, se han utilizado con éxito aminoácidos como L-aspargina, L-prolina y L-glutamina.

Otras investigaciones (Sisler y Joung, 1984) han mostrado el efecto inhibitorio del etileno; este compuesto es producto del metabolismo de las plantas. Cuando se presenta en cantidades significativas actúa como inhibidor de la proliferación celular. Es hasta 1988 cuando Songstad y colaboradores reportan por primera vez el efecto del etileno en la regeneración de plantas, a partir de cultivos celulares de maíz y se analizó el efecto antagónico que ejerce sobre este gas el nitrato de plata y el norbomadieno. Duncan *et al.* (1985), reporta que un tratamiento previo de los callos de maíz con nitrato de plata permite la obtención de altos

porcentajes de regeneración. Más tarde Vain *et al.* (1989 a), empleando también nitrato de plata lograron regenerar plantas a partir de callo friable (tipo II), en este mismo año (Vain *et al.*, 1989 b) realizaron trabajos utilizando compuestos que son precursores tales como aminoethoxivinil-glicina (AVG), 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) y ethephon e inhibidores como nitrato de plata (AgNO_3) y tiosulfato de plata (STS), para la síntesis de etileno, con la finalidad de evaluar su importancia bajo condiciones *in vitro*. En 1990 se sugirió que en cultivos de maíz, el nitrato de plata actúa como antagonista del etileno y que promueve la formación de embriones somáticos y/o la regeneración de brotes. También se han estudiado los efectos del ABA y GA_3 , en combinación con sacarosa, manitol y L-prolina en la maduración y en la inhibición de la germinación de embriones somáticos de maíz (Emons *et al.*, 1993). Así como también se ha visto que un pretratamiento con DL-alfa difluorometilornitina (DFMO), que es un inhibidor irreversible de la actividad de ornitina descarboxilasa y mejora la respuesta regenerativa en cultivos celulares de esta especie (Torné *et al.*, 1993). En cultivos de *Daucus carota* se ha observado que en presencia de cobalto y níquel, la producción de etileno se inhibe (Roustan *et al.*, 1989). En presencia de nitrato de plata no disminuye su síntesis, pero sí se incrementa el porcentaje de regeneración (Roustan *et al.*, 1990). Lo mismo se ha observado en *Brassica oleracea* (Ockendon y Mc Cleanaghan, 1993), en *Asparagus officinalis* (Edriss *et al.*, 1994), en *Rhanterium epapposum* (Abo El-Nil y Al-Sabah, 1994), en *Oryza sativa* y *Carica papaya* (Adkins y Magdalita, 1994).

Así entonces, el etileno actúa inhibiendo la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC), arginina descarboxilasa (ADC) y S-adenosil-metionina (SAM), por lo que no permite la síntesis de poliaminas; es aquí donde tiene el nitrato de plata su acción de antagonista, es decir, contrarresta los efectos del etileno, pero no reduce su síntesis, lo mismo ocurre con el norbornadieno.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio se ha visto que la presencia de nitrato de plata no tiene efectos inhibitorios relevantes en los cultivos, es decir, no afecta al crecimiento del callo, sólo incrementa la capacidad regenerativa del mismo. Es por este motivo que se decidió seguir trabajando con dicho compuesto.

II.1.3.- ASPECTOS BIOQUÍMICOS GENERALES RELACIONADOS CON LA OCURRENCIA DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

La cualidad que tienen los tejidos vegetales para generar embriones somáticos, está controlada a nivel molecular por señales específicas (Bhaskaran *et al.*, 1988). Uno de los primeros estudios bioquímicos al respecto, se realizó en células embriogénicas de *Daucus carota*, las cuales mostraron tener altas concentraciones de proteínas, ARN y una gran actividad enzimática e incremento del contenido de retículo endoplásmico y de ribosomas hacia los ángulos del plano de división. Cabe mencionar que en etapas tempranas del proceso, no se localizaron cuerpos lipídicos (Smith y Krikorian, 1989).

Los eventos moleculares involucrados entre la inducción de la competencia celular embriogénica y la expresión morfológica de dicha competencia son desconocidos.

Varios marcadores protéicos para diferentes estadios de embriogénesis han sido caracterizados, tales como la proteína EP2, que transfiere lípidos del endospermo al embrión (Stern *et al.*, 1991); proteínas intracelulares (Barrat y Clark, 1991), proteínas extracelulares, principalmente peroxidasas y endoglucanasas (Robert *et al.*, 1990), las proteínas ácidas E37.5a y E37.5b, detectadas únicamente después de la inducción de embriogénesis y que permanecen durante todo el proceso (Hilbert *et al.*, 1992). En alfalfa se han detectado proteínas de bajo peso molecular llamadas 7S, 11S y 2S, de las cuales la más abundante es la 7S cuyo mRNA se acumula durante las etapas tempranas de la embriogénesis. En *Daucus carota* se caracterizaron polipéptidos específicos durante el estado de embrión globular (Aleith y Richter, 1990). Existe una proteína de 50 KD que abunda en estado temprano de embriogénesis (Choi *et al.*, 1987); se determinó que es una proteína involucrada en la regulación de genes específicos para la embriogénesis, y por tanto, juega un papel importante para que la célula exprese su potencial

embriogénico (Vierling, 1991). Estos resultados fueron obtenidos en arroz, maíz, trigo y cebada. Por otra parte, se detectó en embriones somáticos de cacao una acumulación de ácidos grasos, cuya presencia y composición podrían usarse como marcadores apropiados para indicar el grado de diferenciación de dichas estructuras (Yong-Hwan y Janic, 1991).

La caracterización y el análisis funcional de proteínas u otros compuestos que se sintetizan en correlación con los eventos del desarrollo (marcadores), puede contribuir al esclarecimiento de los mecanismos que permiten que se originen los embriones somáticos y su posterior desarrollo a planta completa.

En maíz, uno de los primeros reportes que abordan el aspecto bioquímico de este proceso es el de Everett *et al.* (1985), quienes estudiaron las enzimas involucradas en estados particulares del desarrollo tales como: la glutamato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y la beta glucosidasa. Proponiendo que sólo esta última puede emplearse como marcador para distinguir a los cultivos embriogénicos de los no embriogénicos. Además, analizaron la composición de los polisacáridos secretados por las células, encontrando que tanto los callos como los cultivos en suspensión secretan mucílagos de polisacáridos importantes en la composición de la pared, y que este aspecto puede ser un marcador importante para la identificación de células embriogénicas.

En 1989, Moustafa y colaboradores propusieron que un marcador de la respuesta morfogénica en maíz, es la correlación que existe entre dicho proceso y la capacidad de reducir el MnO_4 a MnO_2 por los callos de maíz, lo cual permite emplear la reducción del permanganato como indicador de la capacidad de regeneración. También se han estudiado patrones de isoenzimas de peroxidasa, esterasa y malato deshidrogenasa. En callos embriogénicos se detectó una asociación específica del proceso con estas isoenzimas (Rao *et al.*, 1990), así

como un grupo de proteínas moduladas por ABA (globinas), se incrementan durante la embriogénesis en maíz.

En otras especies monocotiledóneas como arroz (Langridge *et al.*, 1991), se ha visto que varios genes del cromosoma 1 tienen influencia en la respuesta de embriogénesis, determinando la localización exacta de estos genes, por lo cual, se sugiere que tanto el crecimiento como la diferenciación, son procesos que están influenciados por la composición genética.

También es importante mencionar que en maíz se han realizado estudios más complejos, tal es el caso de Gordon y colaboradores (1990), quienes lograron la transformación y regeneración de las primeras plantas transgénicas, las cuales llegaron a ser fértiles. Posteriormente las plantas transformadas y fértiles se han obtenido por medio de la técnica de bombardeo de DNA, la cual consiste en introducir pequeñas partículas de DNA en el interior de la célula para que sea integrado a su genoma y posteriormente se exprese (Vain *et al.*, 1993; Brettschneider *et al.*, 1994).

II.2.- CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LA PARED CELULAR EN PLANTAS

La pared celular no funciona sólo como barrera fisiológica, su función principal es mecánica, es soporte de la célula y estructuras pluricelulares e impide la ruptura de las membranas externas como resultado de las presiones hidrostáticas que se producen dentro de la célula, además tiene papel de defensa contra organismos patógenos invasores.

Así entonces, las paredes celulares de las plantas están involucradas en muchos aspectos biológicos, incluyendo su morfología, crecimiento y su interacción con el medio ambiente durante el desarrollo. Biológicamente son de suma importancia para las células, motivo por el cual en estos últimos años han sido objeto de intensos estudios.

La pared celular por conveniencia para su estudio, se divide en dos tipos: primaria y secundaria. La pared celular primaria característica de células jóvenes o pocodiferenciadas, algunas veces se convierte en secundaria después que ha terminado su crecimiento. En plantas superiores, este tipo de pared tiene muchas características en común y por tanto presenta una organización similar. La celulosa, hemicelulosa, polisacáridos pécticos, proteínas estructurales y lignina, han sido identificados como los componentes más abundantes. La lignina es el componente característico de las paredes secundarias, las microfibrillas de celulosa son parte muy importante de las paredes de plantas superiores, cuyas moléculas se encuentran unidas por puentes de hidrógeno. En las paredes primarias las microfibrillas de celulosa se encuentran ordenadas en una matriz cristalina rodeada por una región no cristalina, que consiste en depósitos de celulosa, polisacáridos no celulósicos y glicoproteínas (Cassab *et al.*, 1985; Hood *et al.*, 1988 y Engelen *et al.*, 1991). Así entonces se ha demostrado que las paredes celulares de diferentes órganos de monocotiledóneas y dicotiledóneas contienen proteínas estructurales.

Ha quedado ya establecido, que las células con capacidad embriogénica se generan a partir de células parenquimáticas, las cuales presentan divisiones sucesivas características que conllevan a la formación de estructuras compactas y pequeñas hasta formar un embrión en estado globular (Van Engelen *et al.*, 1992). Durante todo este proceso se requiere de cambios a nivel estructural y bioquímicos en la célula progenitora.

A través de estudios bioquímicos se ha sugerido que la pared primaria de una gran cantidad de plantas cuenta con glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, ya que más del 30% de los residuos de aminoácidos de estas proteínas son hidroxiprolina y constituye del 2 al 10 % de la pared celular. Lamport y Miller (1971) indicaron que la hidroxiprolina está presente en las paredes celulares de todos los tejidos que representan a las plantas verdes, desde algas hasta angiospermas.

Las proteínas que cuentan con hidroxiprolina están unidas covalentemente a oligosacáridos de arabinosa a través de enlaces glucosídicos entre la arabinosa y C4 de la hidroxiprolina. Lamport (1965) sugirió que estas proteínas tienen un papel estructural por actuar como "crosslinks" entre los polisacáridos de la pared celular y en virtud de los cambios que experimenta durante el crecimiento, las glicoproteínas pueden tener un papel importante en su resistencia. Se sabe poco acerca de su síntesis o degradación. La prolina es el precursor para la hidroxiprolina y la hidroxilación de este péptido es catalizada por una enzima citoplásmica, las enzimas responsables para la glicosilación o la degradación específica de este tipo de proteínas no se conocen.

Por otra parte existen evidencias de que la composición de la pared cambia durante el crecimiento y desarrollo de las células de la planta. La biogénesis de la pared celular incluye la formación de los precursores de los polímeros, su biosíntesis, ensamblaje y su alteración subsecuente de tal manera que tanto los cambios en su resistencia, como en su composición química están sincronizados

con los eventos de crecimiento y desarrollo, de tal manera que las alteraciones específicas de la pared celular forman parte del programa de control celular que rige el desarrollo de la planta.

Sin embargo, desde el punto de vista estructural, los componentes de las paredes celulares están bien identificados y estudiados con detalle, pero a nivel molecular no se tienen estudios muy precisos acerca de la regulación de su expresión. Ésto se debe, en parte a la dificultad para su aislamiento, ya que en los protocolos hasta hoy utilizados se requiere de agentes que de uno u otro modo pueden afectar a los constituyentes de la pared.

Actualmente se conoce que en dicotiledóneas hay tres clases de genes que codifican para tres tipos de proteínas en la pared celular: (1) extensina, que son glicoproteínas ricas en hidroxiprolina; (2) proteínas ricas en glicina; (3) proteínas ricas en prolina o en hidroxiprolina. Realizando estudios de secuenciación y aislando clonas genómicas, se piensa que estas proteínas son codificadas por pequeñas familias de genes.

Cassab *et al.* (1985) identificaron en soya una glicoproteína rica en hidroxiprolina, de peso molecular de 100,000 daltones; Hong *et al.* (1987) se enfocaron a analizar y caracterizar la secuencia de un gen que codifica para una proteína que podría ser de pared, ya que presenta características peculiares tales como: 1) es muy básica y tiene alto contenido de prolina, tirosina, lisina; 2) las propiedades hidrofóbicas son similares a otras proteínas de pared y 3) presenta homología en cuanto a la secuencia de residuos de aminoácidos. Más tarde este autor y su grupo (1989) estudiaron la regulación de la expresión de la familia de genes que codifican para proteínas ricas en prolina durante el desarrollo de la soya; analizaron varios órganos de la planta, incluyendo hojas, tallos y raíces, tanto de plantas etioladas como enverdecidas, así como también en tejidos jóvenes y maduros de vaina, semilla y cotiledones. Sus datos sugieren que los genes que

codifican para las proteínas ricas en prolina son regulados durante el desarrollo, ya que su expresión es específica del estadio y del tipo de órgano, además, esta familia de genes es diferente de la que codifica para las proteínas ricas en hidroxiprolina.

Kleis-San *et al.* (1990) en la misma especie, caracterizó una proteína de pared celular rica en prolina, de 30 KD. Otros estudios se han enfocado al proceso de hidroxilación de la prolina durante el crecimiento de cultivos celulares de soya. Con base en esto se postula que dichas proteínas tienen un papel importante en el crecimiento celular de los cultivos embriogénicos de maíz (Ludevid *et al.*, 1990; Ruiz-Avila *et al.*, 1991).

En *Phaseolus vulgaris*, la acumulación de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina ocurre en respuesta a infecciones como mecanismo de defensa (Showalter *et al.*, 1985). En *Cucurbita melo*, identificaron dos familias diferentes de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, sugiriendo por su comportamiento, que se trata de familias muy diferentes a las caracterizadas en otras especies (Mazau *et al.*, 1988).

En *Daucus carota* se localizó un tipo específico de glicoproteína de pared celular, a la cual llaman proteína extracelular, ésta sólo se encuentra en células vacuoladas (no embriogénicas) y muestra heterogeneidad en sus pesos moleculares, lo cual puede explicarse por la ocurrencia de modificaciones postraduccionales (Engelen *et al.*, 1991).

Las monocotiledóneas, y en particular las gramíneas, son pobres en proteínas con hidroxiprolina, motivo por el cual sus glicoproteínas ricas en hidroxiprolina han sido poco estudiadas.

Kieliszewski y Lamport (1987) purificaron y caracterizaron una glicoproteína rica en hidroxiprolina de maíz, proponiendo que ésta puede ser una extensina. Hood y su grupo (1988), reportaron un análisis de la acumulación de una glicoproteína rica en hidroxiprolina durante el desarrollo del pericarpio. Ésta es una proteína básica de aproximadamente 65-70 KD, con un punto isoeléctrico de 10.2 y con densidad en cloruro de Cesio de 1.38 a 1.39. En cuanto a la composición de aminoácidos, es rica en hidroxiprolina, treonina, prolina, lisina y glicina.

Otros estudios han permitido localizar glicoproteínas ricas en hidroxiprolina en las paredes celulares de cultivos de maíz y acumulación del mRNA, que codifica para este tipo de proteínas en tejidos que se están dividiendo constantemente, tales como ápices de raíz. En callos embriogénicos y meristemáticos se tuvieron resultados similares; sin embargo, el nivel de mRNA que codifica para este tipo de proteína va decreciendo cuando las células se elongan, o bien cuando la división frena y se promueve la diferenciación. Ésto podría indicar que durante la elongación celular, la proteína puede ser polimerizada a partir del precursor ya sintetizado y depositada en la pared celular. Una vez que ha ocurrido ésto, los cambios estructurales de la célula son ya muy pocos (Ludevid *et al.*, 1990). Por medio de un estudio de expresión de dicha proteína en las diferentes regiones del embrión cigótico, se determinó que los genes que codifican para esta proteína se expresan en forma diferencial en los tejidos embriogénicos; lo cual sugiere la existencia de un mecanismo que independientemente de la división celular, controla la expresión de los genes que codifican para esta proteína (Ruiz-Avila *et al.*, 1991). También en embriones inmaduros de maíz hay un gen que codifica para una proteína rica en prolina y lo mismo se ha registrado en tejido de ovario y más específicamente en células de tejido no-vascular (José-Etanyol *et al.*, 1992).

Por otra parte se aisló una glicoproteína rica en hidroxiprolina que presenta una gran cantidad de histidinas, por lo cual se propone que es una "quimera" de extensinas-arabinogalactanos, ya que presenta secuencias homólogas a éstas y

los patrones de glicosilación son similares a los que se presentan en las extensinas y los arabinogalactanos.

Recopilando toda una serie de trabajos al respecto, Li X-B y Lamport (1990) sugirieron que las glicoproteínas ricas en prolina e hidroxiprolina y la proteínas ricas en prolina, son miembros de una misma familia de proteínas. Sin embargo, son pocos los trabajos que existen enfocados al estudio de los cambios que ocurren en la pared celular durante la diferenciación.

En los últimos años en monocotiledóneas, se tiene idea de qué tan amplia es esta área de estudio. Por otra parte para trabajar con gramíneas bajo condiciones *in vitro*, se debe tener en cuenta que existen limitantes (como su alto grado de diferenciación celular) que hay que vencer para lograr cultivos celulares adecuados, para hacer estudios bioquímicos a nivel molecular, que nos ayuden a comprender de una manera más clara qué es lo que está ocurriendo cuando una célula no especializada, se diferencia de tal manera que es capaz de generar una planta completa.

II.3.- ASPECTOS HISTOLÓGICOS DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS *in vitro* DE MAÍZ.

Los primeros estudios a nivel histológico del proceso de embriogénesis somática se realizaron en zanahoria (Smith y Krikorian, 1989), los cuales mostraron que desde el punto de vista morfológico, las células superficiales presentan uniformidad y ésto se debe a los siguientes aspectos: presencia de plasmodesmos, mitocondrias ovals, cuerpos multivesiculares en la periferia de las células que guardan una relación muy estrecha con los plasmodesmos. Las divisiones mitóticas se presentan con mayor frecuencia en las células que forman la superficie con respecto a las células internas las cuales se encuentran altamente vacuoladas.

Los embriones somáticos presentan diferenciación, ya que se puede apreciar claramente una epidermis bien definida cuyas células contienen amiloplastos, al final de la etapa globular, el embrión fue muy similar a un embrión cigótico tanto en su morfología como en su anatomía.

En monocotiledóneas como el maíz, se han realizado estudios histológicos de los cultivos *in vitro*, obtenidos tanto de embriones cigóticos maduros como inmaduros. En un principio se penso que el callo se formaba por un crecimiento aberrante de raíces (Cure y Mott, 1978), lo cual implicaba que no existía realmente regeneración de estas estructuras sino más bien, el resultado de la proliferación de un tejido que ya se encontraba presente.

En estudios posteriores (Springer y Gree, 1979) se propuso que el callo se origina en la región epitelial del tejido escutelar, ya que esta zona es altamente meristemática, o bien, ocurre por la proliferación de la zona de transición, es decir, la zona entre el escutelo el eje embrionario (Vasil *et al.*, 1985). En el tejido calloso se indica que existe una regionalización celular, de esta forma en la superficie se localizaron zonas meristemáticas abundantes, motivo por el cual se propuso que de ahí surgen los embriones somáticos, brotes y raíces (Lu *et al.*, 1982; Lowe *et al.*,

1985; McClain y Hodges, 1986; Swedlund y Lucy, 1988; Pereddy y Petolino, 1990) y que el resto del callo se encuentra formado por células parenquimatosas que carecen de organización alguna (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1988; Smith y Krikorian, 1989; Franz y Schel, 1991) y de tejido vascular (Zhong *et al.*, 1992; Dolézclová *et al.*, 1992), siendo este último indicador de diferenciación celular.

También se han realizado a este nivel estudios histoquímicos que indican que desde etapas muy tempranas se acumulan reservas (almidón y lípidos) en las células que forman a los embriones somáticos, y esto ocurre con más intensidad cuando van madurando las estructuras (McCain y Hodges, 1986; Fransz y Schel, 1991; Andi *et al.*, 1993).

Dada la variabilidad de respuesta que presentan los cultivos *in vitro* de las gramíneas, no es posible hasta la fecha, establecer la secuencia del proceso de diferenciación y regeneración requerida para que se forme un embrión somático o un brote a partir de callos de maíz (Vasil *et al.*, 1985; Andi *et al.*, 1993; Anke *et al.*, 1993).

III.-HIPÓTESIS

Dado los antecedentes que se tienen acerca del proceso de embriogénesis somática de maíz bajo condiciones *in vitro*, se esperaría que una variedad mexicana de maíz criollo también pueda mostrar capacidad embriogénica, si se identifican la edad del explante y las condiciones adecuadas para inducir el cultivo embriogénico y su posterior regeneración a planta.

IV.- OBJETIVO GENERAL

Inducir callos embriogénicos a partir de embriones maduros e inmaduros de maíz criollo, estudiar el proceso embriogénico desde el punto de vista histológico y analizar la relación prolina/hidroxiprolina de las proteínas de la pared celular de callos tanto normales (no morfogénicos) como embriogénicos.

IV.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Definir la metodología adecuada para la obtención de callos con características embriogénicas de un maíz criollo de la variedad Tuxpeño a partir de embriones maduros e inmaduros.**
- 2.- Determinar el número de plantas regeneradas por explante (embrión)**
- 3.- Realizar un análisis histológico de cada muestra para determinar los cambios a nivel estructural en los callos durante el proceso de embriogénesis somática.**
- 4.- Establecer la metodología para la obtención de proteínas de pared de ejes embrionarios y callos de maíz.**
- 5.- Adiestramiento en el manejo de material radiactivo, su adecuada aplicación y evaluación en el material biológico.**
- 6.- Montar las metodologías para evaluar el contenido de prolina e hidroxiprolina en las proteínas de pared.**
- 7.- Aplicar pulsos de L-prolina-¹⁴C a cultivos de maíz durante el proceso embriogénico y cuantificar su incorporación a proteínas de pared y su transformación a hidroxiprolina.**

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

V.1.- OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO

Tipos de explante:

- a) Embriones inmaduros de maíz (*Zea mays* L.) de la variedad Tuxpeño, los cuales fueron obtenidos catorce días después de la polinización.

- b) Embriones de maíz maduros de la misma variedad Tuxpeño, obtenidos de grano maduro seco.

Los embriones maduros e inmaduros fueron proporcionados por CIMMYT, lo cual permitió controlar más variables en cuanto a su desarrollo.

Tanto los embriones jóvenes como los maduros que se emplearon en este trabajo se obtuvieron manualmente y estuvieron completos, tal como se muestra en la figura No. 1. En el caso de los embriones inmaduros, fueron separados completamente del endospermo, ya que después de hacer el corte con el bisturí el embrión se obtuvo con la espátula y se colocó en el medio de cultivo.

Los embriones maduros, una vez disectados de la semilla se limpiaron perfectamente, es decir, se eliminaron los residuos de endospermo, el pericarpio y el pedicelo. Así el material quedó listo para someterse al tratamiento de desinfección y posteriormente se sembró.

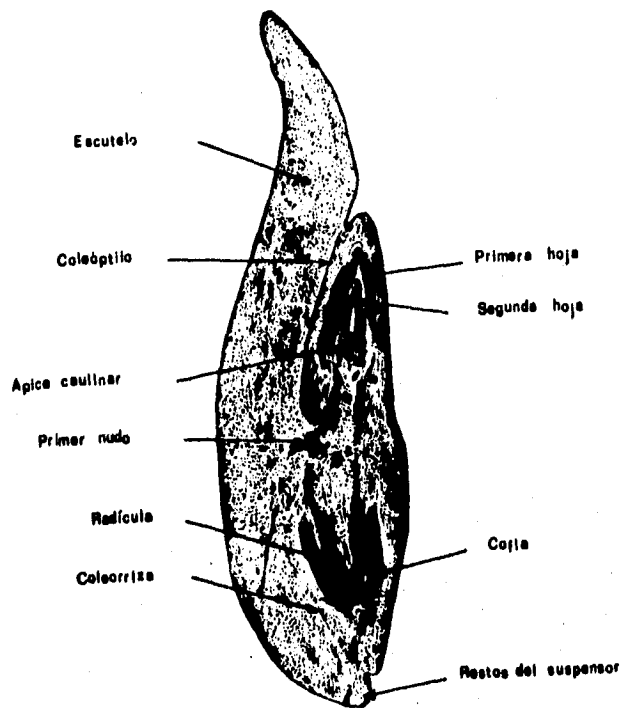


Figura No. 1- Embrión maduro de maíz (*Zea mays* L), explante del cual se originó el tejido caloso El embrión completo esta formado por el escutelo y el eje embrionario, éste último se constituye del coleóptilo, ápice caulinar, primer nudo, radícula, coleorriza, cofia, primera y segunda hoja

V.2.-TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN

Para los embriones inmaduros. Las mazorcas se cortaron en porciones de 5 cm de largo y en seguida se procedió a trabajar bajo condiciones asépticas, por lo cual el material biológico se colocó en un vaso de precipitados de un litro (previamente esterilizado), se agregaron 500 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 11% más 4 gotas de Tween 20 y 6 gotas de microdyn. El vaso de precipitados con el material biológico en la solución de hipoclorito se colocó sobre una parrilla de agitación y se dejó agitando durante 15 min; posteriormente se decantó la solución y se dieron cuatro enjuagues (de 3 minutos cada uno) con agua desionizada estéril; durante todo el tiempo que fue posible el vaso se mantuvo tapado con papel aluminio estéril.

Una vez que se terminó de enjuagar, las porciones de mazorca jóvenes quedaron listas para proceder a sembrar, por lo que cada trozo (uno cada vez) se colocó en una caja Petri estéril, para así poder extraer los embriones inmaduros del interior del grano de maíz y colocarlos de inmediato en el medio de cultivo.

En el caso de los embriones maduros. Una vez que estuvieron libres de residuos de endospermo se aplicó el mismo procedimiento que se les dió a los trozos de mazorca y al final de los cuatro enjuagues se colocaron aproximadamente 100 embriones en una caja Petri estéril y se procedió a sembrar en el medio de cultivo.

V.3.-SIEMBRA DE EMBRIONES

Ya desinfectado el material biológico bajo condiciones estrictas de asepsia se procedió a sembrar .

Embriones inmaduros. Las porciones de mazorca se colocaron en una caja Petri de 9 cm de diámetro, con ayuda de pinzas y bisturí estériles, se eliminó una pequeña porción en su parte superficial, se extrajo el embrión y se depositaron en el medio de inducción del callo.

Embriones maduros. En este caso los embriones ya desinfectados se sembraron en frascos Gerber con medio de cultivo.

Debido a que en previas investigaciones la formación de callo resultó más favorable cuando el eje embrionario se encontró en contacto con el medio de cultivo (Radojevic, 1984; Armstrong y Green, 1985; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1988), en este trabajo para ambos casos (embrión maduro e inmaduro) se colocaron cuatro embriones sobre el medio de cultivo, de manera que el eje embrionario quedó en contacto directo con el medio, ya que de no ser así la formación de callo sería muy pobre. La incubación se realizó en obscuridad constante a 26 ± 2 °C durante 3 semanas.

V.4.- PREPARACIÓN Y BALANCE HORMONAL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Preparación. Con la finalidad de facilitar la preparación de los medios de cultivo se elaboraron soluciones madre de los diferentes compuestos que constituyen al medio N6 (Chu *et al.*, 1975), tal como se indica en la tabla No. 1.

En la tabla No. 2, se presentan los medios de cultivo empleados en este trabajo, los cuales tuvieron como base al medio de cultivo N6, dichos medios se enumeraron con un subíndice según sus requerimientos de auxina, esta clave también nos indicó las cantidades de citocinina, sacarosa, prolina, hidrolizado de caseína y nitrato de plata que se adicionaron a cada tipo de medio.

Para preparar un litro de medio de cultivo en un vaso de precipitados se añadió una cantidad determinada de agua desionizada (volumen conocido), la cual se mantuvo en agitación constante con ayuda de una barra magnética y una parrilla de agitación; el motivo de ésto fue que la mezcla se mantuviera homogénea y evitar precipitaciones al ir adicionando las soluciones madre .

Las soluciones madre y los otros componentes se agregaron en el siguiente orden:

Solución madre	ml / l
1 _____	100
2 _____	10
3 _____	10
4 _____	1

Prolina 2.3 g/l

Hidrolizado de caseína 0.2g/l

Nota: Tanto los reguladores de crecimiento como la sacarosa y el nitrato de plata se emplearon en diferentes cantidades dependiendo del medio de cultivo que se requirió utilizar (ver Tabla No. 2).

Por último se ajustó el pH a 5.8, empleando soluciones de HCl o KOH en una concentración 0.1 N, y se completó el volumen en un matraz aforado de 500 ml.

Por otra parte, en un vaso de precipitados se colocaron 500 ml de agua desionizada y se agregaron 2.5 g de phytigel (SIGMA), se calentó en agitación constante hasta que se disolvió por completo (sin permitir que hirviera), posteriormente se mezcló con los otros 500 ml, en los que se encontraban los constituyentes del medio de cultivo.

Dependiendo del medio de cultivo, fue el recipiente que se utilizó para distribuirlo. Cuando se trató del medio para la inducción de callo, se emplearon

frascos Gerber (7.5 cm de altura y 5.5 cm de diámetro) con 20 ml de medio de cultivo. Cuando se preparó medio para mantenimiento y crecimiento del callo se emplearon tubos de cultivo de 15 cm X 2 cm, en los que se distribuyó el medio en alícuotas de 10 ml y se sellaron con papel aluminio. Finalmente cuando se trató del medio de regeneración, éste se colocó en frascos (15 cm X 5 cm), especiales para regeneración en cantidades de 25 ml y dichos frascos se sellaron con sus respectivas tapas.

Balance hormonal de los medios de cultivo

1.- Medio para la inducción de callo. El medio N6 se adicionó de una auxina sintética que es Dicamba en una concentración de 2 ppm, 15 mg/l de AgNO_3 , 2.3 g/l de L-prolina y 3% de sacarosa (todos de SIGMA).

2.- Medio de reslembra. En este caso se utilizó medio N6, el cual contenía la mitad de auxina (1 ppm) y mantenía las concentraciones originales de prolina y de hidrolizado de caseína, más el agente que ayudó a que se presentara la respuesta embriogénica en el callo (el AgNO_3), en una concentración de 15 mg/l y sacarosa al 6%. Se probaron además dos concentraciones de kinetina: 0.01 y 0.05 mg/l (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981).

3.-Medio de regeneración. Este medio fue N6 sin reguladores de crecimiento, ni AgNO_3 , pero sí con sacarosa (2%), los demás constituyentes del medio quedaron igual que en el medio basal.

V.5.- PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES MADRE DEL MEDIO BASAL N6

Tabla No. 1 .Reactivos que constituyen al Medio basal N6 (Chu *et al.*, 1975).

Solución	Compuesto	Cantidad (g)	Volumen (ml)
1	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.63	
	KNO ₃	28.33	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.66	
	KH ₂ PO ₄	4.0	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.93	cbp___1000
2	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.597	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.150	
	HBO ₃	0.160	
	KI	0.080	cbp___1000
3	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.785	
	Na ₂ EDTA	3.725	cbp___1000
4	Glicina	0.2	cbp___100
5	Ac. nicotínico	0.050	
	Tiamina-HCl	0.050	
	Piridoxina-HCl	0.1	cbp___100

V.6.- MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS, (MEDIO BASE N6).

Tabla No. 2. Claves y requerimientos de los medios de cultivo utilizados, tomando como base el medio N6.

Clave	N6 ₂	N6 ₁	N6 _{1A}	N6 _{1B}	N6 ₀
Requerimientos					
Dicamba	2ppm	1ppm	1ppm	1ppm	-----
Kinetina	-----	0.01 ppm	0.05 ppm	0.05 ppm	-----
Sacarosa	3%	3%	6%	6%	2%
AgNO ₃	0.015g/l	-----	0.015g/l	-----	-----
Prolina	2.3g/l	2.3g/l	2.3g/l	2.3g/l	2.3g/l
H. caseína	0.2g/l	0.2g/l	0.2g/l	0.2g/l	0.2g/l

V.7.- RESIEMBRAS Y PARÁMETROS A EVALUAR

Tres semanas después de la siembra se evaluó el porcentaje de inducción de callo, posteriormente se hizo la primera resiembra del callo primario. Para determinar la cantidad de callo producida los tubos de cultivo, se pesaron antes y después de colocar el callo. Dos semanas más tarde se realizó una segunda resiembra para incrementar la cantidad de material biológico y al igual que la resiembra anterior, los tubos de cultivo se pesaron antes y después de colocar el callo. Al final de la segunda resiembra los callos embriogénicos fueron seleccionados de acuerdo con el criterio ya establecido por Tomes *et al.* (1985): Callo tipo II: Sumamente friable, de crecimiento rápido y en cuya superficie se forman los embriones somáticos. Los callos seleccionados se pasaron a medio de regeneración, en el cual permanecieron durante cuatro semanas.

En todas las etapas de cultivo, se realizaron evaluaciones cualitativas para definir la respuesta del callo en cada medio de cultivo. A estas evaluaciones se les determinó "Parámetros biológicos", y son los siguientes:

- 1.- Presencia de raíces, (señalando cualitativamente con cruces en forma creciente su abundancia)
- 2.- Textura del callo
- 3.- Consistencia del callo
- 4.- Coloración del callo
- 5.- Número de callos muertos
- 6.- Número de plántulas regeneradas

La evaluación de estos parámetros permitieron tener un panorama general de las condiciones de los cultivos, lo cual fue sumamente importante para determinar si se estaba o no presentando la respuesta morfogénica (embriogénesis somática) de suma importancia para este trabajo.

Parámetros histológicos

Así mismo, se realizó un análisis histológico de los cultivos de cada etapa (inducción, mantenimiento y regeneración), poniendo especial interés en el comportamiento de los callos en el medio de regeneración, es por ello que para este caso se tomaron muestras al tiempo cero y a los 6 y 10 días después de haber sido colocados en este medio. También se tomó en cuenta la intensidad de las zonas verdes de cada muestra, para separarlas y trabajarlas como muestras independientes.

Como control inicial, se realizó el análisis histológico de los embriones maduros e inmaduros utilizados para la inducción del callo, con la finalidad de describir las características de los tejidos que dieron origen a los cultivos embriogénicos.

V.7.1.-TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA MICROSCOPIO ÓPTICO (JOHANSEN, 1974).

A continuación, se describe la técnica utilizada para obtener preparaciones histológicas, las cuales fueron observadas al microscopio óptico en los sistemas de campo claro, campo oscuro y contraste de fases, en aumentos de 10X, 20X y 50X.

a) Fijación

Las muestras obtenidas de diferentes zonas de los callos, fueron colocadas en una solución fijadora FAA, durante 5 días. Dicha solución se compone de:

Reactivo	Volumen (ml/l)
Formaldehído _____	100
Ácido acético glacial _____	50
Alcohol etílico al 96% _____	500
Agua corriente _____	350

Una vez fijado el material se procedió a deshidratarlo.

b) Deshidratación e impregnación en Paraplast

Después de los 5 días de exposición en la solución fijadora, las muestras fueron deshidratadas mediante su paso por una serie gradual de etanol a diferentes concentraciones, como sigue:

Etanol 30%	_____	30 minutos
50%	_____	30 minutos
70%	_____	30 minutos
85%	_____	30 minutos
96%	_____	30 minutos
100%	_____	30 minutos

La impregnación del tejido en paraplast también se realizó de manera gradual, como sigue:

Etanol absoluto-Xilol (1:1)	_____	30 minutos
Paraplast-Xilol	_____	24 horas
Paraplast líquido a 56°C	_____	24 horas

La mezcla de Paraplast-Xilol y el Paraplast líquido fueron mantenidas en estado líquido dentro de una estufa a $56 \pm 2^\circ\text{C}$.

c) Inclusión de los tejidos

Para la inclusión, se utilizó Paraplast de punto de fusión $54-56^\circ\text{C}$, la cual fue mantenida en estado líquido dentro de una estufa a $56 \pm 2^\circ\text{C}$. Se utilizaron moldes

de cartulina de 2 X1.5 cm, en cada bloque de Paraplast se colocó sólo una muestra de callo, observada a través del microscopio estereoscópico y con ayuda de una aguja de disección, se acomodó en la parte media del bloque y finalmente se dejó enfriar durante 24 h y posteriormente se procedió a cortar.

d) Obtención de cortes

Los cortes fueron de 9 μ m de grosor, empleando un microtomo de rotación marca American Optical . Los cortes se colocaron en un baño de flotación que contenía gelatina (0.5 g/l) disuelta en agua corriente a una temperatura de 45 °C. Una vez que el corte estaba bien extendido se colocó sobre el portaobjetos y por último se dejó secar a temperatura ambiente.

e) Eliminación de Paraplast

Para eliminar el Paraplast, los portaobjetos que contenían los cortes se colocaron en una estufa a 56 °C durante 20 minutos, al término de los cuales se introdujeron en xilol absoluto durante 10 minutos (con dos cambios de 5 minutos cada uno). Para eliminar completamente los residuos de Paraplast, los cortes se pasaron por una serie gradual de etanol como se indica a continuación:

Etanol absoluto	_____	3 minutos
96 %	_____	3 minutos
85 %	_____	3 minutos
70 %	_____	3 minutos
50 %	_____	3 minutos
30 %	_____	3 minutos
Agua corriente	_____	3 minutos

f) Tinción de los cortes

Para la tinción se utilizó la técnica de Safranina-Verde rápido, propuesta por Johansen. (1974), tal como se presenta en la tabla No. 3.

Ya que los cortes se lavaron con agua corriente se colocaron en una solución de Safranina-Fenol durante 24 h, cuando concluyó este tiempo los cortes se enjuagaron cuidadosamente con agua corriente y se hicieron pasar de nuevo por una serie gradual de alcoholes y verde rápido de la siguiente forma:

Etanol 30 %	_____	3 minutos
50 %	_____	3 minutos
70 %	_____	3 minutos
96 %	_____	1.5 minutos
Verde-rápido	_____	40-60 segundos
96 %	_____	1.5 minutos
Etanol absoluto	_____	3 minutos
Xilol	_____	5 minutos

Para concluir con la técnica los cortes se sacaron del xilol, eliminando cuidadosamente los restos del mismo y se procedió al montaje de las preparaciones con bálsamo de Canadá.

Las preparaciones se dejaron secar a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, y una vez que se secaron, quedaron listas para su análisis al microscopio óptico.

**Tabla No 3. Técnica de preparación de colorantes Safranina-Verde rápido,
propuesta por Johansen. (1974).**

1.-Safranina-fenol

En 500 ml de agua corriente se disolvieron 0.5 g de safranina, posteriormente se añadieron 130 g de sulfato de amonio y 0.1 g de fenol, una vez disueltos estos reactivos, la solución se aforó a un litro con agua corriente.

2.-Verde rápido

Se pesaron 0.75 g de verde rápido y se disolvieron en 250 ml de etanol al 96 %. Esta solución se agitó durante 30 minutos y después se filtró.

V.7.2.TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

i) Marcaje radiactivo de material biológico (Perez *et al.*, 1978).

Los isótopos radiactivos utilizados en este trabajo fueron:

- 1.- Prolina, L-[¹⁴C]- Actividad específica: 290.0 mCi/mmol
- 2.- Metionina, L-[³⁵S]- Actividad específica: 1175 mCi/mmol

Los isótopos provinieron de New England Nuclear Co.

Procedimiento

Aproximadamente 10 g de material biológico (callo) ya seleccionado se colocó en un matraz Erlenmeyer que contenía 15 ml de medio de cultivo N6 líquido (cuidando que el tejido caloso se encontrara cubierto por el medio de cultivo), el cual carecía de prolina o de hidrolizado de caseína, según fue el isótopo con el que se trabajó, es decir, L-prolina-¹⁴C o L-metionina-³⁵S respectivamente.

A continuación en la campana de flujo laminar y bajo condiciones estrictas de asepsia, se dió un pulso radiactivo. Con una micropipeta de 50µl se adicionaron 10 µCi de L-prolina-¹⁴C (290.0 mCi/mmol) o 30 µCi de L-metionina-³⁵S (1175 mCi/mmol) al medio de cultivo. Ya que se dió el pulso, el matraz se selló con papel aluminio, se incubó en agitación (100 rpm) y oscuridad constante a 26 ± 2 °C 5 h para la L-prolina-¹⁴C o 14 h para la L-metionina-³⁵S. Al final de este periodo se dejó sedimentar el material celular, se decantó el medio de cultivo, por último la muestra se lavó con medio de cultivo nuevo (esto se realizó con la finalidad de eliminar el exceso de marca), el cual se eliminó decantando nuevamente.

La muestra ya lavada, quedó lista para procesarla y obtener proteínas de pared, o bien se almacenó a -70 °C.

En lo que respecta a la radiactividad, fue sumamente importante tomar las debidas precauciones para almacenar correctamente el material al igual que el manejo de

los desechos. Además de esto, los espacios y materiales utilizados se lavaron minuciosamente para evitar contaminación (Amersham. Life Science, 1995).

ii) Obtención de proteínas de pared (Hood *et al.*, 1988)

La muestra ya marcada se pulverizó en presencia de nitrógeno líquido hasta que se observó un polvo blanco, posteriormente se adicionaron 8 ml de una solución de acetato de potasio al 0.1 %, tiosulfato de sodio 4 mM a pH 5. Se dejó descongelar homogenizando muy bien la mezcla, ya descongelada se centrifugó a 2,000 rpm (636 g, rotor Beckman JS-13.1) durante 10 minutos en una centrifuga Beckman J2-21 M/E. Una vez centrifugada la muestra, se separó el sobrenadante (A) del precipitado (B) y se procedió a trabajarlos por separado como se describe a continuación:

Sobrenadante (A)

Se centrifugó a 15,000 rpm (27,200 g, rotor Beckman JA-20) por 30 minutos, se desechó el sedimento y al nuevo sobrenadante se le adicionó una décima parte del volumen total de TCA al 100%, se colocó a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 5,000 rpm (3,980 g, rotor JS-13.1) por 15 minutos. Después de esto, el sedimento se congeló a -70 °C. Se midió el volumen del sobrenadante, del cual se tomaron 100 µl y se vertieron en 5 ml de líquido de Bray para medir la radiactividad en el contador líquido de centelleo. La radiactividad medida se utilizó como valor de poza, para corregir el valor de incorporación del isótopo en cada muestra.

Precipitado (B)

El precipitado protéico se lavó con 6 ml de Nonident P-40 (detergente no iónico) al 0.5 %, se resuspendió con una espátula y se centrifugó a 2,000 rpm (636

g, rotor JS-13.1) durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió en 10 ml de una solución de tiosulfato de sodio 2 mM (frío), se centrifugó a 2,000 rpm (636 g, rotor JS-13.1) durante 10 minutos, esto se repitió 6 veces. El sedimento se resuspendió con 10 ml de cloruro de calcio 0.2 M, se dejó a 4 °C durante toda la noche. Al siguiente día la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm (17,400 g, rotor JA-20) por 15 minutos. El sobrenadante se depositó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se adicionaron 5 volúmenes más de acetona. El matraz se selló perfectamente y se colocó toda la noche a 4 °C, al siguiente día se centrifugó su contenido a 5,000 rpm (3,980 g, rotor JA-20) por 15 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento obtenido corresponde a las proteínas de pared, el cual se resuspendió en el mínimo de agua desionizada estéril en un tubo Eppendorf y se congeló a -70 °C.

Todo el procedimiento se realizó manteniendo la muestra en frío y para proteger a las proteínas a todas las soluciones empleadas se les adicionó PMSF y Benzamidina que son inhibidores de proteasas; ambos reactivos fueron empleados en una concentración de 1 mM, ver tabla No. 4.

III) Preparación de soluciones para obtener proteínas de pared celular

Solución I

Acetato de potasio 0.1 %
Tiosulfato de sodio 4mM
Ajustar a pH 5

Solución III

Tiosulfato de sodio 2mM

Solución II

Nonident P-40 al 5 %

Solución IV

Cloruro de calcio 0.2 M

Tabla No. 4. Preparación de soluciones madre de inhibidores de proteasas

1.- PMSF (Fluoruro de fenilmetil sulfonilo) 100 mM

Se pesó el reactivo y se disolvió en acetona para tener un stock de 100 mM. De dicha solución se tomó 1 ml y se adicionó a 99 ml de cualquiera de las soluciones anteriores (I a IV), para tener una concentración final del inhibidor de 1mM.

2.- Benzamidina 100 mM

Se pesó el reactivo y se disolvió en agua desionizada estéril. Para tenerlo a una concentración final de 1mM y se procedió de igual forma que con el PMSF.

III) Determinación de la cantidad de proteína por espectrofotometría

Elaboración de la curva patrón

La cantidad de proteína para cada muestra se determinó por el método de Bradford (1976).

No. celda	[μ g] Albumina	Vol. de sol. madre de albumina (μ l)	Vol. de agua para completar a 800 μ l	Vol. de solución Bradford (μ l)
1	0	0	800	200
2	5	4	796	200
3	10	8	792	200
4	15	12	788	200
5	20	16	784	200
6	25	20	780	200

Preparación de las celdas, para obtener los valores con los que se construyó la curva patrón. Lo primero que se hizo fue preparar una solución madre de albumina a una concentración de 1.25 mg/ml. Posteriormente se enumeraron las celdas del 1 a 6 y con micropipetas se adicionaron los μl de la solución madre de albumina, que corresponde a la concentración conocida de dicha proteína. Se adicionó el volumen de agua correspondiente para completar un volumen de 800 μl y por último se adicionaron 200 μl de solución Bradford para tener un volumen final en cada celda de 1 ml. Para homogenizar el contenido de la celda se selló con parafilm y se agitó cuidadosamente. La celda número 1 sirvió de blanco, por tanto se utilizó para calibrar. Las lecturas se hicieron a 575 nm en un espectrofotómetro BECKMAN. Cuando ya se tuvieron los valores de absorbancia se procedió a graficarlos contra la concentración de proteína en μg .

Preparación de la muestra problema

En una celda se colocaron 10 μl de la muestra de proteína, posteriormente se adicionaron 790 μl de agua desionizada estéril (para completar a 800 μl) y finalmente se agregaron 200 μl de solución Bradford. Con los valores de absorbancia obtenidos se determinó la concentración en μg de proteína de cada muestra. Los valores de absorbancia obtenidos deben caer dentro de la curva patrón, cuando no fue así, se preparó nuevamente otra celda aumentando o disminuyendo el volumen de la muestra según fue el caso, hasta que se obtuvo un valor adecuado. Esto último tuvo la finalidad de obtener valores más precisos y confiables acerca de la cuantificación de proteína que se tenía en cada muestra.

Preparación del reactivo de Bradford

Se disolvieron 100 mg de azul de Coomassie en 50 ml de etanol al 95 %. Se añadió a esta solución 100 ml de ácido fosfórico al 85 % (p/v), se diluyó la solución resultante a un volumen final de 1 litro. Las concentraciones finales de estos

reactivos fueron: azul de Coomassie 0.01 % (p/v), etanol = 4.7 % (p/v), ácido fosfórico = 0.5 % (p/v). La solución final se hizo pasar a través de papel filtro Whatman # 42 sin vacío.

liiii) Hidrólisis de proteínas de pared

Las proteínas se hidrolizaron de acuerdo al método reportado por Lucas y Sotelo (1982), en la siguiente forma: una cantidad conocida de proteína se colocó en tubos pyrex de 8 ml de capacidad y con tapa de rosca, se adicionaron 3 ml de HCl 6N y las muestras se colocaron en nitrógeno líquido para congelarlas, se eliminó el oxígeno con una corriente de N_2 y los tubos se colocaron a 120 °C durante 4 h. El HCl se evaporó en una estufa con vacío a 60 °C y la muestra se resuspendió nuevamente en 1 ml de HCl, se repitió el proceso anterior. La muestra ya hidrolizada se resuspendió en 300 μ l de agua desionizada estéril, se filtró en papel filtro Whatman # 50 y con vacío. A la muestra ya filtrada se le ajustó el pH a 6.8 y así quedó lista para ser aplicada en la placa de cromatografía.

liiii) Cromatografía bidimensional en capa fina de celulosa (Smith, 1968)

Preparación de las placas

Se utilizaron placas de celulosa Polygram Cell 300 UVa 54 (Macherey - Nagel, Germany). Originalmente la placa mide 20 X 20 cm. Para este caso se cortaron en porciones de 10 X10 cm y se le hizo un margen de 1 cm de ancho, definiendo al extremo inferior izquierdo como el sitio para aplicar la muestra. La finalidad de marcar de esta forma la placa fue facilitar la determinación del Rf de los aminoácidos de interés: prolina y/o hidroxiprolina.

Corrimiento de la muestra

La muestra de proteína ya hidrolizada fue aplicada gota por gota, esperando cada vez que la gota anterior se secase por completo. Una vez que se terminó de aplicar la muestra, se corrió el primer sistema en forma vertical ascendente (Smith, 1968). Los solventes para la primera dimensión fueron: piridina, acetona, hidróxido de amonio y agua destilada (45:30:12.5:12.5) en este sistema se eluyó una sola vez y el eluyente se dejó llegar hasta la marca del margen. La placa se secó durante dos horas a temperatura ambiente, ya seca se corrió el segundo sistema. Los solventes para esta segunda dimensión fueron: isopropanol, ácido fórmico y agua destilada (80:10:10), es pertinente mencionar que en este sistema la elución se realizó dos veces, dejando secar la placa durante dos horas cada vez; esto con la finalidad de obtener una mejor separación de los aminoácidos.

El paso siguiente fue revelar la placa con una solución reveladora constituida por 2.5 g de ninhidrina, 0.05 g de isatina, 10 ml de 2,4-lutidina y 1000 ml de acetona. La placa se reveló con ayuda de un aspersor mediante el cual se distribuyó el revelador por toda la placa, se dejó secar unos minutos y posteriormente se pasó por una parrilla caliente (calor soportable por el tacto) hasta que aparecieron las manchas de los diferentes aminoácidos que constituyen a la proteína.

En la placa revelada se determinó el valor del Rf de acuerdo a muestras estándar de estos aminoácidos. Para determinar los niveles de prolina/hidroxiprolina, las manchas correspondientes en la placa fueron raspadas y colocadas en 5 ml de líquido de Bray, agitando para disolver la muestra con ayuda de un vortex. Se dejó reposar durante 24 horas y después se midió la radiactividad correspondiente.

Las cámaras de cromatografía que se utilizaron en esta técnica tuvieron dimensiones de 20 X 20 cm y la cantidad de eluyente empleado en cada corrida fue de 30 ml. Antes de adicionar el eluyente a la cámara se colocó en la base de ésta una tira de papel filtro y después se colocó la placa.

Determinación del Rf

$$Rf = \frac{\text{distancia de la muestra}}{\text{distancia del frente}}$$

Preparación de los eluyentes para cromatografía

1.- Eluyente para el primer sistema (de carácter básico)

Piridina _____ 45 ml
Acetona _____ 30 ml
Hidróxido de amonio __ 12.5 ml
Agua destilada _____ 12.5 ml

2.- Eluyente para el segundo sistema (de carácter ácido)

Isopropanol _____ 80 ml
Ácido fórmico _____ 10 ml
Agua destilada _____ 10 ml

3.- Preparación del revelador

Ninhidrina _____ 0.25 g
Isatina _____ 0.005 g
2,4-Lutidina _____ 1.0 ml

Se afora con 100 ml de acetona

4.- Preparación del líquido de Bray

2,5-difeniloxazol (PPO) _____ 4.0 g
Naftaleno _____ 60.0 g
Etilenglicol _____ 20.0 ml
Metanol _____ 100.0 ml

[2,2-pfenil bis (5-feniloxazol)] (POPOP) _____ 0.2 g

Se afora a 1000 ml con dioxano

iiiiii) Electroforesis en geles de poliacrilamida

El sistema de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (Dodecil sulfato de sodio) que se utilizó fue el propuesto por Laemmli *et al.* (1970). Para lo cual se empleó el equipo para electroforesis en placa (modelo SE-500) de Hoefer Scientific Instruments.

Preparación de los geles

Gel separador: 10.2 ml de solución I (Acrilamida 30 % y Bisacrilamida 0.8 %) fueron mezclados con 11.8 ml de la solución II (Tris-HCl [Tri (hidroximetil) aminometanol] 0.75 M a pH 8.8, SDS 0.2 % y 10 µl de TEMED (N,N,N,N-Tetrametiletilenodiamina), se desgasificaron por 2 minutos y se agregaron 100 µl de persulfato de sodio al 20 %. La mezcla fue utilizada para formar 10 cm del gel separador de poliacrilamida al 14 %.

Gel condensador: 2.6 ml de la solución I fueron mezclados con 5.5 ml de la solución III (Tris-HCl 0.25 M a pH 6.8, SDS 0.2 %), 2.9 ml de agua y 10 µl de TEMED. La mezcla se desgasificó por 2 minutos y se agregaron 100 µl de persulfato de sodio al 20 %. Esta mezcla se utilizó para formar el gel que contuviera la muestra de proteína (su concentración fue 7 % de acrilamida).

Condiciones de corrida

El buffer de corrida que se utilizó estaba compuesto de Tris-HCl 0.025 M a pH 8.3, Glicina 0.192 M y SDS 0.1 %. Los geles fueron corridos a 50 miliamperes por 6 h, el voltage se mantuvo constante y el enfriamiento se proporcionó mediante un sistema de agua corriente.

Tinción y secado de los geles

Al finalizar el tiempo de corrida, los geles fueron sacados de la cámara y claramente identificados. Se tiñeron con una solución de azul de Coomassie al 0.2 % en ácido acético al 7 % y metanol al 50 %, durante toda la noche. Al siguiente día se destiñeron con una solución de ácido acético al 7 % y metanol al 30 % por 24 h.

Los geles destiñidos se colocaron en una solución de glicerol al 2 % y etanol al 35 % durante 30 minutos, después se pasaron a una solución de salicilato de sodio 1 M a pH 6, finalmente se pusieron sobre un papel filtro grueso y se cubrieron con papel egapac. El sacado se hizo al vacío durante 2 h a 60 °C en un secador de geles (BIO RAD, modelo 224).

Autorradiografía

El gel seco fue expuesto a una placa fotográfica (películas para radiografía clínica Cronex de Accesolab) durante tres semanas a -70 °C, empleando intensificadores (DUPONT). Finalmente la placa se reveló.

VI.- RESULTADOS

VI.1.- EFECTO DE LOS FITORREGULADORES EN LA INDUCCIÓN DE CALLO A PARTIR DE EMBRIÓN MADURO E INMADURO DE MAIZ TUXPEÑO.

1).- Inducción de callo a partir de embrión completo (maduro)

El medio de cultivo para la inducción de callo fue el N6₄, ya que en trabajos anteriores en nuestro laboratorio resultó ser favorable para otros genotipos de maíz (García *et al.*, 1993). Este medio está suplementado de 4 mg/l de MCPP (auxina sintética), 3% de sacarosa.

De los 1600 embriones completos que se sembraron, se obtuvo una cantidad total de 552.2 g de callo y un rendimiento de $0.345 \text{ g} \pm 0.1$.

Posteriormente se probaron dos tipos de explantes: en el primer grupo se sembraron embriones completos y en el segundo ejes embrionarios (800 explantes en cada caso). Obteniéndose que de los embriones completo 248 g de callo y un rendimiento de $0.31 \text{ g} \pm 0.2$ por embrión. En el caso de ejes embrionarios se registró un total de 152.2 g de callo y $0.19 \text{ g} \pm 0.08$ de callo por explante. Los resultados obtenidos de estos experimentos proporcionaron datos interesantes como:

- a) El medio de cultivo N6₄ resultó favorable en la inducción de callo para maíz Tuxpeño.
- b) El mejor explante para generar callo fue el embrión completo.

En ambos casos el callo fue de color blanquecino, textura granular, consistencia friable, con regiones de crecimiento en la superficie. Poco desarrollo de plántulas y casi no se presentaron raíces.

II).-Inducción de callo a partir de tejido maduro (embrión completo y eje embrionario) en presencia y ausencia de AgNO_3

En trabajos realizados en CIMMYT (Bohorova , 1992), se propone que el medio de cultivo N6_2 es el más adecuado para la inducción de callo de maíz; destacando que la presencia del nitrato de plata es indispensable durante la inducción tanto para que se forme el callo, como para que en los cultivos se manifieste una respuesta morfogénica (brotes y/o embriones somáticos).

Tomando en cuenta los resultados reportados en estas investigaciones se indujo callo empleando este sistema. Se emplearon dos tipos de explantes (embrión completo y eje embrionario), 800 de cada uno. La siembra se realizó siguiendo dos modalidades, por una parte el medio de cultivo careció de AgNO_3 , y por otra adicionando dicho compuesto. El tiempo de inducción fue de 3 semanas y la incubación fue en oscuridad.

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

Con embrión completo y sin AgNO_3 , el rendimiento fue de 0.374 g de callo por embrión (total: 299.2 g de callo) y para ejes embrionarios bajo estas mismas condiciones, el rendimiento fue de 0.09 g de callo por eje (de un total de 72 g de callo). Cuando se indujo la formación del tejido calloso en presencia de este compuesto, en embrión completo se registró un rendimiento de 0.47 g de callo por embrión (de 376 g de callo obtenido) y en eje fue de 0.16 g de callo por eje (de 128 g de callo obtenido).

Estos resultados indican que para embriones completos utilizando el medio de cultivo N6_2 , adicionado de Dicamba y de AgNO_3 (Fig. No. 2A), se mejoró en un 27 % la inducción de tejido calloso (comparando la respuesta que se obtuvo en los protocolos anteriores).

En general los cuatro grupos de este experimento presentan callo de color blanquecino, textura granular, consistencia friable con regiones compactas en la superficie y no se presentaron raíces ni plántulas.

iii).-Inducción de callo a partir de embriones inmaduros en presencia y ausencia de AgNO_3 .

Debido a que el estado de desarrollo es un factor importante tanto para el establecimiento del cultivo como para la inducción de morfogénesis (Vasil, 1982; Komamine, 1990 y Bohorova, 1992), se utilizaron embriones inmaduros (con dos semanas después de la polinización) para inducir callo, siguiendo el protocolo del experimento anterior, sólo que en este caso únicamente se trabajó con embrión completo.

Los resultados obtenidos, indican que en ausencia de AgNO_3 se obtiene un rendimiento similar al grupo que mostró mejores resultados en el experimento anterior (0.47 g de callo por embrión), esto indica que manejar tejidos jóvenes también puede hacer que la respuesta de inducción de callo mejore. Por otra parte, cuando se utilizó AgNO_3 , la formación de callo fue bastante satisfactoria, ya que se obtuvo un rendimiento de 0.60 g de callo por embrión.

Para ambos grupos las características de los callos fueron similares; su coloración fue blanquecina, textura granular, consistencia compacta y carecieron de plántulas y de raíces.

Las respuestas que se obtuvieron en estos experimentos se indican en la tabla No. 5, a continuación, se procedió a probar diferentes protocolos para obtener callos con características embriogénicas.

Cuadro No. 5. Inducción de callo a partir de embrión maduro (embrión completo y eje embrionario) e inmaduro de Maíz Tuxpeño. En cada ensayo se presentan tanto las cantidades totales de callo obtenido al final del periodo de inducción, así como el rendimiento del explante utilizado en cada caso.

Factores	i	ii	iii
Explante (s)	Eje embrionario y embrión completo maduro	Eje embrionario y embrión completo maduro	Embrión inmaduro
Auxina	MCP	Dicamba	Dicamba
Medios	N6 ₄	N6 ₂	N6 ₂
Producción total de callo en g	Eje embrionario = 152 Embrión completo = 552	Sin AgNO₃ Eje embrionario = 72 Embrión completo = 299 Con AgNO₃ Eje embrionario = 128 Embrión completo = 376	Sin AgNO₃ = 376 Con AgNO₃ = 480
Rendimiento en g de callo por explante	Eje embrionario = 0.19 Embrión completo = 0.35	Sin AgNO₃ Eje embrionario = 0.09 Embrión completo = 0.37 Con AgNO₃ Eje embrionario = 0.16 Embrión completo = 0.47	Sin AgNO₃ = 0.47 Con AgNO₃ = 0.60

VI.2. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA PARA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

VI.2.1. PRIMER EXPERIMENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO A PARTIR DE EMBRIONES MADUROS DE MAÍZ.

Para la obtención del material biológico con características embriogénicas, se emplearon como explantes embriones maduros, de la misma forma en que se ha venido trabajando en el laboratorio (Sánchez y Albores, 1979; Sanchez, *et al.*, 1981; Sánchez *et al.*, 1983; Sánchez, *et al.*, 1988; García *et al.*, 1993).

En nuestro sistema de cultivo, para este propósito se utilizó AgNO_3 e incrementos de sacarosa en el medio de cultivo, porque como se mencionó anteriormente está reportado en trabajos anteriores (Fransz y Schel, 1991; Komamine *et al.*, 1990), que estos dos elementos estimulan la formación de callos embriogénicos y por lo tanto de embriones somáticos. Así mismo se definió cual es la etapa del cultivo más adecuada para la adición de estos dos compuestos.

Otros experimentos se realizaron con la finalidad de dar una respuesta concreta a la incógnita que se ha reportado respecto a la diferencia en la formación de callo si se emplea como explante inicial embrión completo o el eje embrionario. Tomando en cuenta estos factores y las condiciones de cultivo que se han definido en trabajos anteriores, se presenta a continuación el análisis del proceso desde la inducción del callo hasta su respuesta cuando se coloca en un medio de regeneración.

Los explantes utilizados para la inducción de callo fueron: embrión completo (eje embrionario junto con el escutelo) y eje embrionario. Cada tipo de explante se colocó por separado en el medio de inducción N6_2 , en presencia o ausencia de AgNO_3 . El tiempo de inducción fue de 3 semanas. Posteriormente se hizo la primera resiembra del callo obtenido, empleando el medio N6_1 . Al final del período

de incubación (2 semanas) se realizó la segunda resiembra, en este caso los cultivos obtenidos en presencia de AgNO_3 se resembraron en medio N6_{1B} , mientras que los callos que se obtuvieron en ausencia de AgNO_3 en medio N6_{1A} .

En la tercera resiembra también se emplearon dos medios diferentes, ya que en esta etapa del cultivo, el material se dividió en dos partes: una fue resembrada en el medio N6_1 (medio de mantenimiento) y otra se colocó en medio N6_0 (sin fitorreguladores) para propiciar la regeneración. Al final del tiempo de incubación se realizó la primera evaluación de los cultivos (Tabla No. 6). Posteriormente, todos los callos se colocaron en el medio N6_0 , (lo cual corresponde a la cuarta resiembra) y al finalizar las cuatro semanas de incubación se evaluaron por segunda vez (Tabla No. 7). Cabe mencionar que para cada tratamiento se trabajó con 50 callos.

Los resultados cualitativos fueron los siguientes:

1.- Inducción de callo

En todos los grupos la formación de callo fue favorable, sin embargo, se presentaron algunas características particulares, esto es, el tamaño de los callos provenientes de embrión completo fue mayor (1.5 cm de diámetro) que los provenientes de eje embrionario (0.5 cm de diámetro), la consistencia de los cultivos en presencia de AgNO_3 fue más compacta y de coloración amarillo claro; en tanto que los cultivos que carecieron de dicho compuesto, se caracterizaron por ser friables y de coloración blanquecina, (Fig. 2C y 2D). También es importante mencionar que en los cultivos no hubo de raíces ni plántulas.

2.- Resiembras

Durante la primera resiembra los callos presentaron raíces pequeñas y las características de consistencia, friabilidad y coloración que presentaron al final de la inducción se reafirmaron. En cuanto al crecimiento se observó que fue mejor en los callos provenientes de embrión completo.

En la segunda resiembra, por una parte los callos que se indujeron en presencia de AgNO_3 presentaron regiones compactas y blanquecinas en la superficie, observándose estructuras nodulares, que por su apariencia podrían ser embriones somáticos.

Por otro lado, los callos que se originaron en ausencia de AgNO_3 cambiaron su coloración de blanquecina a amarillenta, se observaron zonas viscosas, de las cuales surgieron estructuras nodulares, que también podrían ser embriones somáticos.

En ambos casos las raíces fueron evidentes, pero no abundantes.

En las evaluaciones realizadas al final de la tercera y cuarta resiembra, los cultivos se clasificaron de acuerdo a su trayectoria de cultivo, quedando de la siguiente manera:

Grupo a: Provenientes de embrión completo, inducción sin AgNO_3 y en la tercera resiembra se colocaron en el medio N6_1 .

Grupo b: Provenientes de embrión completo, inducción sin AgNO_3 y en la tercera resiembra se colocaron en el medio N6_0 .

Grupo A: Provenientes de eje embrionario, inducción sin AgNO_3 y en la tercera resiembra se colocaron en el medio N6_1 .

Grupo B: Provenientes de **eje embrionario**, inducción sin AgNO_3 y en la tercera resiembra se colocaron en el medio N6_1 .

Grupo a': Provenientes de **embrión completo**, inducción con AgNO_3 y en la tercera resiembra se colocaron en el medio N6_1 .

Grupo b': Provenientes de **embrión completo**, inducción con AgNO_3 y en la tercera resiembra se colocaron en el medio N6_1 .

Grupo A': Provenientes de **eje embrionario**, inducción con AgNO_3 y en la tercera resiembra se colocaron en el medio N6_1 .

Grupo B': Provenientes de **eje embrionario**, inducción con AgNO_3 y en la tercera resiembra se colocaron en el medio N6_1 .

3.- Evaluaciones:

Primera evaluación de regeneración

Se tomaron al azar 50 callos de cada grupo y al final de la tercera resiembra, los cultivos que se originaron de embrión completo presentaron raíces abundantes de diversos tamaños, mientras que en los obtenidos de eje embrionario casi no se observaron dichas estructuras. Por otra parte, se registró un alto número de estructuras nodulares (170) y los primeros indicios de regeneración (presencia de zonas verdes) en los cultivos que se originaron de embrión completo en presencia de AgNO_3 (grupo b'), le siguen los cultivos que se originaron de ambos tipos de explantes, pero sin AgNO_3 y que antes de ser colocados en el medio de regeneración, pasaron por un medio adicionado de dicho compuesto y 6 % de

sacarosa (grupos **b** y **B**), Los parámetros cualitativos que se evaluaron se presentan en la tabla No. 6.

Segunda Evaluación

Al finalizar la cuarta resiembra se llevó a cabo la segunda evaluación. En este caso, todo el material se encontraba en medio de regeneración, por tal motivo se evaluó definiendo solamente el número de brotes o bien de zonas verdes (Tabla No. 7). Además se describieron las características de los callos, que por primera vez habían sido colocados en medio de regeneración, dichos cultivos se describieron de la siguiente forma:

Grupo a: callo café claro, friable con zonas compactas, protuberancias muy evidentes, raíces pequeñas (1-5 mm) y poco abundantes. Presencia de brotes.

Grupo a': callo amarillo claro, textura granular, consistencia friable/compacta, abundantes protuberancias ya diferenciadas a raíces, las cuales en algunos casos fueron largas (1-10 cm), con pelos radicales y presentaron una coloración roja. Presencia de brotes.

Grupo A: callo de coloración amarillo oscuro, textura granular, consistencia friable y también existieron regiones donde fue compacta, las cuales fueron blanquecinas. Protuberancias evidentes, raíces y zonas verdes abundantes. En este caso es la primera vez que los cultivos se colocaron en medio de regeneración.

Grupo A': callo amarillo claro, con protuberancias abundantes que se localizan en regiones compactas de color blanquecino, raíces poco abundantes, en este caso

cabe hacer notar que la consistencia fue friable/compacta, siendo muy marcada la combinación. En este tratamiento fue donde se observaron con más claridad los brotes.

Los cultivos de los grupos b', B, B' y b, no presentaron regeneración, sólo en los dos primeros grupos se localizaron zonas enverdecidas (Tabla No. 6).

Por los resultados que se obtuvieron en este experimento y que se presentan en las tablas 6 y 7, se pudo concluir lo siguiente:

- 1.- Empleando como explante inicial al embrión maduro, si es posible obtener callos embriogénicos y regenerativos
- 2.- El AgNO_3 es un factor importante que favorece al proceso de regeneración, siendo mayor su efecto cuando se emplea en etapas tempranas del cultivo (cultivos del grupo A').
- 3.- La adición de AgNO_3 y de concentraciones altas de sacarosa al medio de cultivo, tienen mejor acción (regeneración y/o formación de embriones somáticos) si se aplican por separado, es decir, si en una resiembra se adiciona un compuesto y en la siguiente el otro (cultivos de los grupos a', de la tabla No. 7 y b', de la tabla No. 6 ;notese la producción de estructuras nodulares).
- 4.- Por las características de los cultivos que se colocaron por primera vez en medio de regeneración (a, a', A y A'), y la respuesta de formación de brotes y/o zonas verdes, tal parece que el tejido debe recuperarse del choque osmótico al que fue sometido cuando se adicionó la sacarosa, para que finalmente se dé la regeneración.

Diagrama de flujo No.1.
Optimización de un sistema para embriogénesis somática.
De maíz Tuxpeño maduro.
Explante: Embrión completo
Eje embrionario

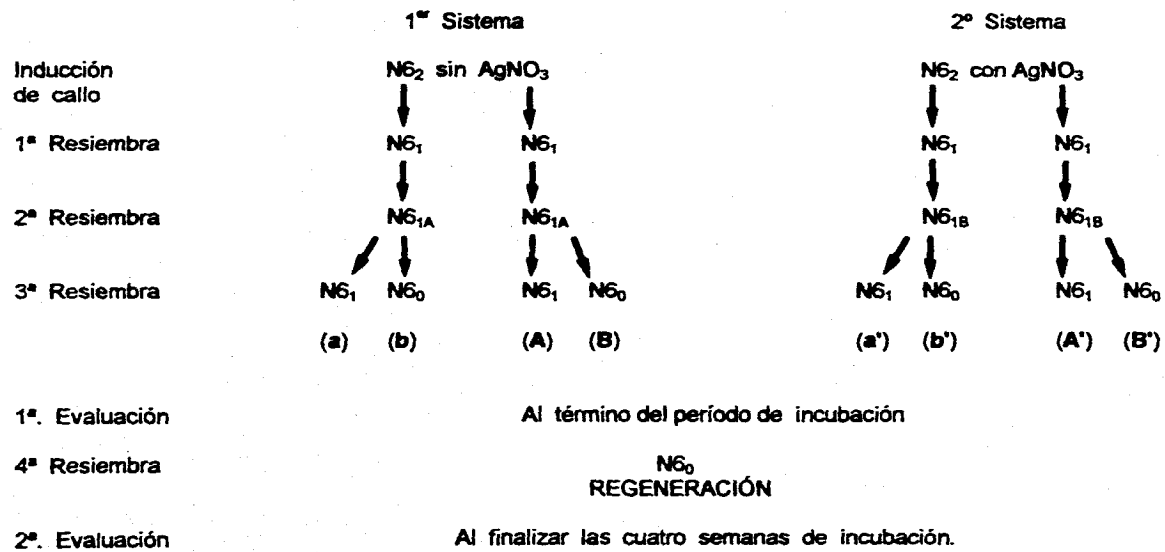


Tabla No. 6.- Primera evaluación de callos embriogénicos, obtenidos a partir de embriones completos y ejes embrionarios de maíz tuxpeño.

GRUPO	No. DE CALLOS EMBRIOGENICOS	RAÍZ	No TOTAL DE PROTUBERANCIAS	TEXTURA	CONSISTENCIA	COLOR	PRESENCIA DE ZONAS VERDES
a	20	—	27	granular	friable	café claro	no
b	42	xxx	90	granular	friable/compact a	amarillo claro	no
a'	23	xxx	39	granular	friable	café claro	no
b'	45	xxx	170	granular	friable	amarillo oscuro	si
A	31	—	57	granular	friable	amarillo claro	no
B	30	xx	80	granular	friable/compact a	amarillo oscuro	si
A'	19	x	23	granular	friable/compact a	café claro	no
B'	9	x	47	granular	friable	café oscuro	no

Se emplearon 50 callos en cada tratamiento

x = muy pocas raíces (1 - 5)

xx = pocas raíces. (5 - 20)

xxx = muchas raíces (más de 20)

Tabla No. 7- Segunda evaluación de callos embriogénicos para determinar la respuesta de regeneración.

GRUPO	a	b	a'	b'	A	B	A'	B'
Zonas verdes	-	-	-	-	11	1	-	-
brotos	5	-	6	-	-	-	8	-

VI.2.2. SEGUNDO EXPERIMENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO A PARTIR DE EMBRIÓN MADURO DE MAÍZ.

Por los resultados obtenidos del primer experimento se consideró pertinente realizar una repetición con la finalidad de verificar el efecto del AgNO_3 en la respuesta de regeneración cuando éste se adiciona en una etapa temprana del cultivo y evaluar el efecto de choque osmótico provocado por incremento de sacarosa en el medio.

La siembra de embriones se realizó en medio de inducción N6_2 , sin AgNO_3 . Al final de las tres semanas de incubación se determinó el rendimiento de formación de callo.

Los cultivos obtenidos se dividieron en la misma proporción en dos grupos:

El primer grupo de callos que se colocó durante la primera resiembra en medio N6_1 , que se utiliza para el mantenimiento de callo, posteriormente en la segunda resiembra se empleó el medio N6_{1A} , debido a que en este caso se adicionaron al mismo tiempo el AgNO_3 y el incremento de sacarosa (ver tabla No. 2). Ya en la tercera resiembra los cultivos se dividieron nuevamente en dos grupos: el "a" que se colocó en medio N6_1 y el "b" el cual pasó a medio de regeneración N6_0 .

Una vez que concluyeron los tiempos establecidos de incubación (dos y cuatro semanas respectivamente), se procedió a realizar la cuarta resiembra, en la cual todos los cultivos se colocaron en medio N6_0 .

El segundo grupo de callo fue resembrado por primera vez en medio N6_{1A} , sólo que en este caso se excluyó el incremento de la sacarosa, más tarde en la

segunda resiembra se utilizó el mismo medio que en la resiembra anterior, pero ahora se eliminó el AgNO_3 y sólo se aumentó la cantidad de sacarosa en el medio de cultivo. En la tercera resiembra se dividieron los cultivos (grupos "A" y "B") y se resembraron de la misma forma que se hizo con el primer grupo.

Como se planteó desde el inicio, este experimento fue una repetición, motivo por el cual en el presente texto no se describen con detalle las características de los cultivos durante las resiembras, ya que éstos confirmaron los resultados del experimento anterior. Sólo se realizaron evaluaciones en cuanto a la respuesta de regeneración y para ello se manejaron 50 callos por grupo.

Se obtuvo un total de 212.5 g de callo, con un rendimiento de aproximadamente 0.15 g por embrión. Los callos obtenidos fueron en su mayoría friables, coloración blanquecina y de tipo granular, carecieron de raíces y sólo en algunos casos se desarrollaron plántulas pequeñas. Los cultivos se evaluaron al final de la cuarta resiembra y los resultados se presentan en la tabla No. 8.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el AgNO_3 favoreció tanto la formación de estructuras nodulares que probablemente fueron embriones somáticos (es), como la regeneración. Además su efecto fue mayor cuando se utilizó en etapas tempranas del cultivo, y separado del choque osmótico que se dió al adicionar 6 % de sacarosa al medio de cultivo (grupo "A") y tal parece que debe ocurrir recuperación del tejido antes de que se generen los brotes.

Diagrama de flujo No 2

Optimización del sistema para embriogénesis somática
de maíz Tuxpeño maduro.

Explante: Embrión completo.

Inducción

N6₂ sin AgNO₃



1º Resiembra

N6₁

N6_{1A}
(sólo con AgNO₃)

(1º)

(2º)



2º Resiembra

N6_{1A}

N6_{1A} (sólo con 6%
sacarosa)



3º Resiembra

N6₁

N6₀

N6₁

N6₀

(a)

(b)

(A)

(B)



4º Resiembra

N6₀

N6₀

N6₀

N6₀

EVALUACIÓN

Tabla No. 8.- Evaluación de callos embriogénicos, obtenidos a partir de embriones maduros de maíz Tuxpeño.

PIMER GRUPO

TRATAMIENTOS	No. DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS	RAÍZ	No. DE PROTUBERANCIAS	TEXTURA	CONSISTENCIA	COLOR	BROTES: ORGANOGENESIS
a	15/50	xxx	107 (es)	granular	friable/compacta	amarillo oscuro	10
b	21/50	xxx	53 (es)	granular	friable/compacta	amarillo claro	11

SEGUNDO GRUPO

TRATAMIENTOS	No. DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS	RAÍZ	No. DE PROTUBERANCIAS	TEXTURA	CONSISTENCIA	COLOR	BROTES: ORGANOGENESIS
A	14/50	xx	74 (es)	granular	friable/compacta	amarillo claro	19
B	17/50	xxx	122 (es)	granular	friable/compacta	amarillo claro	14

Se emplearon 50 callos para cada tratamiento

es = embriones somáticos

xx = pocas raíces (5 - 20).

xxx = muchas raíces (más de 20).

VI.2.3. OBTENCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO A PARTIR DE EMBRIONES INMADUROS DE MAÍZ TUXPEÑO

Muchos autores reportan que es muy importante el estado fisiológico de un explante para el establecimiento bajo condiciones *in vitro* y más aún para la obtención de una respuesta morfológica satisfactoria. En maíz para obtener dicha respuesta se deben utilizar embriones inmaduros (Ammirato, 1989; Fransz y Schel, 1991; Straub *et al.*, 1992) de no más de tres semanas después de la polinización.

Por otra parte se ha indicado (Anke *et al.*, 1993) que cuando un cultivo va a presentar una respuesta morfológica, lo puede hacer desde las etapas iniciales, y que mientras pasa el tiempo, es decir, a mayor número de resiembra, el potencial morfológico disminuye.

Por lo anterior se planteó un experimento en el que el explante fue embrión inmaduro de catorce días después de la polinización. Al igual que el embrión maduro, en este caso se consideró la presencia o ausencia de AgNO_3 y el incremento de sacarosa en el medio de cultivo.

Como se presenta en el diagrama de flujo No. 3, el explante se colocó en el medio de inducción N6_2 , el cual para un grupo se adicionó de AgNO_3 y el otro grupo careció de este compuesto. En la primera resiembra se utilizaron tres medios de cultivo diferentes: N6_2 (medio para inducir callo), N6_1 (medio de resiembra) y N6_0 (medio de regeneración).

Al finalizar la primera resiembra, los cultivos que se encontraban en el medio N6_0 fueron evaluados para definir si presentaban una respuesta inmediata de regeneración (Tablas 9 y 10).

Los cultivos que se encontraban en medio N6₁ pasaron al medio N6_{1A} y los que estaban en medio N6₂ se colocaron nuevamente en el medio de inducción.

Al término de las dos semanas de incubación, se realizó una primera evaluación y se hizo la tercera resiembra, en la cual todos los cultivos se colocaron en el medio de regeneración.

La segunda evaluación se realizó cuatro semanas después de este último cambio de medio, para determinar la respuesta morfogénica de los cultivos.

Para un mejor manejo de los diferentes tratamientos, los cultivos fueron clasificados de la siguiente forma:

Grupo a: Inducción sin AgNO₃ y transferido a los medios N6₁ → N6_{1A} → N6₀.

Grupo b: Inducción sin AgNO₃ y transferido a los medios N6₂ → N6₂ → N6₀.

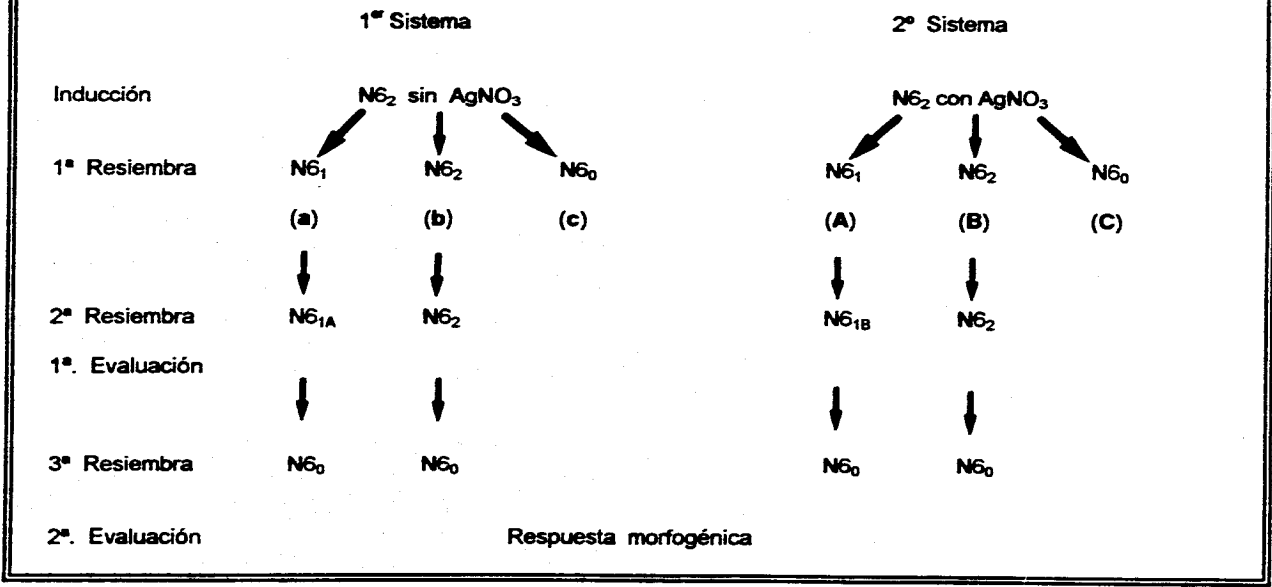
Grupo c: Inducción sin AgNO₃ y transferido en la primera resiembra al medio N6₀.

Grupo A: Inducción con AgNO₃ y transferido a los medios N6₁ → N6_{1B} → N6₀.

Grupo B: Inducción con AgNO₃ y transferido a los medios N6₂ → N6₂ → N6₀.

Grupo C: Inducción con AgNO₃ y transferido durante la primera resiembra al medio N6₀.

Diagrama de flujo No. 3
Optimización de un sistema para embriogénesis somática
de maíz Tuxpeño inmaduro.
 Explante: Embrión inmaduro (14 días después de la polinización)



Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1.- Inducción de callo

Los callos se observaron después de la primera semana del cultivo. Cuando se trabajó en ausencia de AgNO_3 , los cultivos fueron de coloración blanquecina, consistencia friable, textura granular y tamaño pequeño (0.5 mm de diámetro); no hubo necrosis, pigmentación, ni raíces. En general la calidad de callo fue buena.

Cuando se adicionó AgNO_3 , los cultivos se caracterizaron por presentar una coloración amarillo claro, textura granular, pero a diferencia del grupo anterior la consistencia fue compacta y su tamaño también fue mayor (1 cm de diámetro), no hubo necrosis ni tampoco raíces. Es pertinente mencionar que las características que presentaron estos grupos se aproximaron más a las definidas por Tomes (1985) para los callos embriogénicos tipo I, por lo que se eligió este material para continuar con los experimentos.

2.- Primera resiembra

En la primera resiembra, los grupos a, b, A y B (ver diagrama de flujo No. 3), mantuvieron las características mostradas en la inducción, pero al final de las dos semanas se observaron pequeñas raíces (1-3 mm) poco abundantes. El callo presentó un buen crecimiento, por lo que desde el punto de vista cualitativo los factores (kinetina, AgNO_3 , prolina, hidrolizado de caseína, sacarosa) que distinguen a los medios N6_1 y N6_2 no tuvieron influencia en el crecimiento del cultivo.

3.- Resiembras subsecuentes

La primera y segunda evaluación de los cultivos se realizó al concluir la segunda y tercera resiembra respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla No. 9 para los cultivos del primer sistema (sin AgNO_3), y en la tabla No. 10 para los del segundo sistema (con AgNO_3).

Los grupos a y b, mostraron la formación de embriones somáticos (es), no hubo regeneración por organogénesis (Fig. No.2E), sólo se presentaron raíces (r). En los cultivos del grupo c (colocados en el medio de regeneración durante la primera resiembra) se obtuvo regeneración, probablemente vía organogénesis, de plantas completas; las cuales fueron poco vigorosas y de crecimiento lento. El callo que no regeneró se colocó por segunda ocasión en medio N_6 y sólo se observó la formación de raíces y pocos brotes (3) muy pequeños (3 mm), que no continuaron su crecimiento.

Los resultados de los cultivos que se obtuvieron en presencia de AgNO_3 , se presentan en la tabla No. 10.

En la primera evaluación, la formación de raíces fue bastante significativa en estos callos.

Durante la segunda evaluación, en los grupos A y B se observó la formación de embriones somáticos (es). Además en el grupo A se presentaron raíces largas (3 - 14 cm) y de color rojo y dos brotes que sólo crecieron hasta 1 cm de longitud (Fig. No. 2F). En el grupo B sólo se observaron dos regiones de color verde, y no se generaron brotes ni embriones somáticos.

La regeneración, fue más eficiente en el grupo C, ya que se obtuvieron plántulas bien desarrolladas, vigorosas y de crecimiento rápido (Fig. No. 2G). Al igual que en el caso anterior la regeneración pudo ser vía organogénesis. Cuando los callos que no regeneraron se colocaron de nuevo en medio N_6 , no ocurrió formación de alguna estructura, lo cual, al igual que en el primer sistema, sugiere la pérdida del potencial morfogénico del cultivo.

Con base en estos resultados se puede definir:

- 1.- El AgNO_3 es un factor que incrementa la respuesta de regeneración (grupo C).**
- 2.- El incremento de sacarosa también influye favorablemente para que se manifieste la presencia de brotes (grupo A).**
- 3.- Cuando se mantiene una concentración elevada de Dicamba no se presenta regeneración (grupos b y B) y lo mismo ocurre cuando el AgNO_3 y el incremento de sacarosa se aplican al mismo tiempo (a).**
- 4.- Tal parece que el AgNO_3 además de ser importante para que se manifieste la respuesta de regeneración, también influye en la calidad de la misma, ya que si se comparan las plantas regeneradas de los grupos c y C es claro que la calidad de respuesta en el grupo C es mejor.**
- 5.- La adición de sacarosa y AgNO_3 debe ser en tiempos diferentes para que se manifieste el proceso de regeneración (grupo A), ya que cuando ambos factores se adicionan al mismo tiempo (grupo a) al medio de cultivo no se presenta regeneración (grupo b).**
- 6.- La falta de un choque osmótico provocado por un incremento de sacarosa y la presencia de concentraciones elevadas de Dicamba inhiben el proceso de regeneración (grupo B).**

Tabla No. 9.- Primera y segunda evaluación de los cultivos obtenidos en ausencia de AgNO₃.

Primera evaluación, a los 60 días de cultivo a partir de la inducción

GRUPO	No. DE CALLOS	RAÍZ	No. DE PROTUBERANCIAS	TEXTURA	CONSISTENCIA	COLOR
a	42	xxx	302 (r)	granular	friable	amarillo claro
b	40	xxx	157 (es y r)	granular	compacta	amarillo claro

c	Regeneración de 9 plántulas, lo cual equivale a un 56 % de rendimiento.
---	-------------------------------------------------------------------------

Segunda evaluación, a los 90 días de cultivo a partir de la inducción

GRUPO	No. DE CALLOS	RAÍZ	No. DE PROTUBERANCIAS	TEXTURA	CONSISTENCIA	COLOR
a	28	xxx	180 (es y r)	granular	friable/compacta	amarillo claro
b	28	x	43 (es y r)	granular	friable/compacta	amarillo claro

c	se presentan raíces y brotes muy pequeños.
---	--------------------------------------------

x = muy pocas raíces (1 - 5).
 xx = pocas raíces (5 - 20).
 xxx = muchas raíces (más de 20).
 es = embriones somáticos
 r = raíces

Tabla No.10.- Primera y segunda evaluación de los cultivos obtenidos en presencia de AgNO₃.

Primera evaluación, a los 60 días de cultivo a partir de la inducción

GRUPO	No. DE CALLOS	RAÍZ	No DE PROTUBERANCIAS	TEXTURA	CONSISTENCIA	COLOR
A	40	xxx	60 (r)	granular	friable	café claro
B	42	xxx	17 (es y r)	lisa	friable	café claro

C Regeneración de 11 plántulas, lo cual equivale a un 69 % de rendimiento.

Segunda evaluación, a los 90 días de cultivo a partir de la inducción

GRUPO	No. DE CALLOS	RAÍZ	No DE PROTUBERANCIAS	TEXTURA	CONSISTENCIA	COLOR
A	26	x	75 (es y r)	granular	friable/compacta	café claro
B	22	x	45 (es y r)	granular	friable/compacta	café claro

C no se observan raíces ni brotes.

- x = muy pocas raíces (1 - 5).
- xx = pocas raíces (5 - 20).
- xxx = muchas raíces (más de 20).
- es = embriones somáticos
- r = raíces

ESTE TEXTO NO DEBE
 SER USADO SIN LA
 AUTORIZACIÓN DE LA
 COMISIÓN NACIONAL
 DE ENERGÍA ATÓMICA

VI.3. EXPERIMENTOS CON DIFERENTES FITORREGULADORES PARA INDUCIR LA GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Con la finalidad de estimular el desarrollo y germinación de embriones somáticos, se consideró interesante probar el efecto de kinetina (0.05 mg/l), ABA (0.5 μ M) o GA₃ (0.5 mg/l), adicionado en el medio de cultivo a partir de la quinta resiembra, tal como se muestra en el diagrama de flujo No. 4. Para la realización de este experimento sólo se empleó callo con características embriogénicas obtenido de embrión maduro de maíz Tuxpeño. Estos cultivos presentaron estructuras nodulares en la superficie, mismas que fueron catalogadas como embriones somáticos.

Las evaluaciones se realizaron al final de la quinta resiembra, cuando los cultivos tuvieron aproximadamente 130 días de edad (a partir de la inducción de callo). Posteriormente se realizó una sexta resiembra y al finalizar el tiempo de incubación requerido, los cultivos se evaluaron por segunda vez (a los 160 días de edad).

Las características que presentaron los callos que contenían a los embriones somáticos en la superficie durante la primera y segunda evaluación, se encuentran en la tabla No. 11.

Como se observa, el control presenta un incremento en el número de protuberancias, se aclara su coloración amarillenta y se generan brotes. Sin embargo, cuando se utiliza kinetina, ABA o GA₃ en el medio de cultivo, no hubo cambios relevantes en la mayoría de los parámetros evaluados y tampoco se estimula la germinación, por tanto, la regeneración no se presenta. En este caso, sólo se observó en las regiones donde se encontraban los embriones somáticos, una coloración verde muy tenue. Esto se pudo deber a que los fitorreguladores no fueron adicionados en las concentraciones adecuadas o bien que la etapa de cultivo que se manejó (globular) no fue la más conveniente para propiciar la regeneración.

Diagrama de flujo No. 4
EXPERIMENTO CON DIFERENTES FITORREGULADORES
Inducción de la germinación de embriones somáticos.

Maíz Tuxpeño
Embrión maduro.

Inducción de callo
(21 días)

N6₂



1ª Resiembra
(cada 15 días)

N6₁



4ª Resiembra
(cada 15 días)

N6_{1B}



5ª Resiembra
(28 días)

Medios de Regeneración
(medio base N6)

- 1.- N6 sin Fitorreguladores
- II.- N6 mas Kinetina 0.05 mg / l
- III.- N6 mas ABA 0.1 µM
- IV.- N6 mas GA₃ 0.5 mg/l



* Al final de esta resiembra se realizó la PRIMERA evaluación (a los 130 días de cultivo).

6ª Resiembra
(28 días)

Mismos medios de cultivo

* Al final de esta resiembra se realizó la SEGUNDA evaluación (a los 160 días).

Cuadro No. 11. Comportamiento del cultivo embriogénico, durante la inducción de la germinación y/o regeneración de embriones somáticos.

1° Evaluación a los 130 días

Tratamiento	No. de callos	Raíz	No. de protuberancias	Textura	Consistencia	Color	No. de callos necrosados	Regeneración (germinación de embriones somáticos)
Control	34	XX	97	Granular	Compacta	Amarillo oscuro	0	Zonas de callo enverdecidas bien definidas
Kinetina	31	X	75	Amarillo claro	0	
ABA	28	X	74	6	Zonas verdes muy tenues
GA ₃	31	X	83	3	

2° Evaluación a los 160 días

Tratamiento	No. de callos	Raíz	No. de protuberancias	Textura	Consistencia	Color	No. de callos necrosados	Regeneración (germinación de embriones somáticos)
Control	28	XXX	377	Granular	Compacta	Amarillo claro	6	4 brotes muy pequeños
Kinetina	25	XX	33	Amarillo oscuro	6	2 zonas verdes
ABA	22	X	23	Amarillo claro	6	1 zona verde
GA ₃	28	X	19	9	1 zona verde

x = muy pocas raíces (1-5)

xx = pocas raíces (5-20)

xxx = muchas raíces (más de 20)

VI.4. OBTENCIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS A PARTIR DE EMBRIONES MADUROS E INMADUROS DE MAÍZ TUXPEÑO. UTILIZANDO EL PROTOCOLO REPORTADO POR BOHOROVA *et al.* (1995).

El material biológico utilizado en este experimento fue donado por CIMMYT. Los embriones inmaduros se obtuvieron dos semanas después de la polinización y los maduros de mazorcas secas de la última cosecha. Los explantes se esterilizaron y sembraron como lo indica la metodología antes descrita. Para cada caso se sembraron 50 embriones, durante la inducción de callo se utilizó el medio N6₂, en las resiembras el medio N6₁ (Tabla No. 2), hasta este momento, los cultivos se mantuvieron en obscuridad constante. El medio de regeneración fue el MSR (Bohorova, 1994), que es el medio MS modificado, adicionado de 20 g/l de sacarosa, 0.5 mg/l de ácido indol-3 acético (AIA) y 1 mg/l de 6-benzilaminopurina (6-BAP). Estos cultivos fueron incubados a 27 °C con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h obscuridad, ver diagrama de flujo No 5.

El porcentaje de regeneración de plantas fue calculado basándose en el número de callos que regeneraron, dividido entre el número de callos totales.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Embriones maduros

Durante la inducción el callo fue abundante, de color amarillo, textura granular, consistencia friable y pocas raíces.

Al finalizar la segunda resiembra, se observaron estructuras nodulares abundantes, similares a las estructuras embrionarias. La consistencia fue friable con regiones compactas en la superficie, textura granular y pocas raíces cortas (Fig. No. 2C).

En el medio de regeneración los callos presentaron regiones de color verde y se desarrollaron raíces, después de un periodo prolongado de tiempo los cultivos degeneraron y murieron.

Se observan pocas estructuras regenerativas a los 20 días en el medio de regeneración, que no progresan para dar origen a plantas normales.

Embriones inmaduros

En etapas muy tempranas de la inducción, se presentaron cambios en el tejido escutelar y al final de las tres semanas se presentó el tejido calloso, que se caracterizó por ser compacto, granular y de coloración amarillenta.

Al finalizar las dos resiembras se obtuvo un callo embriogénico tipo I (compacto, de crecimiento lento y textura granular), el cual al transferirlo al medio de regeneración, se hizo evidente la formación de embriones somáticos a la primera semana (formación de estructuras nodulares en la superficie del callo) y la regeneración de plántulas ocurrió a los 20 días del cultivo (Figs No. 2F y 2G).

Las plántulas fueron transferidas a suelo y dos semanas después llevadas a invernadero, para completar su desarrollo a planta madura y posteriormente a campo para la obtención de semilla.

Los resultados obtenidos (Tabla No. 12), indican que los callos obtenidos de embriones inmaduros de maíz Tuxpeño muestran una capacidad de regeneración de plántulas relativamente alta, su potencial fue de 68.5 %. La capacidad de regeneración se mantuvo durante los primeros seis subcultivos en el medio de regeneración.

Estos resultados superaron a los registrados en los esquemas descritos con anterioridad (Sección VI.2.1 y VI.2.2), y fueron muy similares a los cultivos obtenidos en los grupos c y C del protocolo propuesto en la sección VI.2.3, en la cual también se utilizan embriones inmaduros, sólo que en este último caso los callos presentaron características embriogénicas desde las etapas tempranas de su cultivo (Fig. No. 2F) y regeneraron plantas completas (Fig. No. 2G) que fueron fértiles y produjeron semillas normales. Por tal motivo, éste fue el protocolo que se utilizó para la obtención de callo embriogénico.

Diagrama de flujo No. 5
Obtención de callo embriogénico de maíz Tuxpeño (CIMMYT)
 Explantes: Embrión maduro
 Embrión inmaduro

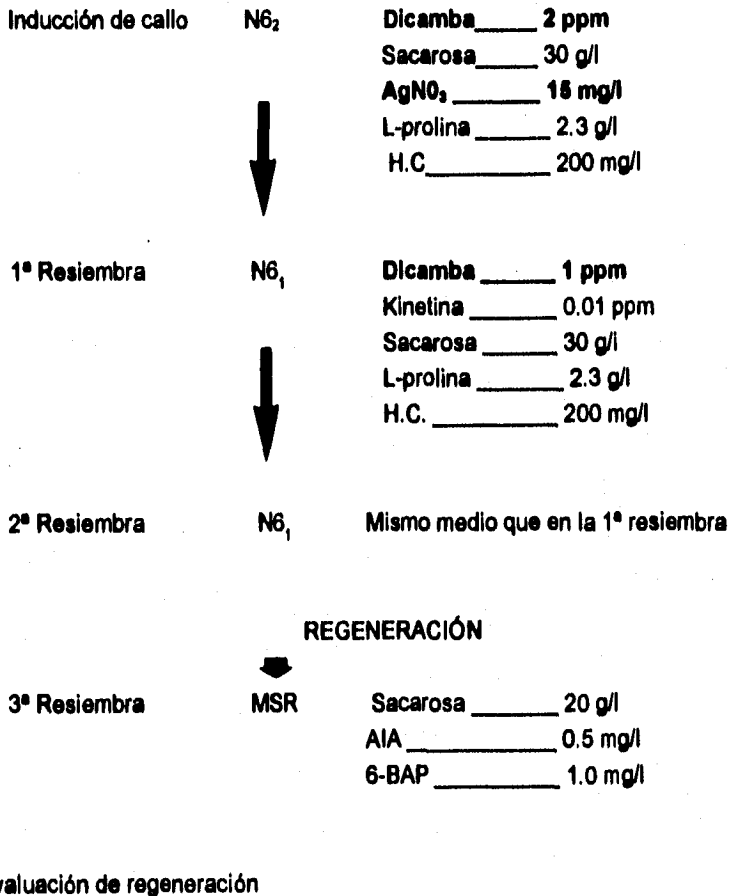


Tabla No. 12. Regeneración de plántulas de maíz Tuxpeño, en callos obtenidos a partir de embrión inmaduro cultivados en medio N6, el cual se adicionó de AIA y 6-BAP.

NO. TOTAL DE EXPLANTES	NO. TOTAL DE PLÁNTULAS	% DE REGENERACIÓN (a)	# DE PLÁNTULAS/EMBRIÓN (b)	% DE PLANTAS FÉRTILES (c)
50	158	68.5 ± 19.09	3.16 ± 2.49	80

Callo obtenido a las tres semanas en medio N6₂ y subcultivado dos ocasiones en medio N6, y que finalmente fue transferido a medio de regeneración (N6₀), la evaluación para a y b se realizó cinco semanas después.

El valor de a:

$$\frac{\text{\# de callos que regeneraron}}{\text{\# total de callos}} \times 100$$

El valor de c:

$$\frac{\text{\# de plantas fértiles}}{\text{\# total de plantas}} \times 100$$

VI. 5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Para que se manifieste el fenómeno de regeneración se requiere de la ocurrencia de cambios anatómicos y estructurales hasta la regeneración de una planta completa.

Estos cambios están ya descritos en dicotiledóneas (Tisserat *et al.*, 1979), y en monocotiledóneas; principalmente en gramíneas se sugiere que la embriogénesis somática puede ser el principal camino (bajo condiciones *in vitro*) para la regeneración, ya que son de gran importancia para el hombre (Vasil, 1982; Vasil y Vasil, 1983).

Se han realizado en los últimos años estudios histológicos al respecto, sin embargo en maíz, debido a las dificultades que implica establecer y mantener el cultivo bajo condiciones *in vitro*, la descripción histológica de la formación de embriones somáticos es muy escasa.

Se cuentan con algunos trabajos importantes que indican que la regeneración ocurre a partir de callos descritos como embriogénicos (Mott y Cure, 1978; Ozias and Vasil, 1982). Al respecto Rhodes *et al.* (1982) indicaron que los callos friables presentan un alto potencial embriogénico, esto resultó interesante, ya que la capacidad regenerativa la mantienen durante más tiempo que los cultivos de apariencia compacta (catalogados como embriogénicos del tipo I). Cabe mencionar que los callos de maíz friables (tipo II) se utilizan básicamente para el establecimiento de cultivos de células en suspensión y obtención de protoplastos, siendo en estos sistemas donde se ha determinado su potencial morfológico.

Por lo general, los estudios de tipo histológico se hacen en callos compactos (Wernicke *et al.*, 1982; Vasil, 1982; Lu *et al.*, 1982, 1983; Franz y Schel, 1991), pocos son los reportes de estudios al microscopio de callos friables (Vasil *et al.*, 1984, 1985; McClain y Hodges, 1986), debido a que son extremadamente suaves y no resisten los tratamientos indicados por las técnicas histológicas.

Los estudios que se han realizado en callos embriogénicos compactos para definir la ontogenia de los embriones somáticos, no han logrado puntualizar con claridad la ocurrencia del evento morfogénico.

El análisis histológico de los cultivos obtenidos, contribuye a comprender mejor cuales son los cambios a nivel estructural en los cultivos celulares para originar una planta completa.

En el presente trabajo se realizó el análisis histológico tanto del tipo de explante del cual se partió para la inducción de callo, así como de los cultivos con características embriogénicas que se encontraron en medio de regeneración.

I.- Histología de los explantes utilizados para la inducción de callo.

A) Embrión maduro

Se encuentra constituido por células isodiamétricas, con citoplasma denso y un núcleo evidente. Fueron observados tres tipos de meristemos, los cuales se distinguieron perfectamente de las células que forman el escutelo. En la región donde se localizó el meristemo apical se observaron los primordios foliares, le siguen los meristemos laterales (parte media del embrión) y finalmente el meristemo que dará origen a la raíz. Las células que forman al escutelo o cotiledón son grandes, isodiamétricas, con citoplasma muy denso, y núcleo grande y evidente. Se presentaron inclusiones.

El coleóptilo esta formado de células pequeñas, de forma cúbica, ordenadas en hileras, citoplasma poco denso y núcleo poco evidente.

La plúmula y los primordios foliares presentaron células pequeñas, alargadas, de núcleo pequeño y citoplasma poco denso. Cabe mencionar que en la región donde se localizó el meristemo radicular, también se encuentra la caliptra (cofia) formada por células muy alargadas; en ambos casos el citoplasma no es denso y apenas se alcanza a identificar el núcleo.

B) Embrión inmaduro

Este tipo de explante presenta varios tejidos; en primer lugar se encuentra una epidermis formada por una sola capa celular recubriendo al escutelo, también se localizan grupos de células alargadas que bien pueden ser las primeras señales de vascularización y éste se origina de la región del nudo escutelar. Además se aprecia la radícula diferenciada, la plúmula y el suspensor. En la zona de la radícula se encuentra el tejido que forma la caliptra el cual esta ya bien diferenciado.

La región que forma al escutelo presenta elevada actividad mitótica. En cuanto a la zona de transición, las células que están en la periferia presentan un citoplasma muy denso con respecto a las que se encuentran en el interior.

El análisis de los explantes utilizados para la inducción de formación de callo se realizó con la finalidad de conocer las características celulares del tejido, del cual se inició el cultivo bajo condiciones *in vitro*.

2.- Análisis histológico de los callos embriogénicos de maíz Tuxpeño.

El callo se observó seis días después de la siembra de embriones (tanto maduros como inmaduros) y surge de la parte media del embrión (Fig. 2A). Este estudio se realizó en las muestras indicadas en la metodología.

a) Cultivos obtenidos a partir de embrión Inmaduro.

Caracterización del callo primario (Inducción)

Callos de color blanquecino y muy friable, textura granular y de crecimiento rápido. En estos callos se distinguieron dos tipos de células (Fig. 2F):

Células tipo 1: Se caracterizaron por ser grandes, alargadas, con una gran vacuola, núcleo pequeño y excéntrico, citoplasma poco denso y pared celular bien

definida. Por lo cual se puede decir que presentó las características típicas de una célula parenquimática, dichas células se localizaron en la parte interna del callo.

Células tipo 2: Pequeñas, citoplasma denso, poco vacuoladas, núcleo relativamente grande y pared celular delgada. Dichas células se localizaron en el interior del callo y por sus características se determinó que son de tipo meristemático.

Además, de estos dos tipos celulares, se observó abundante tejido vascular, principalmente en la parte interna del callo, el cual se encontró rodeando a células tipo 1. En la región superficial se presentaron células del tipo 2.

Todo este conjunto celular formó regiones bien organizadas, delimitadas por una epidermis, lo cual indicó cierta diferenciación y esto coincide con las descripciones reportadas por Straub *et al.* (1992) en cultivos de *Sparabolus virginicus* (gramínea), sólo que en este caso fue en las zonas enverdecidas, donde se identificaron dichas características, por tal motivo en su estudio se hace referencia a una diferenciación celular que conlleva a una especialización del tejido.

En nuestro caso el callo careció de pigmentación, pero de acuerdo a las observaciones realizadas, también se concluyó que hay una diferenciación celular (Figs. 3A y 3B).

Caracterización del callo con dos resiembras. (T=0)

Este tipo de callo presentó un cambio en su consistencia y textura, ya que se hizo más compacto y la apariencia granular fue más firme; su coloración cambió de blanquecina a amarillenta, las raíces se observaron con más frecuencia, mientras se incrementaron las resiembras en el cultivo. Esto pudo haber ocurrido debido a la concentración endógena de auxinas, es decir, como el medio de cultivo en el que se realizó la resiembra (mantenimiento del callo) se adicionó de dicho fitorregulador, hubo restos acumulados en el tejido (Green *et al.*, 1985), lo cual provocó que la presencia de raíces fuera cada vez mayor cuando se colocó en un medio libre de auxinas. También se observaron regiones en la superficie del

callo, que se distinguieron por ser blanquecinas y sumamente friables, esto hizo pensar que posiblemente se trate de la proliferación de las regiones meristemáticas y por tanto a través de estas se dió el crecimiento del callo. El cultivo presentó todas las características de un callo embriogénico tipo I, ya descrito para maíz (Tomes, 1985; Songstad, *et al.*, 1988).

A nivel histológico se localizaron regiones de tejido calloso muy bien organizadas, cuya parte central se constituyó de tejido meristemático del cual surgen células parenquimáticas (Fig. 4A). También hubo regiones en el callo en las cuales, el tejido vascular fue poco abundante y rodeado de células parenquimáticas, mismas que dieron origen a centros meristemáticos (Fig. 4B).

Las características antes mencionadas son requisitos fundamentales (desde el punto de vista histológico) que debe presentar un callo para que se manifieste una respuesta de tipo morfogénico.

Caracterización del callo con 6 días de regeneración (T=6)

Al transcurrir la primera semana en el medio de regeneración, los callos presentaron coloración amarillenta y su consistencia fue más compacta.

Histológicamente se observaron zonas formadas por células de tipo meristemático, delimitadas por tejido epidermico. Dichas zonas constituyeron a las partes salientes del callo (Fig. 5A).

Por otra parte se localizaron zonas con abundante tejido vascular, células parenquimáticas muy laxas y no se localizó tejido meristemático (Fig. 5B).

También se localizan regiones de células grandes de tipo parenquimático, colapsadas y no se observó ningún patrón de organización. En la periferia se localizaron células con características meristemáticas ya organizadas y delimitadas por una epidermis. Cabe mencionar que estas regiones carecen de tejido vascular (Fig. 5C).

Caracterización del callo con 10 días en medio de regeneración (T=10)

Los callos que permanecieron durante 10 días en el medio de regeneración, presentaron características muy peculiares, ya que hubo regiones de consistencia friable y coloración café claro. También, se localizaron zonas blanquecinas de textura granular y otras compactas que se distinguieron por tener coloración verde. Es pertinente mencionar que casi no se desarrollaron raíces en el callo, en caso de haber, éstas fueron muy pequeñas.

Histológicamente se localizó tejido vascular abundante cubierto por células parenquimáticas (Fig. No. 6A). Por otra parte se observaron estructuras que bien pueden ser embriones somáticos en etapa globular, similares a las reportadas por Wareing y Graham, (1976) en callos obtenidos de anteras de *Datura innoxia*; también Fransz y Schel, (1991), Straub *et al.*, (1992) y Emons *et al.*, (1993) quienes hacen referencia a dichas estructuras en cultivos de callos de maíz que fueron colocados en medio de regeneración, libre de fitoreguladores.

Los embriones somáticos tuvieron como base, tejido parenquimatoso Fig. No. 6A) y varias capas de células meristemáticas, entre las que se distinguió una organización celular, lo cual constituyó la base del embrión somático (suspensor). A continuación se localiza la región correspondiente al polo radicular y esto permite determinar la polaridad de la estructura. En la parte media la población celular fue muy homogénea (siguió siendo de tipo meristemático), por último en la parte apical se apreció la formación del cotiledón constituido por células de tipo meristemático con una densidad celular más alta que las otras dos regiones, lo cual indicó una elevada actividad mitótica y por tanto el crecimiento de la estructura. Cabe mencionar que por todas las características antes mencionadas, los embriones somáticos se encuentra en los primeros estadios de su desarrollo.

Las regiones del callo compacto se caracterizaron por presentar en la periferia células organizadas formando una epidermis, el tamaño celular fue variable. En general el núcleo fue muy pequeño y las células presentaron pocas divisiones mitóticas (Figura 6B). Se presentan señales de pigmentación y abunda el tejido vascular en todo el callo, lo cual implica una especialización celular (Emons y Kieft, 1991).

b) Cultivos obtenidos a partir de embrión maduro.

Caracterización del callo primario (Inducción)

Este callo fue de color blanquecino, consistencia friable, textura granular y carece de raíces por completo (Fig. 2C). Histológicamente presentaron características similares a las del callo obtenido de embrión inmaduro, sólo que en este caso no se presentaron regiones organizadas.

Caracterización del callo con dos resiembras (T=0)

El material presentó una coloración amarillenta, textura granular y consistencia en su mayoría friable y sólo algunas regiones compactas, careció de raíces y en la superficie presentó protuberancias que por sus características, probablemente generen pequeñas raíces.

Histológicamente, este callo presentó grupos de células meristemáticas rodeadas de células parenquimáticas (Fig. 7A). El tejido vascular fue poco abundante y un aspecto importante de este callo fue que se observaron porciones del explante original, en cuya superficie se localizan las células que formarán al tejido calloso (Fig. 7C).

También se observaron regiones determinadas como embriogénicas, antes de presentar la primera división formar un embrión somático (Fig. 7B).

Caracterización del callo con 10 días en el medio de regeneración (T=10)

En esta etapa, el callo presentó consistencia friable y la textura siguió siendo granular, se observaron zonas de color verde claro en la superficie. Abundaron las protuberancias blanquecinas o de color rojizo, que se catalogaron a través de cortes histológicos como raíces muy pequeñas.

El tejido vascular fue abundante y muchas veces se encontró embebido entre las células parenquimáticas, también se observó la formación de raíces de diversos tamaños, en las cuales la organización celular es muy marcada (Fig. 8A).

No hubo formación de embriones somáticos, más bien el tejido se constituyó de células parenquimáticas con cloroplastos en su interior, este tejido se delimitó en algunas regiones por una epidermis (Fig. 8B).

Caracterización del callo con 27 días en medio de regeneración.(T=27)

Este callo fue de coloración café claro, con regiones enverdecidas, raíces abundantes de color blanco y rojizo, siendo estas últimas más gruesas. Se generaron brotes aberrantes.

Histológicamente se observaron: células grandes parenquimáticas, con inclusiones (probablemente amiloplastos y/o de naturaleza lipídica) y numerosos espacios intercelulares. En la mayoría de los casos hubo una epidermis bien diferenciada (Figs. 9A y 9B).

La descripción anterior permitió indicar que en este caso existe un alto grado de diferenciación celular, es decir, que aunque no hubo formación de brote y/o embrión somático, las células con inclusiones pueden pertenecer a tejido escutelar de un embrión somático o bien que las células que presentaron plastos correspondieron a brotes que nunca llegaron a ser evidentes a simple vista. Estos resultados son similares a las estructuras y tipos celulares obtenidos por Bhaskaran *et al.*, (1988); Franz y Schel, (1991); Songstad *et al.*, (1992) en maíz y por Andi *et al.*, (1993), en caña de azúcar. Estos autores coinciden en que la acumulación de reservas ocurre en los embriones somáticos desde estadios muy tempranos de desarrollo y posteriormente se incrementa considerablemente en la región escutelar, lo cual indica la presencia de estructuras con un alto nivel de organización.

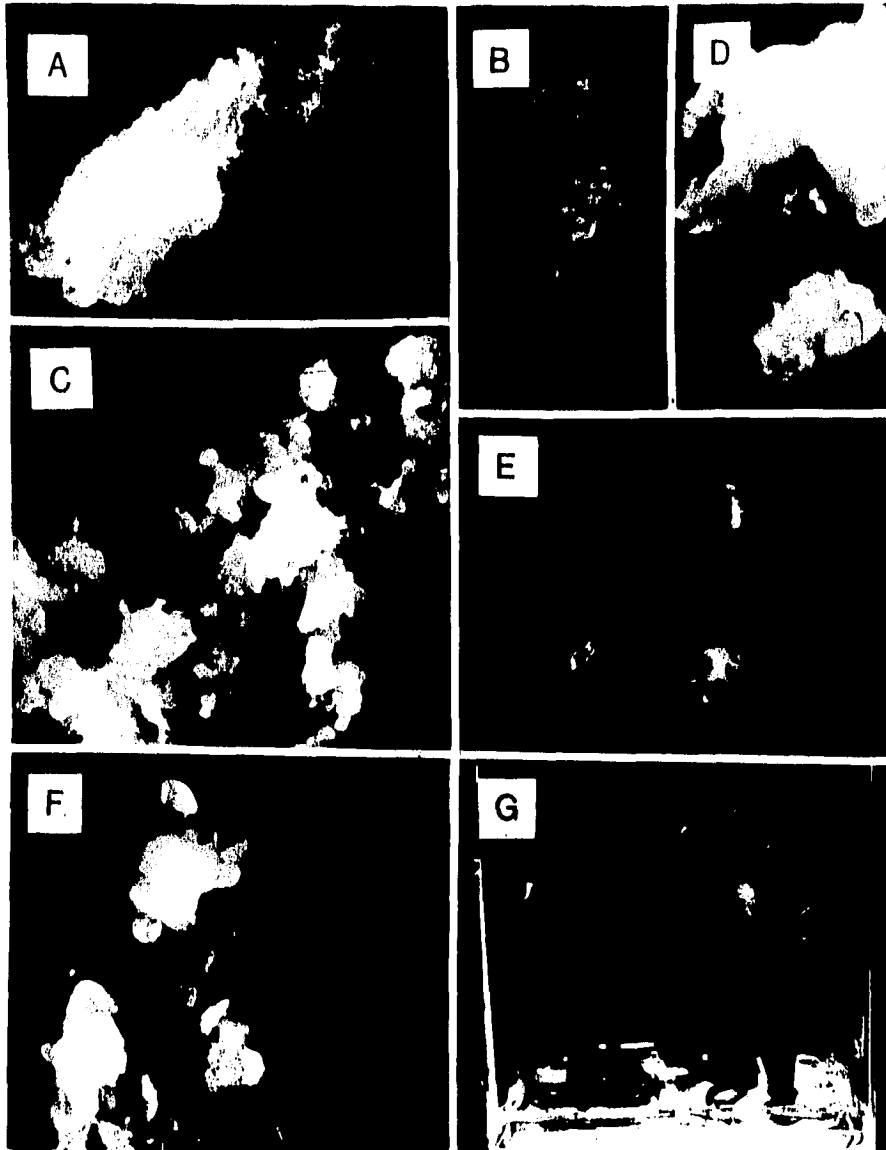


Figura No. 2. Cultivos *in vitro* de maíz Tuxpeño. A y B) callo primario a partir de embrión completo y eje embrionario respectivamente (material maduro). C y D) callo embriogénico proveniente de embrión completo y eje embrionario (material maduro), en presencia de AgNO_3 . E) callo embriogénico obtenido de embrión inmaduro en ausencia de AgNO_3 . F) callo embriogénico obtenido de embrión inmaduro en presencia de AgNO_3 . G) plántulas regeneradas en callos embriogénicos, los cuales fueron obtenidas de embriones inmaduros en presencia de AgNO_3 .

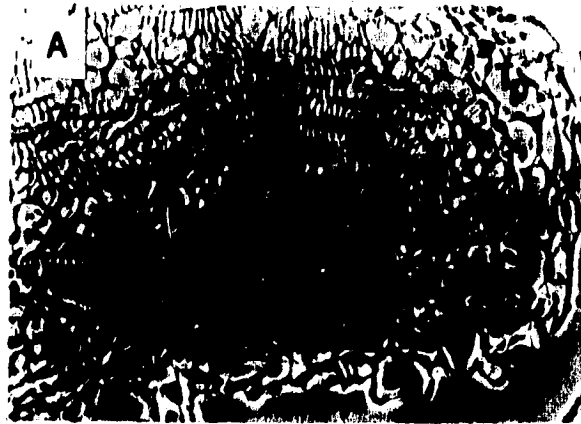


Figura No. 3A y 3B. Caracterización histológica del callo primario, obtenido a partir de embriones inmaduros, (estos cultivos se obtuvieron tres semanas después de haber sembrado el explante en medio N6). A) en el interior se observa tejido vascular (Tv) abundante, del cual surge tejido parenquimático (Tp). B) también se observaron centros meristemáticos (Cm) rodeados por una epidermis (Ep). Escala 2.8 μm . Contraste de fases.



Figura. No. 4A y 4B. Cortes histológicos de callo subcultivado durante dos ocasiones en medio N6. Este material se caracterizó por presentar centros meristemáticos (Cm) de los cuales surge tejido parenquimático (Tp), el tejido vascular (Tv) fue poco abundante. Nótese la organización que se presenta a partir del tejido vascular, ya que ésta reúne todas las características para que ocurra la formación de un embrión somático (B). Es decir, a partir de una zona formada por tejido vascular y parenquimático, surgen centros meristemáticos. Fig. 4A, escala 5.5 μm ; Fig. 4B, escala 1.1 μm . Contraste de fases.

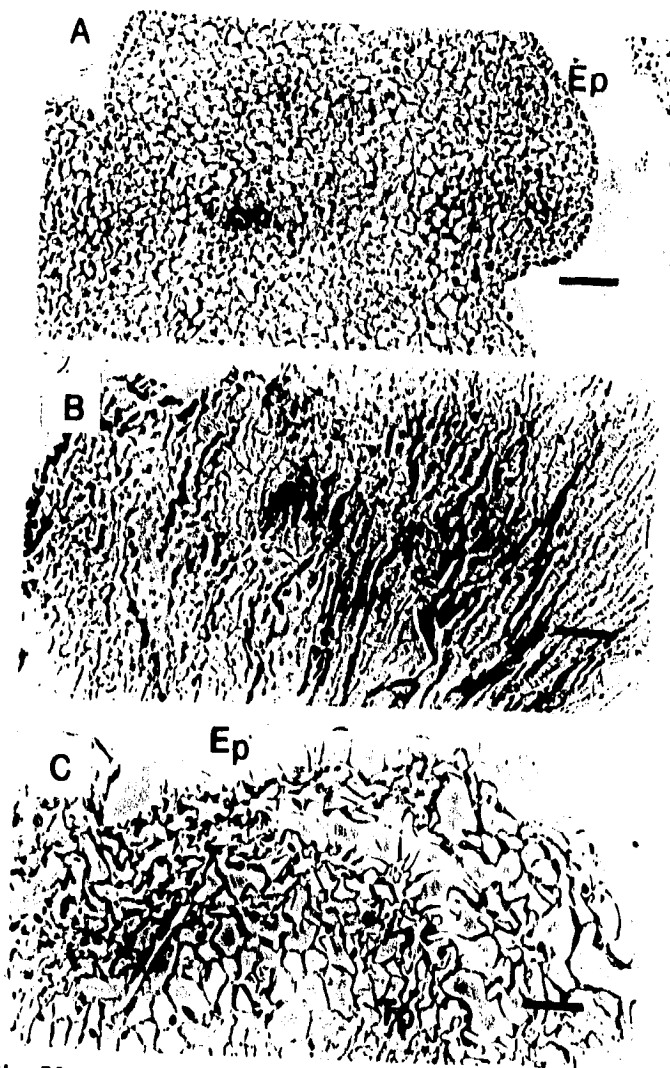


Figura. No. 5A, 5B y 5C. Callos embriogénicos obtenidos de embrión inmaduro que permanecieron una semana en medio de regeneración. A) se observaron protuberancias de tejido, formadas por células de tipo meristemático (cm) y delimitadas por una epidermis (Ep). B) también se localizaron regiones con abundante tejido vascular (Tv) rodeado de capas celulares que se tiñeron intensamente. C) otras zonas del callo carecieron de tejido vascular y únicamente se constituyeron de tejido parenquemático (Tp) delimitado por una epidermis (Ep). Fig. 5A, escala 5.6 μ m; Fig. 5B, escala 6.5 μ m; Fig 5C, escala 2.8 μ m. Contraste de fases

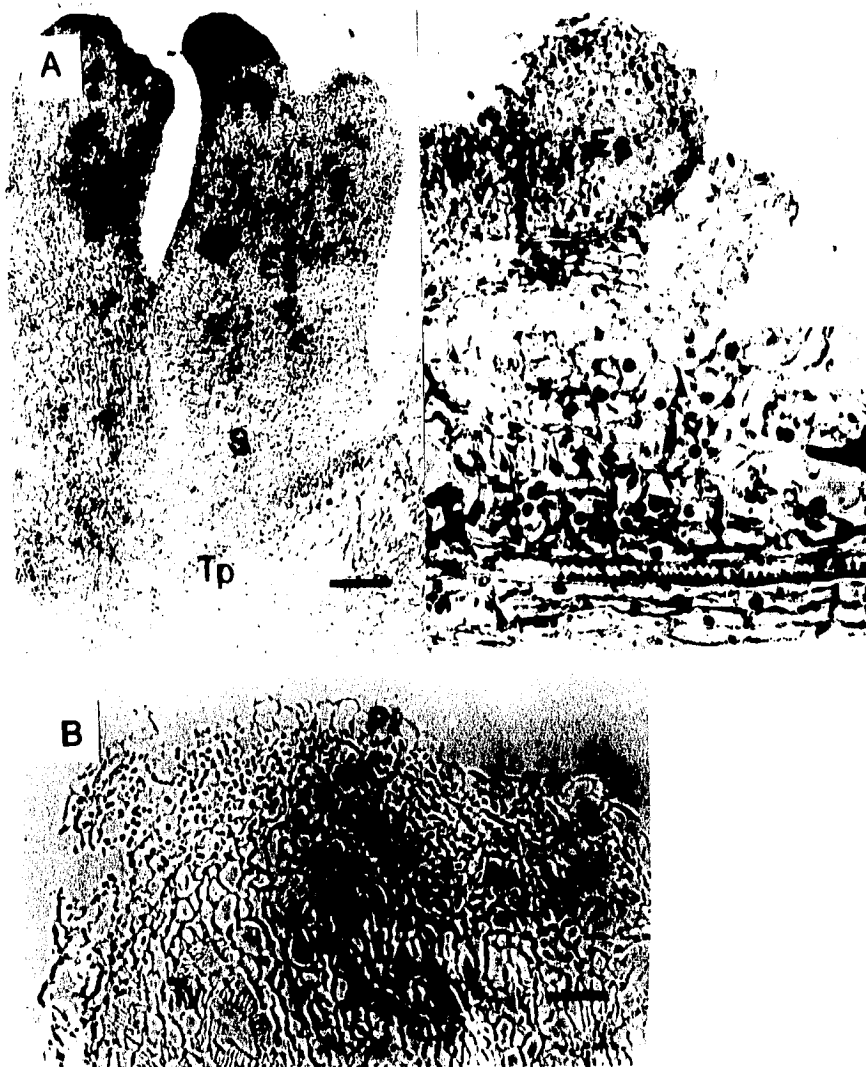


Figura. No. 6A y 6B. Cortes histológicos de callos embriogénicos provenientes de embriones inmaduros, en este caso permanecieron diez días en medio de regeneración. Cabe mencionar que se trató de material compacto. A) se presentaron embriones somáticos (Es) tanto en etapa globular como en forma alargada, es decir, más desarrollados debido a que ya se presenta el cotiledón (Co), el suspensor (S) y una epidermis bien diferenciada. B) también se localizaron zonas de tejido vascular (Tv), combinado con tejido parenquimático (Tp), observándose en la periferia la presencia de células con plastos (Pl). Fig. 6A, escala 8.2 μm ; Fig. 6B, escala 4.3 μm . Contraste de fases.

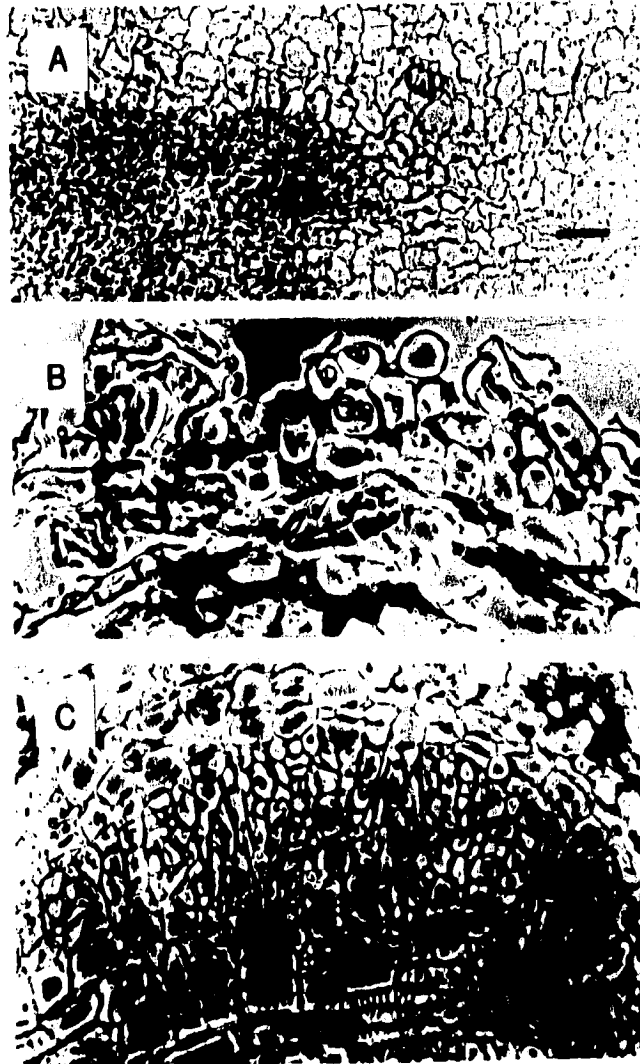


Figura No. 7A, 7B y 7C. Caracterización de los callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones maduros. A) se encontraron centros meristemáticos (Cm) rodeados de células parenquimáticas (Cp) típicas de callo. B) también se observaron regiones celulares descritas como embriogénicas (Ce) y el tejido vascular (Tv) fue poco abundante. C) porciones de tejido del explante original (Teo). Figs. 7A, 7B y 7C, escala 2.6 μm . Contraste de fases.

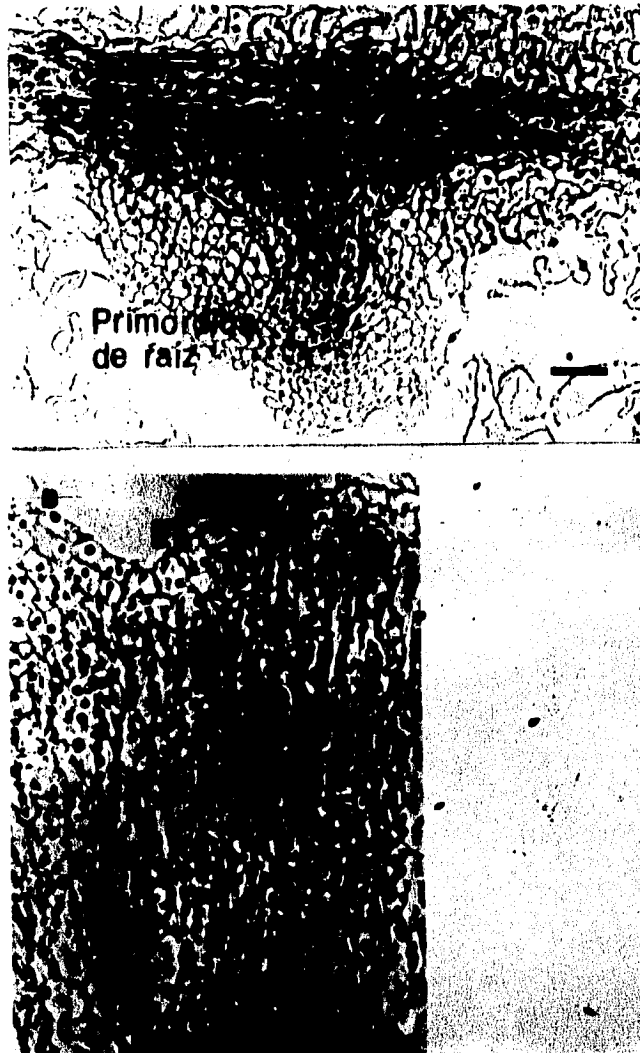


Figura No. 8A y 8B. Cultivos embriogénicos provenientes de embriones maduros y que permanecieron durante diez días en medio de regeneración. No se localizaron embriones somáticos. A) células típicas de callo y raíces pequeñas. B) tejido vascular (Tv) poco abundante y plastos (Pl), estas regiones de tejido estuvieron delimitadas por una epidermis (Ep) y no se logró apreciar la formación de alguna estructura. Fig. 8A, escala 4.3 μm ; Fig. 8B, escala 5.1 μm . Contraste de fases.

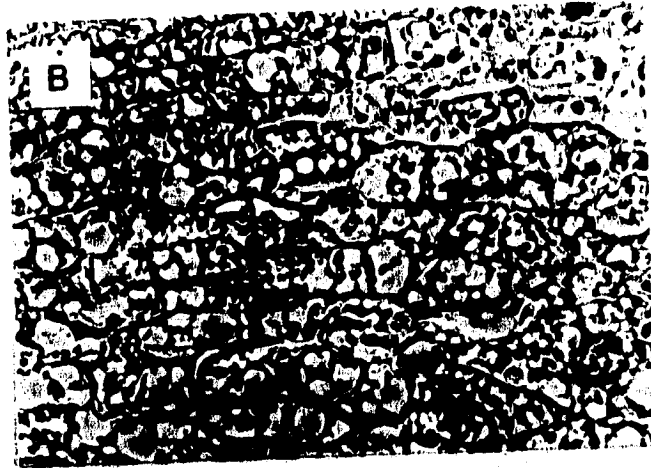
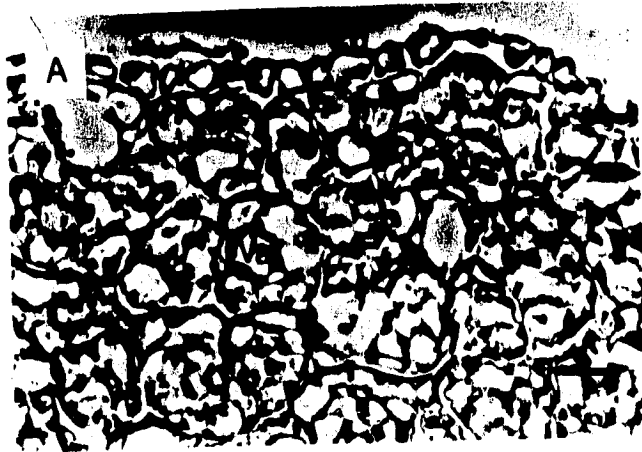


Figura No. 9A y 9B. Tejido de 27 días en medio de regeneración. Este cultivo se caracterizó por presentar células grandes, que contenían plastos (Pl) e inclusiones (almidón o lípidos) abundantes. Estas regiones se delimitaron por una epidermis (Ep). Fig. 9A, escala 1.2 μm ; Fig. 9B, 2.5 μm . Contraste de fases

VI.6.- ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LA PARED CELULAR

VI.6.1 - INFLUENCIA DE LAS AUXINAS EN EL RECAMBIO DE PROLINA A HIDROXIPROLINA EN PROTEÍNAS DE PARED DE MAÍZ TUXPEÑO MADURO

a) En ejes embrionarios

Una de las preguntas que se planteó en esta investigación fue, saber cómo influyen las auxinas en el recambio de prolina a hidroxoprolina en la pared celular durante la germinación. En forma preliminar y por antecedentes que se tenían en el laboratorio (Pérez *et al.*, 1990 y Aguilar *et al.*, 1992) se procedió a germinar 200 semillas de maíz durante 48 h en presencia de auxinas (MCP, Dicamba y AIA), cuya concentración fue 20 μM y en cantidades que habitualmente se utilizan (MCP 10 mg/l y Dicamba 2 mg/l) en el laboratorio, para propiciar la inducción de callo, posteriormente se extrajeron los ejes embrionarios y se colocaron en 10 ml de medio N6 para darles el pulso de prolina- ^{14}C , como se indicó en la metodología. La cantidad de material utilizado se presenta en la tabla No. 13.

Posteriormente, se procedió a la extracción de las proteínas de pared, determinación de la cantidad de proteína por espectrofotometría, utilizando el método de Bradford y se corrió una electroforesis de las muestras. Por otra parte, muestras de estas proteínas se hidrolizaron para la realización de la cromatografía bidimensional.

Los resultados obtenidos con respecto a la cantidad de proteína y la incorporación de prolina- ^{14}C se muestran en la tabla No. 14.

El valor más alto de incorporación de prolina- ^{14}C se obtuvo en proteínas de pared de ejes germinados con Dicamba, le siguen los tratamientos en los que se utilizó MCP, tanto en la concentración habitual para la obtención del callo (46 μM), como a concentraciones de 20 μM . El AIA ocupa el último lugar en lo que respecta a las auxinas y le sigue el control (agua). El valor (408 cpm/mg de proteína) de incorporación que presentan los ejes secos se utilizó como control de contaminación, pues en ningún momento se propició la incorporación en este

material, ya que los embriones no germinaron. Cabe mencionar que este valor fue sustraído de los valores obtenidos en las muestras problema. Los resultados parecen indicar que las auxinas promueven el recambio de la pared celular, ya que se encontró incorporación del isótopo en este material por arriba del control, siendo la auxina más eficiente el Dicamba. Además se observó que a mayor concentración de MCPP (46 μM) este estímulo se ve incrementado lo cual indica que la concentración óptima para cada auxina es diferente. El hecho de que en los tratamientos de AIA se registre una baja incorporación de prolina- ^{14}C puede deberse a que es, dentro del grupo de la auxinas, la más débil (Tabla No. 14).

En cuanto a la conversión de prolina a hidroxiprolina, proceso que ocurre en las proteínas una vez que se ha incorporado la prolina, se observa que en los tratamientos con 20 μM de auxinas aumenta esta conversión por activación del paso de prolina a hidroxiprolina, en comparación con la germinación en agua, estos resultados se pueden apreciar mejor en la tabla No. 15. Cuando no se utiliza la auxina (caso control), la conversión ocurre en menor proporción que cuando está presente cualquiera de las auxinas. Lo cual indica que en general para esta parte del experimento la velocidad de conversión de prolina a hidroxiprolina fue estimulada por este tipo de fitoreguladores.

Por los resultados obtenidos se puede indicar que:

- 1.- Las auxinas durante la germinación favorecen la incorporación de prolina- ^{14}C a proteínas de pared celular, siendo más evidente cuando se utilizan concentraciones óptimas para cada auxina. Esto sugiere que la auxina estimula la síntesis de proteínas de pared celular, ricas en prolina.
- 2.- Durante la germinación se produce una gran cantidad de hidroxiprolina a expensas de la prolina en las proteínas de pared.
- 3.- La auxina favorece el recambio de la prolina a hidroxiprolina en las proteínas de pared celular.

Tabla No. 13. Material utilizado para evaluar la influencia de las auxinas en la conversión de prolina a hidroxiprolina en ejes embrionarios de maíz Tuxpeño.

Muestra	gramos de ejes embrionarios	Tratamiento
1	7	MCCP (20 μ M)
2	8	MCCP (20 μ M)
3	7	AIA (20 μ M)
4	5	AIA (20 μ M)
5	10	agua (control)
6	7	sin germinar (seco)
7	7.5	MCCP (46 μ M)
8	7	Dicamba (9 μ M)

Semillas germinadas durante 48 h, bajo los diferentes tratamientos.
Pulso de 10 μ Ci durante 5 h en ejes embrionarios germinados
Prolina- 14 C. Actividad específica: 290 mCi/mmol

Tabla No. 14. Resultados de la incorporación de prolina-¹⁴C en las proteínas de las paredes celulares de ejes germinados con diferentes concentraciones de auxinas

Muestra	Tratamiento	Concentración empleada	µg de proteína por cada 100 µl	cpm/mg de proteína
8	Dicamba	9 µM	600.0	48,711
7	MCCP	46 µM	426.6	19,868
1	MCCP	20 µM	204.0	4,747
2	MCCP	20 µM	174.0	3,037
3	AIA	20 µM	282.0	2,430
4	AIA	20 µM	308.0	2,296
5	Agua	-	587.0	1,106
6	eje seco	-	129.0	408

Los datos están ordenados en forma decreciente, tomando en cuenta el valor de la incorporación.

Como se mencionó anteriormente, por trabajos realizados en el laboratorio se decidió utilizar a los fitorreguladores en una concentración de 20 µM y con la finalidad de comparar el tipo de respuesta se emplearon también concentraciones con las cuales se obtiene callo embriogénico (Tabla No. 14). Estos resultados muestran que el Dicamba es la auxina que más favorece la incorporación de Prolina-¹⁴C en las paredes celulares, durante la germinación de ejes. Esto apoya la idea de que dicho fitorregulador puede ser un factor importante para que el cultivo celular pueda llegar a manifestar su capacidad embriogénica.

Tabla No 15. Relación de Prolina-Hidroxiprolina (P/H) en paredes celulares de ejes embrionarios maduros de maíz Tuxpeño.

No. de Muestra	Tratamiento	Concentración empleada	CPM P/H	Relación P/H
1	MCPP	20 μ M	2,997 / 16,656	0.18
2	MCPP	20 μ M	2,583 / 26,809	0.10
3	AIA	20 μ M	5,413 / 33,826	0.16
4	AIA	20 μ M	1,958 / 13,226	0.15
5	Agua	(control)	8,096 / 26,568	0.30

Cuando se determinó la relación Prolina-Hidroxiprolina, se encontró que durante la germinación de ejes embrionarios en presencia de 20 μ M de auxinas predominan los niveles de hidroxiprolina. A concentraciones de auxinas utilizadas para Inducir callo (datos no mostrados), se observó que los niveles de hidroxiprolina también son muy elevados (Tabla No. 15). En general se puede inferir que la auxina de alguna forma, propicia la conversión de prolina a hidroxiprolina y que éste es un factor muy importante para promover la elongación y la división celular, siendo éste uno de los primeros eventos que deben manifestarse para que junto con otros cambios, tanto bioquímicos como estructurales, el tejido calloso adquiera una alta capacidad regenerativa.

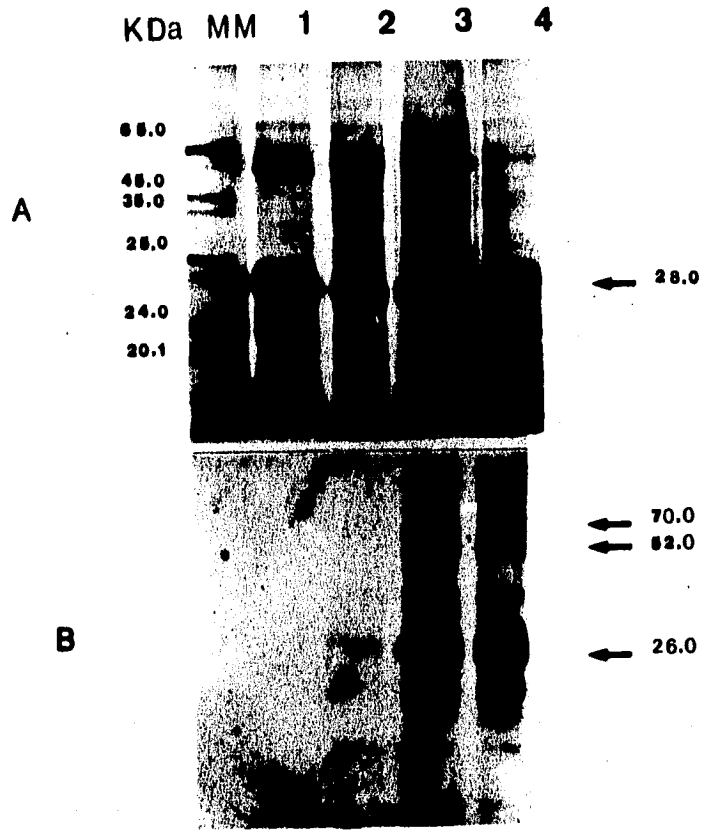


Figura No. 10. Proteínas totales de paredes celulares en ejes de embriones maduros de maíz Tuxpeño germinados durante 48 h, a los cuales se les dió un pulso de prolina-¹⁴C y se incubaron durante 5 h. A) electroforesis y B) autorradiografía.

Caril	Muestra
1	eje seco
2	eje germinado en agua
3	eje germinado en MCPP
4	eje germinado en Dicamba

Al realizar la electroforesis de proteínas de pared celular de estas muestras (utilizando 100 μ g de proteína total por carril), se obtuvo un gel que presentó un patrón de proteínas totales de pared similar en todos los casos, sin embargo hay algunas bandas que sobresalen en forma diferencial; es decir los patrones presentan bandas similares, excepto que la intensidad con la que se tiñen algunas de ellas es diferente. Cuando se hizo la autorradiografía de estos geles (Fig. 10 B) se revelaron bandas de proteínas marcadas sólo en los tratamientos en los que se adicionó alguna auxina (carril 3); esto indica que aunque el patrón de proteínas totales de pared celular sea similar, el fitorregulador estimula en forma diferencial la expresión de las proteínas que contienen prolina. Además debe notarse que el tratamiento con Dicamba (carril 4), induce una mayor incorporación que el de MCPP (carril 3).

La banda con mayor incorporación corresponde a 28 KDa, otras bandas marcadas fueron de 70, 52 y 26 KDa aproximadamente.

Con base en estos resultados se puede concluir que hay síntesis *de novo* de proteínas de la pared celular estimulada por auxinas y en especial cabe hacer notar que el Dicamba estimula más dicha síntesis y esto es congruente con los resultados que se presentan en la tabla No. 14.

Estos experimentos son preliminares, por consiguiente asumimos que el método de extracción es el adecuado y está bien realizado (ya que el patrón electroforético es constante en las tres repeticiones realizadas, lo que indica las buenas condiciones de la muestra), por tanto es confiable para la obtención de proteínas de pared celular en trabajos posteriores.

b) En cultivo de callos embriogénicos provenientes de embriones maduros de maíz tuxpeño.

Las muestras utilizadas en este experimento se presentan en la tabla No.16. El callo que se encontró al final de la segunda resiembra se describe como "en presencia de Dicamba" y en medio N6₁. El otro tipo de muestra es material que ya ha rebasado las dos resiembras y que finalmente estuvo en medio de regeneración (N6₀), que fue el momento en que se tomó la muestra y en el cuadro antes mencionado se marca sin auxina.

Resultados obtenidos:

Se encontró que la incorporación de prolina-¹⁴C se favoreció en presencia de Dicamba y esto ocurrió independientemente de la adición al medio de cultivo de AgNO₃ durante la inducción de callo. Lo anterior implica que este compuesto no influye en el proceso de incorporación. En el caso de las muestras que ya no estaban en presencia de auxina, los niveles de incorporación fueron más bajos (Tabla No. 17).

Estos resultados coincidieron en cierta forma con lo que se obtuvo en el experimento anterior (en ejes embrionarios), lo cual permitió concluir que las auxinas y de ellas principalmente Dicamba, facilitó la incorporación de prolina-¹⁴C a las proteínas de pared celular por estimular la síntesis de proteínas en general, o de pared en particular.

Tabla No. 16. Material utilizado para evaluar la transformación de prolina a hidroxiprolina en cultivos de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño..

Muestra	Cantidad (g)	Auxina (1 mg/l)	Etapas de cultivo
1	5	Dicamba	Callo de embrión, sin AgNO ₃ en N6 ₁
2	8	Dicamba	Callo de embrión, con AgNO ₃ en N6 ₁
3	4	sin auxina	Callo de embrión, sin AgNO ₃ en N6 ₀
4	13	sin auxina	Callo de embrión con AgNO ₃ en N6 ₀

Las muestras 1 y 2 fueron evaluadas a los 45 días de cultivo y las muestras 3 y 4 fueron evaluadas a los 60 días de cultivo.

Tabla No. 17. Resultados de la cantidad de proteína y la incorporación de Prolina-¹⁴C en las paredes celulares de cultivos embriogénicos provenientes de embriones maduros de maíz Tuxpeño.

Muestra	Auxina (mg/l)	µg de proteína por cada 100 µl de muestra	cpm/mg de proteína
1	Dicamba	34.0	57,959.8
2	Dicamba	23.1	46,011.9
3	sin auxina	21.0	7,469.9
4	sin auxina	33.6	7,029.8

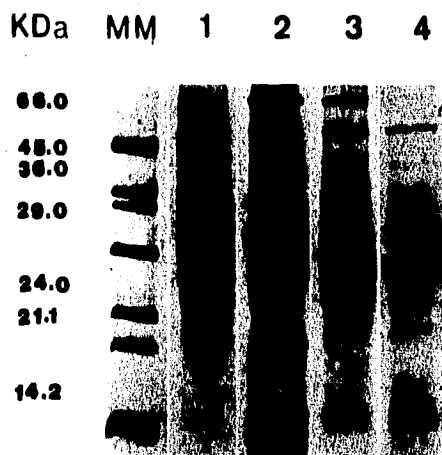


Figura No.11. Proteínas totales de paredes celulares de callo embriogénico proveniente de maíz Tuxpeño maduro. En todos los tratamientos se empleó Dicamba (1 mg/l)

Carril	Muestra
1	callo proveniente de eje sin AgNO_3
2	callo proveniente de embrión completo sin AgNO_3
3	callo proveniente de embrión completo con AgNO_3
4	callo primario

Cuando se realizó el estudio electroforético de las muestras de callo embriogénico, se observó que el patrón de proteínas totales fue muy similar en todos los casos. En el carril número 2 (cultivos provenientes de embrión completo y sin AgNO_3) las bandas se tiñeron con mayor intensidad y son más abundantes con respecto a las del carril número 1 (cultivos que se originaron de eje embrionario y sin AgNO_3), lo cual puede deberse al tipo de explante utilizado para la obtención de callo embriogénico. En cuanto a los carriles 2 y 3, se puede definir que no hay una diferencia significativa en cuanto al contenido de bandas por efecto de la presencia o ausencia del AgNO_3 , esto indica que dicho factor no interviene en la síntesis proteica durante la adquisición de la capacidad embriogénica de los cultivos celulares de maíz. Finalmente al comparar los carriles 3 y 4 (cabe mencionar que la muestra que se utilizó en el carril 4 fue callo primario), se nota claramente que va ocurriendo una transformación en cuanto a la composición proteica de la pared celular, ya que tanto la cantidad como la intensidad de las bandas fue mayor en los cultivos que han sido tratados con auxinas para hacerlos embriogénicos (carril 3), con respecto al control (carril 4).

También en este caso se determinaron las masas moleculares de las bandas más sobresalientes en los cuatro tratamientos, los cuales fueron: 77, 30 y 27 KDa.

Por otra parte, los cultivos que en esta sección se marcan sin auxina es porque se encontraban en medio de regeneración, lo cual indica que ya han pasado por el medio de inducción y resiembra ($\text{N6}_2 \rightarrow \text{N6}_1 \rightarrow \text{N6}_0$), es decir, se han procesado para hacerlos embriogénicos. Aunque el gel no se presente, se observó un patrón similar de proteínas, al de los callos de segunda resiembra.

VI.8.2. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE PROLINA-HIDROXIPROLINA EN CULTIVOS *In vitro* DE MAÍZ PROVENIENTES DE EMBRIONES MADUROS E INMADUROS .

Para los callos provenientes de embrión maduro sólo se tomó muestra del material a partir del cual se inició la etapa de regeneración (T=0) y a los 10 días de mantener el cultivo en ese proceso (T=10), ya que las características morfológicas que presentaron no fueron determinantes para que se presentara un proceso morfogénico (descritas en la parte histológica), por tanto no se consideró importante muestrear a otros tiempos de esta etapa de cultivo.

En los cultivos que se originaron de embrión inmaduro, dada la relevancia de sus características embriogénicas, se tomaron muestras a los 0, 6, 10 y 21 días de haber permanecido en el medio de regeneración ($T_0 = 0$, $T_6 = 6$, $T_{10} = 10$, $T_{21} = 21$ respectivamente), todas las muestras de material antes mencionadas fueron también procesadas para la realización del análisis histológico (figs. 3 - 6).

En la tabla No. 18, se muestra la cantidad y tipo de material (número de días en el medio de regeneración), en el que se realizó el estudio, la cantidad de proteína y los valores de la incorporación de la prolina- ^{14}C en las proteínas de pared durante el tiempo de marca. Los resultados obtenidos indican que en callos provenientes de embrión maduro los valores de incorporación fueron muy altos, principalmente en el tiempo $T = 0$, esto se traduce en una síntesis activa de proteínas ricas en prolina que conforman la pared celular; este material provenía de un medio adicionado de Dicamba, lo cual significa que se favorece dicha incorporación. Cuando el callo permaneció 10 días en el medio de regeneración (en ausencia de auxinas) la incorporación disminuye, lo cual en un momento dado pudo deberse a la carencia de dicho fitorregulador y por tanto la síntesis proteica se ve disminuída.

En estos callos no se observó la formación de embriones somáticos, más bien se generan tejidos diferenciados dispersos (Fig. No. 8, sección VI. 5).

En los cultivos provenientes de embrión inmaduro al tiempo cero, la incorporación de prolina-¹⁴C presenta altos niveles, mostrándose un incremento a los 6 días en medio de regeneración, siendo ésta la etapa del cultivo más activa en cuanto a la síntesis de proteínas de pared celular, ya que a los 10 y 21 días en medio de regeneración la incorporación de prolina disminuye y por tanto la actividad de síntesis, acentuándose a los 21 días de cultivo. Los resultados de incorporación correlacionan con las observaciones histológicas, en las cuales se determinó que a los 6 y 10 días de que el cultivo permaneció en medio de regeneración, es el momento en que se presenta la diferenciación celular y se dispara la formación de embriones somáticos (Fig. 6A, sección VI.5.).

Cuando se realizó la evaluación de la relación prolina/hidroxiprolina de estos callos (Tabla No. 19), se encontró que en los callos provenientes de embrión maduro, la conversión de prolina a hidroxiprolina es baja ($P/H > 1$), sin embargo los cultivos que se originaron de embrión inmaduro mostraron una relación de P/H que fluctuó alrededor de 0.2, con excepción de los cultivos que permanecieron 6 días en el medio de regeneración, cuyo valor (0.58) indica que el cambio de prolina a hidroxiprolina fue menos acelerado.

Tabla No. 18. Callo embriogénico obtenido de embriones maduros e inmaduros de maíz Tuxpeño. El valor de T indica el tiempo que el tejido ha permanecido en medio de regeneración. Se muestran los valores de incorporación de Prolina-¹⁴C (cmp) en las proteínas de pared celular de estos tejidos.

Embrión maduro

Muestra	Cantidad (g)	Tipo de material	cpm/mg de proteína
1	10	Callo T = 0	69,221
2	10	Callo T = 10	37,464

Embrión inmaduro

3	11.7	Callo T = 0	31,400
4	18.0	Callo T = 6	35,000
5	7.0	Callo T = 10	32,780
6	8.9	Callo T = 21	19,500

Tabla No. 19. Relación Prolina-Hidroxiprolina (P/H) en paredes celulares de callos embriogénicos, obtenidos a partir de embriones maduros e inmaduros de maíz Tuxpeño.

Embrión maduro

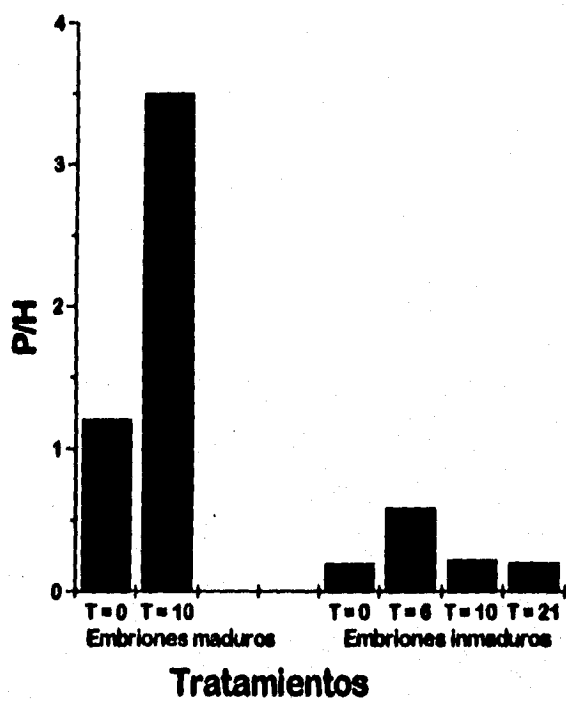
Muestra	CPM (P/H)	Relación P/H
1 (T = 0)	19,814.0 / 16,719.0	1.2
2 (T = 10)	43,202.0 / 12,238.0	3.5

Embrión inmaduro

3 (T = 0)	3,461.5 / 17,730.5	0.19
4 (T = 6)	7,028.5 / 12,137.5	0.58
5 (T = 10)	3,094.5 / 13,854.0	0.22
6 (T = 21)	1,998.0 / 9,657.5	0.20

La conversión que mostraron los callos provenientes de embrión maduro fue relativamente baja en comparación con la de embrión inmaduro, siendo mayor en T=0. En ambos tiempos se presentan niveles altos de prolina y esto se relaciona con la respuesta morfológica de los cultivos, la cual fue poco eficiente (Figs. 7, 8 y 9). Los callos provenientes de embriones inmaduros presentan una conversión más eficiente que los maduros desde el inicio (T=0) hasta el final del cultivo (T=21), siendo a los 6 días en medio de regeneración el tiempo en que esta conversión se disminuye y después parece estabilizarse. Esto se puede deber a las concentraciones altas de auxina aún presentes en los callos al inicio del proceso.

Figura No. 12. Representación gráfica de la relación Prolina-Hidroxiprolina de callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones maduros e inmaduros de maíz Tuxteño.



VII.- DISCUSION

El proceso de embriogénesis somática es sumamente complejo y por tal motivo se requiere de estudios detallados desde diferentes puntos de vista para tratar de entender los eventos que se encuentran involucrados en la manifestación de la formación de un embrión somático.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, permiten la manipulación bajo condiciones *in vitro* de los fenómenos que ocurren *in vivo*, tales como: germinación, desarrollo, fecundación, etc., que al estudiarlos en plantas completas implicaría muchas dificultades y posibilidades de error, debido a la gran cantidad de eventos que se llevan a cabo al mismo tiempo en la planta como unidad viviente y al poco control que se puede tener de los cambios ambientales.

En la actualidad, son ya muchas las especies vegetales que se han logrado establecer con éxito bajo condiciones de cultivo *in vitro*, principalmente dicotiledóneas, ya que en monocotiledóneas, es difícil de lograr la dediferenciación (formación de callo) y la rediferenciación de estructuras (regeneración de plántulas) en los cultivos.

Dada la importancia que tiene para el hombre este tipo de plantas y sobre todo el grupo de las gramíneas (trigo, arroz, avena, maíz, etc.) que constituyen parte de su dieta diaria se ha desarrollado mucha investigación al respecto, lográndose en la actualidad su establecimiento bajo estas condiciones.

En especial el maíz, que es la especie en estudio, presenta innumerables dificultades para conseguir un buen cultivo *in vitro*, por tanto el conocimiento de su biología implica vencer las barreras de su naturaleza y por consiguiente la implementación de nuevas metodologías para su estudio.

Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado al estudio de esta especie desde hace ya varios años, logrando avances importantes en cuanto al establecimiento de tejido caloso mediante la utilización de auxinas sintéticas (Sánchez de Jiménez y Albores, 1979), su mantenimiento (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981), obtención de líneas celulares con capacidad de rediferenciación (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1983), así como los diferentes aspectos que rigen a este fenómeno (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1988). Recientemente se están llevando a cabo estudios a nivel bioquímico y molecular para definir cuales pueden ser los factores y eventos involucrados en el proceso de formación de una planta completa (Aguilar *et al.*, 1992).

También se continúa trabajando con las técnicas de cultivo *in vitro* probando nuevos genotipos como VS-22, Chalqueño y H-135, los cuales tienen gran importancia para el país. En este tema de investigación se planteó como objetivo inducir la formación de embriones somáticos (García F. C., 1991; García *et al.*, 1993).

Posteriormente, se continuó con investigaciones al respecto, sólo que ahora se probaron otras condiciones para la inducción de tejido caloso con el fin de optimizar el sistema. Se utilizó el maíz Tuxpeño porque presenta un genotipo de amplia base genética, que se cultiva en zonas tropicales. Cabe mencionar que los experimentos fueron diseñados tomando en cuenta factores y condiciones que para la inducción de callo resultaron favorables en trabajos previos, otro aspecto importante es que se trabajó con la metodología propuesta por Bohorova (1995) con la finalidad de comparar protocolos y obtener finalmente una metodología adecuada para la proliferación de callo embriogénico de maíz Tuxpeño.

Se analizó por tanto, el efecto que tuvieron las auxinas (MCPP y el Dicamba) y el medio de cultivo (R₄ y N6) en la formación de callo. A partir de embrión

completo maduro se determinó que MCPP en el medio N6 presentó las condiciones más favorable para tal propósito, ya que se obtuvo rendimiento de 0.35 g/explante, mejorándose cuando se utilizó Dicamba y AgNO_3 (0.47 g/explante). Bajo estas mismas condiciones, sólo que empleando como explante al embrión inmaduro, la respuesta de formación de callo se incrementó a 0.60 g/explante.

Otro aspecto relevante es que se observó que el AgNO_3 es un factor que favorece al cultivo para ser regenerativo, sobre todo cuando se utiliza en las primeras etapas del cultivo y por separado del choque osmótico con sacarosa, del cual el tejido debe recuperarse para que posteriormente se dé la regeneración (Diagrama de flujo No. 1 y Tablas 6 y 7). Corroborándose con un segundo experimento, en el cual se reprodujo el efecto inductor del AgNO_3 , ya que favorece a la formación de embriones somáticos y la generación de brotes (Diagrama de flujo No. 2 y Tabla 8).

Lo anterior implica que debe haber una secuencia de cambios en la célula para que se manifieste su totipotencialidad y que pueden estar relacionados con la producción de poliaminas, la cual se ve afectada por la presencia de etileno. Así, en cuanto se adiciona AgNO_3 al medio de cultivo se contrarresta el efecto de dicho gas (Sisler y Joung, 1984; Valin *et al.*, 1989; Songstand *et al.*, 1992). Las condiciones osmóticas del medio intracelular son también determinantes para obtener regeneración (Yamada, 1977; Yong-Hwan y Janick, 1991) y en nuestro caso un incremento de sacarosa (6%) resultó favorable.

Se ha reportado que los embriones somáticos necesitan condiciones óptimas para germinar y originar una planta completa (Ammirato, 1989). Por otra parte se tienen antecedentes que indican que estas estructuras, cuando se forman en cultivo en suspensión se encuentran siempre adheridos a masas de callo, por lo

que parece que el tejido caloso es importante para que el embrión somático se desarrolle adecuadamente (Emons y Kieft, 1991). Estos embriones en medio líquido derivan de grupos de células con características meristemáticas, mismas que son determinantes para que se manifieste una respuesta morfogénica (Aleith y Richter, 1991).

Actualmente se ha establecido que los cultivos líquidos resultan ser más favorables para generar embriones somáticos, ya que se ha observado que cuando los cultivos embriogénicos están en medio sólido, casi siempre se obtiene un crecimiento precoz de raíces, debido a la existencia de zonas meristemáticas bien definidas (Vasil, 1982 y Vasil *et al.*, 1984).

En cualquiera de los dos casos (sólido o líquido) la masa de callo proporciona sustancias que estimulan a la región meristemática, de la cual se generan primordios foliares, coleoptilo, formación de escutelo, etc. También es probable que el balance hormonal, la cantidad de aminoácidos, o bien las condiciones osmóticas tengan influencia sobre el crecimiento y germinación de los embriones somáticos. Con esta finalidad se ha utilizado sacarosa y manitol, que modifican las condiciones osmóticas en el medio de cultivo. Cuando se utilizan estos compuestos a bajas concentraciones, no se presenta una germinación adecuada, más bien esto ocurre cuando se trabaja bajo condiciones de estrés osmótico, lo cual ha sido ya reportado en arroz y trigo (Kishor y Reddy, 1986 y Brown *et al.*, 1989).

En particular, para maíz cuando se incrementa el potencial osmótico en el medio de cultivo, se incrementa la frecuencia de formación de callos embriogénicos. Por otro lado existen estudios con L-prolina, en los cuales se ha visto que además de ser una fuente de nitrógeno importante para el cultivo, también actúa como un osmoprotector (Yong-Hwan *et al.*, 1991). En cuanto al ABA,

se conoce que está involucrado en el control de muchos eventos durante el proceso de embriogénesis somática y entre ellos esta propiciar su germinación. El manejo de este fitorregulador es sin embargo delicado, debido a que también puede provocar poliembrionía o bien inhibir el crecimiento, maduración y germinación (Thomann *et al.*, 1992). En esta especie se ha reportado que se requiere de ABA en estados tempranos de maduración de los embriones somáticos y la respuesta se mejora cuando se adiciona una concentración alta de sacarosa (Emons *et al.*, 1993). Por otra parte el GA₃ tiene un efecto positivo en los cultivos en regeneración, ya que induce la germinación de los embriones somáticos y de alguna forma contrarresta el efecto del ABA (cuando es nocivo para el cultivo); se ha reportado que estimula la acumulación de proteínas (Yong-Hwan y Janick, 1991).

La optimización del protocolo para la obtención de embriones somáticos que aquí se utilizó estuvo basado en las consideraciones anteriores y se aplicó tanto a callos provenientes de embriones maduros como de embriones inmaduros. Los resultados obtenidos nos indican que a partir de embriones maduros se puede obtener tejido calloso con capacidad de regeneración muy relativa (Tablas 6, 7 y 8), ya que las plántulas formadas fueron escasas y anormales. Existen otros trabajos que sostienen que este tipo de explante no conviene utilizarse debido a la ineficacia en la respuesta embriogénica, ya que se trata de un tejido muy diferenciado (Green y Phillips, 1975; Armstrong y Green, 1985; Duncan *et al.*, 1985; Kamo *et al.*, 1987; Zhong *et al.*, 1992). Por lo que respecta a embriones inmaduros, en el primer protocolo probado (Diagrama de flujo No. 3) el callo obtenido produjo abundantes embriones somáticos en la superficie y se regeneraron plantas (Tablas No. 9, 10), las cuales fueron más vigorosas cuando se utilizó AgNO₃, durante la inducción de callo. Con el protocolo propuesto por Bohorova y colaboradores (1995), los resultados fueron mejorados, obteniéndose al final del experimento 3 plántulas por embrión (explante) y el 80 % de plantas fértiles (Tabla No. 12) después de sembrarse en campo. Esto probablemente se debió a las

características del medio de regeneración (MSR), el cual estuvo adicionado de AIA y 6-BAP y es posible que la interacción de estos dos fitorreguladores favoreció el desarrollo de los brotes.

Como es de recordar, uno de los objetivos de este trabajo fue explorar la posibilidad de obtener cultivos embriogénicos a partir de embriones maduros, dada la ventaja de disponibilidad de este material en cualquier época del año.

En la mayoría de los trabajos reportados en relación a este punto, se establece que el tipo de explante más adecuado para la obtención de callo embriogénico es el embrión inmaduro, ya que generalmente en gramíneas y en especial maíz, se ha adoptado como regla que el tejido maduro no es un explante adecuado para la obtención de callos embriogénicos y mucho menos en generar brotes, explicando que se debe al alto grado de diferenciación del tejido (Green y Phillips, 1975; Vasil, 1982; Armstrong y Green, 1985; Duncan *et al.*, 1985; Carman, 1990).

También es ampliamente reconocido que el alto nivel de variabilidad en la respuesta que muestran los diferentes genotipos, indica que el proceso tiene bases genéticas, es decir que la formación del callo y la manifestación de morfogénesis está determinada por uno o más alelos dentro del genoma (Choi *et al.*, 1987; Goldberg *et al.*, 1989; Aleith y Richter, 1991; Petolino y Cowen, 1994). Por tal motivo, en los últimos años se considera que las respuestas morfogénicas (brote, raíz o embrión somático) en cultivos bajo condiciones *in vitro* de maíz, dependen del genotipo (Bohorova *et al.*, 1992), lo cual implica que no todas las variedades de maíz son adecuadas para la obtención de embriones somáticos y/o brotes.

Sin embargo, en el laboratorio los primeros protocolos probados (sección VI.2.1. y VI.2.2.) se logró obtener callo embriogénico a partir de embrión maduro (Tablas 6 y 7), pero no pudo lograrse una buena regeneración de brotes, por tanto

se propone que es necesario realizar más experimentos, para determinar si bajo otras condiciones de cultivo este tipo de explantes pudieran ser utilizados para la obtención de callos, no sólo con capacidad embriogénica, sino también con un alto potencial de regeneración y la manifestación del mismo.

Con base en los resultados obtenidos, es posible que el estado fisiológico del explante pueda ser factor más determinante para lograr la manifestación del proceso de embriogénesis somática y regeneración; mientras que el genotipo de la especie pudiera no ser tan definitivo para este proceso, aunque puede influir en la eficiencia con que se logre tal objetivo. Además no hay que descartar que elementos presentes en el medio de cultivo (AgNO_3 , sacarosa y probablemente otras sustancias) pueden propiciar o interferir en la respuesta morfogénica de los cultivos de la especie en estudio.

El análisis histológico realizado confirmó las observaciones anteriores, ya que en los cultivos provenientes de embrión inmaduro, se observaron abundantes embriones somáticos, por lo que es posible que la regeneración de plantas completas sea a partir de dichas estructuras.

En cambio cuando se analizaron los cultivos que se originaron de embrión maduro, desde el inicio se detectaron zonas organizadas y bien diferenciadas (Figs. 7 y 8). Cuando los cultivos permanecieron más tiempo en medio de regeneración se localizaron regiones altamente especializadas (Fig. 9), por lo que las pocas plantas que se regeneraron en estos cultivos probablemente provenían de estas regiones. En este caso no se detectó con claridad la presencia de embriones somáticos, ya que las muestras de callo tienen una forma muy heterogénea y por esta razón no se puede manejar una orientación para la realización de los cortes histológicos, sin embargo, se localizaron regiones de

tejido que pueden ser porciones de embriones somáticos, por tanto no se descarta la posibilidad de su existencia.

Hay cierta controversia acerca del origen de los embriones somáticos en cultivo. Al respecto algunos autores sostienen que este fenómeno se da a partir de una sola célula y otros que es multicelular (Vasil, 1982; Mc Clain y Hodges 1986).

Además con base en algunos estudios para definir las características del embrión somático cuando se encuentra adherido al callo en comparación con las de un embrión cigótico (Emons y Kieft, 1991), por lo que se piensa que el desarrollo pueda ser similar, pero también se indica que el conocimiento que se tiene acerca del origen y desarrollo de los embriones somáticos todavía deja muchas lagunas por aclarar. Con respecto a este punto, por los resultados obtenidos en este trabajo, se puede indicar que el origen de los embriones somáticos es unicelular y esto se pudo corroborar en cortes histológicos de callos embriogénicos en otros genotipos de maíz. En todos los casos se observaron regiones de células embriogénicas, y algunas de ellas ya mostraban las divisiones características que conllevan a la formación de un embrión somático.

En relación a nuestro sistema, es pertinente recordar que las muestras analizadas fueron tomadas en tiempos pre-establecidos, y por tanto se dejaron etapas intermedias sin observación. Por tal motivo no podemos descartar la posibilidad de que algunos de los brotes observados en los callos embriogénicos provenientes de embriones inmaduros, tengan su origen vía organogénesis y no por embriogénesis somática. Esto con base en que los brotes carecieron de raíces y por tanto no se puede indicar la existencia de una polaridad, además, no se localizaron embriones somáticos en estados de desarrollo más avanzados, sino que de los embriones somáticos en estado globular (etapa T = 6), se pasó

directamente a la observación de brotes ($T = 10$), probablemente debido a la alta velocidad de desarrollo. Fue necesario señalar este aspecto porque sería conveniente confirmar la existencia de etapas avanzadas del desarrollo de los embriones somáticos realizando cortes y observaciones histológicas a intervalos de tiempo más cortos.

En cuanto a los estudios bioquímicos, los resultados electroforéticos nos indicaron que el método para la obtención de proteínas de pared fue el correcto, tanto para ejes embrionarios germinados como para callos embriogénicos, ya que en cada uno de los casos se encontró un patrón similar de proteínas, independientemente del tratamiento previo al que fueron sometidas las muestras. Sólo la autorradiografía de dichos geles reveló las proteínas de pared sintetizadas *de novo*, puesto que llevan en su cadena polipeptídica a la prolina y esto ocurrió con más claridad cuando se utilizó Dicamba, lo cual podría indicar que la síntesis de proteínas de pared se ve favorecida por dicho fitorregulador.

Los callos provenientes de embrión maduro presentaron valores altos de incorporación de prolina- ^{14}C (Tabla 18), lo cual pudo deberse a que el medio de cultivo del cual provenían estuvo adicionado de Dicamba y por tanto se favoreció dicha incorporación, a pesar de que no se obtuvieron embriones somáticos a partir de estos callos. Sin embargo en el análisis histológico se detectó gran cantidad de tejido con un alto grado de diferenciación (Figs. 7, 8 y 9).

Por otra parte, en el material que provino de embrión inmaduro, el valor de incorporación más alto se registró en $T = 6$ (cultivos que han permanecido 6 días en medio de regeneración), correlacionándose con el momento en que se manifestó la formación de embriones somáticos y por tanto se puede inferir que en este momento hay una alta actividad de síntesis de proteínas de pared celular.

Lo anterior podría indicar que el nivel de la incorporación de Prolina-¹⁴C puede variar de tejido a tejido, porque depende de muchos factores tales como: absorción, estado metabólico, número de células activas, etc. Por tanto los valores de incorporación sólo son un índice de actividad metabólica del tejido y no se pueden considerar como indicadores de la velocidad neta de la síntesis de pared.

La relación Prolina-Hidroxiprolina en cambio, es de suma importancia porque da información sobre otro aspecto del proceso, ya que indica la capacidad de conversión de Prolina a Hidroxiprolina, independientemente del nivel de la marca incorporada en cada tipo de tejido.

Durante la germinación de ejes embrionarios predomina el nivel de hidroxiprolina (Tabla No. 15), esta conversión se ve estimulada por la presencia de auxinas.

En callos, el recambio de prolina a hidroxiprolina ocurre en mucha mayor proporción en los cultivos provenientes de embrión inmaduro (Tabla No 19) en relación a los originados de embrión maduro, indicando que el estado fisiológico del explante tiene influencia relevante en la manifestación de los eventos bioquímicos que deben ocurrir para que se obtenga una respuesta morfológica en los cultivos *in vitro* de maíz.

Existen estudios en cultivos embriogénicos de maíz que proponen que los altos niveles de glicoproteínas de pared celular, ricas en hidroxiprolina son indicadores de proliferación celular (Ludevid *et al.*, 1990; Ruiz-Avilla *et al.*, 1991), también se han propuesto marcadores de embriogénesis, como el gen EP2 (Sterk *et al.*, 1991); por lo cual en nuestro caso, la diferencia en la relación de

prolina/hidroxiprolina que presentan los cultivos embriogénicos de maíz, parece correlacionar con la capacidad de formación de embriones somáticos, y podría por tanto, ser un buen indicador bioquímico para predecir la respuesta embriogénica en callos de esta especie .

Con base en los resultados del análisis histológico se concluye que el tejido embriogénico fue muy heterogéneo (Figs. 3-9), es decir, los embriones somáticos se encontraron inmersos en tejido no embriogénico y por lo tanto los resultados bioquímicos obtenidos son indicativos del proceso, pero no pueden interpretarse con absoluta seguridad. De aquí que consideramos que sería conveniente tener un sistema de embriones somáticos obtenidos en medio líquido para hacer este estudio (y en general otros estudios bioquímicos), pues ahí los resultados que se obtengan serían representativos directamente del tejido que nos interesa y no se mezclarían con respuestas de tejidos adyacentes, en otro (s) estado (s) metabólico (s).

RECAPITULACIÓN

1.- El medio de cultivo más favorable para inducir callo a partir de un maíz criollo fue el N6, adicionado de Dicamba y AgNO_3 .

2.- La obtención de callo con características embriogénicas se logró al disminuir la cantidad de auxina en el medio de cultivo y proporcionar un choque osmótico al incrementar la concentración de sacarosa.

3.- Para que se manifieste con claridad la respuesta de embriogénesis somática, el tejido calloso debe recuperarse de choque osmótico mediante el paso por una resiembra, en la que el medio de cultivo tenga la concentración habitual de sacarosa.

4.- La regeneración (formación de brotes) se presenta durante los primeros 10 días a partir de que el callo embriogénico permanece en un medio de cultivo libre de fitorreguladores.

5.- Con base en el análisis histológico se puede concluir que:

a) Sólo los cultivos provenientes de embriones inmaduros formaron embriones somáticos verdaderos, esto durante las primeras dos semanas que el cultivo permaneció en un medio libre de fitorreguladores.

b) Los cultivos provenientes de embriones maduros presentaron regiones organizadas desde el inicio de su establecimiento (inducción) y observándose con mayor claridad mientras va pasando el tiempo (a los 27 días en el medio de regeneración). También se localizaron regiones de células meristemáticas con características embriónicas, pero no se logró observar cambios que conlleven a la formación de verdaderos embriones somáticos.

6.- Dentro del grupo de las auxinas, el Dicamba es la que más promueve la incorporación de prolina-¹⁴C en las proteínas de las paredes celulares, tanto en ejes embrionarios como en cultivos celulares de maíz Tuxpeño (callo). También parece influir en la activación del proceso de conversión de prolina a hidroxiprolina, el cual es necesario para la manifestación del proceso de embriogénesis somática.

VIII.-CONCLUSIONES

1.- Es posible obtener cultivos celulares capaces de generar embriones somáticos a partir de un genotipo de maíz criollo (Tuxpeño en este caso), utilizando como explante original embriones inmaduros.

2.- El análisis histológico es un método adecuado para caracterizar los cambios que ocurren en los tejidos de maíz en cultivo durante la respuesta morfogénica bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

3.- La conversión de prolina a hidroxiprolina es un marcador bioquímico que puede indicar la capacidad de un cultivo para manifestar su potencial morfogénico vía embriogénesis somática.

IX.- BIBLIOGRAFIA

Abo, El-Nil M. and L. Al-Sabah, (1994). Organogenesis in *Rhanterium epapposum* cultures and application of silver nitrate to control tissue vitrification. VIII th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze (Italy). p. 12

Adkins, W. S. and P. Magdalita, (1994). The gaseous envelope: effect of ethylene on culture performance. VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze (Italy). p. 213

Aguilar, R., E. Reynoso., M. Albores and E. Sánchez de Jiménez. (1992). Changes in protein synthesis in embryonic axes after long-term storage of maize seeds. *Seed Science Research* 2: 197-198.

Albersheim, P. (1976). The primary cell wall. (9) "Plant Biochemistry". Third edition. Edited by James Bonner, Academic Press. New York, San Francisco, London. pp.225-274.

Aleith, F. and G. Richter (1991). Gene Expression During Induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. *Planta* 183: 17-24

Aloni, R. (1978). Differentiation of vascular tissues. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 179-204.

Altheir, S., S. Stirn and H. Jacobsen (1993). Immunobiochemical analysis of a nuclear protein marker for regeneration potential in higher plants. *J. Plant Physiol* 4: 415-422.

Ammirato, V. P. (1989). Recent progress in somatic embryogenesis. *Newsletter, International Association for Plant Tissue Culture* 57(6): 2-16.

Andi, B. E., N. Daisuke., M. Hiroshi., T. Taniguchi and E. Maeda (1993). Developmental electron microscopy and histochemistry of somatic embryo differentiation in sugarcane. *Plant Science* 89: 85-92.

Anke, J. D., L. Schmidt and S. C. de Vries (1993). Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 22: 367-377

Armstrong, C. L. and E. C. Green (1985). Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164: 207-214.

Baldwin, T. C., M. C. McCann and R. Keith (1993). A novel hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota*. Purification and partial characterization. *Plant Physiol* 103:115-123.

Barloy, D. and M. Beckert (1993). Improvement of regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 33: 45-50.

Barrat, D. H. P. and J. A. Clark (1991). Proteins arising during the late stages of embryogenesis in *Pisum sativum* L. *Planta* 184:14-23

Beckert, M. and M. C. Qing (1948). Results of a diallel trial and breeding experiment for *In vitro* aptitude in maize. *Theor App. Genet.* 68: 247-251.

Bhaskaran, S., A. J. Neuman and R. A. Smith. (1988). Origin of somatic embryos from cultured shoot tips of *Sorghum bicolor* L. moench. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* (24) 9: 947-950

Bhomann, E. B., J. Sollinger., C. White and C. J. Rivin (1992). Accumulation of group 3 late embryogenesis abundant proteins in *Zea mays* embryos. *Plant Physiol* 99: 607-614.

Bohorova, E. N., B. Luna., R. M. Brito., L. D. Huerta, and D. A. Hoisington (1995). Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude and highland maize inbreds. *Maydica* 40:275-281

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254

Brettschneider, B., H. Tantau, G. Melz and K. Dorffling (1994). *In vitro* selection and regeneration of hydroxyproline with increased frost tolerance. VIII th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, (Italy). p. 223

Brown, C., F. J. Brooks., D. Pearson and R. J. Mathias (1989). Control of embryogenesis and organogenesis in immature wheat embryo callus using increased medium osmolarity and abscisic acid. *J. Plant Physiol* 133:727-733

Carman, G. T. (1990). Embryogenic cells in plant tissue cultures., occurrence and behavior *in vitro*. *Cell Dev. Biol.* 26: 746-753.

Cassab, G. I., J. Nieto-Sotelo., J. B. Cooper., G. Holst and J. E. Varner (1985). A developmentally regulated hidroxyproline-rich glycoprotein form the cell of soybean seed coats. *Plant Physiol* 77:532-535.

Cassab, G.I. and J. E. Varner (1988). Cell wall proteins. *Ann Rev. Plant Physiol Mol. Biol.* 39 :321-353.

Chan, J., R. T. Nagao and J. L. Key (1987). Characterization and sequence analysis of a developmentally regulated putative cell wall protein gene solated from soybean. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (17) :8367-8376.

Chan, J., R. T. Nagao and J. L. Key (1989). Developmentally regulated expression of soybean proline-rich cell wall protein genes. *The Plant Cell* 1: 937-943.

Chan, J., R. T. Nagao and J. L. Key (1990). Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of soybean. A comparative analysis. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (5) : 2470 -2475.

Chang, Y. F. (1983). Plant regeneration *in vitro* from leaf tissues derived from cultured immature embryos of *Zea mays* L. *Plant Cell Reports* 2: 183-185.

Choi, J. H. L., L. C. Borkird and Z. R. Sung (1987). Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1906-1910

Chu, C. C., C. C. Wang., S. C. Sun., Hsu C. ., K. C. Yin., C. Y. Chu and F. Y. Bi (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18: 659-668

Claparols, Y. M., A. Santos and T. M. Torné (1993). Influence of some exogenous amino acids on the production of maize embryogenic callus and on endogenous amino acid content. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 34: 1-11

Close, K. R. and L. A. Luderman (1987). The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation on induction of somatic embryogenesis from elite maize inbreds. *Plant Science* 52: 81-89.

Close, K. R. and L. A. Gallagher-Luderman (1989). Structure-activity relationships of auxin-like plant growth regulators and genetic influences on the culture induction response in maize (*Zea mays* L.).

Conger, V. B., J. F. Novak and K. Erdosk (1987). Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. *Plant Cell Report* 6:345-347.

Cosgrove, D. J. (1993). How do plant cell walls extend? *Plant Physiol* 102: 1-6.

Cure, W. W. and L. R. Mott (1978). A comparative anatomical study of organogenesis in cultured tissues of maize wheat and oats. *Physiol Plant* 42: 91-96.

Dolézalová, M., J. Dolezel and M. Nétický (1992). Relationship of embryogenic competence in maize (*Zea mays*) leaves to mitotic activity, cell cycle and nuclear DNA content. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 31: 215-221.

Domoney, C. L., N. Ellis ., L. Turner and R. Casey (1991). A developmentally regulated early- embryogenesis protein in pea (*Pisum sativum* L.) is related to the heat-shock protein (HSP70) gene family. *Planta* 184:350-355

Duncan, R. D., M. E. Williams., B. E. Zehr and J. M. Widholm (1985). The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta* 165: 322-331.

Duncan, R. D. And M. J. Widholm (1987). Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerable maize callus. *Plant Physiol.* 83: 703-708.

Duncan, R. D. and J. M. Widholm (1989). Differential response to potassium permanganate of regenerable tissue cell walls from maize callus cultures. *Plant Sci.* 61(1) :91-103.

Dougall, D. K. and D. C. Verma (1978). Growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures with ammonium ion as a sole nitrogen source. *In Vitro* 14: 180-182

Edelsten, L. (1982). A molecular switching mechanism in differentiation induction of polarity in cambial cells. *Differentiation* 23: 1-9.

Edriss, H. M., H. Salem and A. F Abou Hadid (1994). Ethylene involvement *in vitro* regeneration of asparagus. VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, (Italy). p. 6

Emons, A. M. C. and H. Kieft (1991). Histological comparison of single somatic embryos of maize from suspension culture whit somatic embryos attached to callus cells. *Plant Cell Reports* 16: 485-488.

Emons, A. M. C., A. S. Droppers and C. V. Toorn (1993). The influence of sucrose, mannitol, L-proline, abscisic acid and gibberellic acid in the maturation of somatic embryos of *Zea mays* L. from suspension cultures. *J. Plant Physiol* 124: 597-604.

Engelen, F. A., P. Sterk., H. B. Jan., H. G.Cordewener., W. Kemmen and S. C. de Vries (1991). Heterogeneity and cell typr-specific localization of a cell wall glycoprotein from Carrot suspension cells. *Plant Physiol* 96: 705-712.

Everett, N. P., M. J. Wach and D. J. Ashwort (1985). Biochemical markers of embryogenesis in tissue cultures of the maize inbred B73. *Plant Sci.* 41: 133-140.

Fransz, P. F. and J. H. N. Schel (1991). Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). *Can J. Bot.* 69:26-33.

Fransz, P. F. and J. H. N. Schel (1991). An ultrastructural study on the early development of *Zea mays* somatic embryos. *Can J. Bot.* 69: 858-865.

Fujimura, T. and A. Komamine (1982). Molecular aspects of somatic embryogenesis in a synchronous system, in A. Fujiwara (Ed), *Plant Tissue Culture*, Abe Photo Printing Co. Ltd. Tokio, pp. 91-92

Fujimura, T., M.Sakurai., H. Agaki., T. Negishi and A. Hirose (1985). Regeneration of rice plants from protoplasts. *Plant Tissue Culture Lett.* 2: 74-75

García, F. C., E. Sánchez de Jimenez and G. J. Márquez (1993). Induction and maintenance of embryogenic cultures of *Zea mays* L. (Poaceae). *PHYTON* 54 (1): 1-6

Geri, C., A. Turrini., I. Giorgetti., E. Nicoletti and V. N. Ronchi (1994). Early events showing genome plasticity during the acquisition of embryogenic competence. VII th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, (Italy). p. 194

Goldberg, B. R., T. S. Barker and P. L. Grau (1989). Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* 56: 149-160.

Golds, T. J., J. Babezinsky and H. U. Koop (1993). Regeneration from intact and sectioned immature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.): the scutellum exhibits on basal gradient of embryogenic capacity. *Plant Science* 90: 211-218.

Gordon, J. W., T. M. Spencer., L. M. Mangano., R. T. Adams., J. R. Daines., G. W. Start., V. J. Obrien., A. S. Chambers., R. W. Adams., G. N. Willetts., B. T. Rice., J. C. Mackey., W. R. Kyueger., P. A. Kaush and G. P. Lemaux (1990).

Transformation of maize cell and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618.

Green, E. C., L. R. Phillips and A. R. Kleese (1974). Tissue culture of maize (*Zea mays* L.) initiation, maintenance and organic growth factors. *Crop Sci.* 14: 54-58.

Green, E. C. and L. R. Phillips (1975). Plant regeneration from tissue culture of maize. *Crop Sci.* 15: 417-421.

Green, E. C., L. R. Phillips and S. A. Wang (1977). Cytological analysis of plant regenerated from maize tissue cultures. *Maize Genet Crop News Lett.* 51: 53-54.

Green, E. C. (1982). Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays* L. . In Fujiwara A. (Ed). *Plant tissue culture*. IAPIC Tokyo pp 107-108.

Greshoff, M. P. and M. C. Doy (1973). *Zea mays*: methods for diploid callus culture and the subsequent differentiation of various plant structures. *Aust, J. Biol. Sci.* 26:505-508.

Hatfield, R. and D. Nevis (1988). Plant cell wall proteins partial characterization of maize wall proteins and putative roles in auxin-induced growth. *Plant Cell Physiol* 24(4):713-720

Hernández, P. V. M. (1989). Morfología y citoquímica de la ontogenia de los embriones somáticos de *Medicago sativa* L. var. A-70-34. Tesis profesional ENEP Zaragoza. 149p.

Hilbert, J. L., T. Dubois and J. Vasseur (1992). Detection of embryogenesis-related proteins during somatic embryo formation in *Cichorium*. *Plant Physiol Biochem* 30 (6): 733-741.

Hohl, M. and P. Schoper (1992). Physical extensibility of maize coleoptile cell walls: apparent plastic extensibility is due to elastic hysteresis. *Planta* 187: 498-504.

Hong, J. C., R. T. Nagao and J. L. Key (1987). Characterization and sequence analysis of a developmentally regulated putative cell wall protein gene isolated from soybean. *J. Biol. Chem.* 262: 8367-8376

Hood, E. E., Q. X. Shen and J. E. Varner (1988). A developmentally regulated hydroxyproline-rich glycoprotein in maize pericarp cell walls. *Plant Physiol* 87:138-142

Johnson, W. J. and J. D. Holden (1974). Ultrastructure of callus tissue of *Zea mays*. *Can. J. Bot.* 52: 251-254.

Johansen, A. D. (1974). *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill New York pp. 126-154

José E. M., L. R. Avila and P. Puigdomenech (1992). A maize embryo-specific gene encodes a proline-rich and hydrophobic protein. *Plant Cell* 4: 413-423.

Kamo, K. K., K. L. Chang, M. E. Lynn and T. K. Hodges (1987). Embryogenic callus formation from maize protoplast. *Planta* 72: 245-251.

Kamo, K. K., M. R. Becwar and T. K. Hodges (1985). Regeneration of *Zea mays* L. from embryogenic callus. *Bot. Gaz.* 146: 327-334

Kapoor, R., N. Verma, D. Saluja, S. Lakhani and R. C. Sachar (1993). Purification and characterization of poll A polymerase from germinated wheat embryos: enzyme glycosylation. *Plant Science* 89: 167-176.

Karr, A. L. (1972). Insulation of an enzyme system which will catalyze the glycosylation of extensin. *Plant Physiol* 50: 275-282.

Karr, A. L. (1976). Cell wall biogenesis (13) "Plant Biochemistry". Third edition. Edited by James Bonner, Academic press. New York, San Francisco, London pp. 405-461.

Keegstra, K. and P. Albersheim (1970). The involvement of glycosidases in the cell wall metabolism of suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant Physiol* 45: 675-678.

Keegstra, K. K., W. Talmadge, W. D. Bauer and P. Albersheim (1973). The structure of plant cell walls. A model of the walls of suspension cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiol* 57: 188-196.

Komamine, A. and H. Fukuda (1982). Biochemical mechanism of cytodifferentiation in tissue culture. In *Plant Tissue Culture*. Fujiwara A., de. The Japanese Association for Plant Tissue Culture. pp 91-92

Komamine, A., M. Matsumoto, F. Arihito, R. I. M. Kawahara, J. Smith, K. Nomura and T. Fujimura (1990). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures physiology, biochemistry and molecular biology. Nijkamp H. J. J., Vain, H. W. (eds.). *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer academic publishers Dordrecht, Boston London. pp 307-313.

Kieliszewski, M. and D. T. A. Lampion (1987). Purification and partial characterization of a hydroxyproline-rich glycoprotein in a graminaceous monoct. *Zea mays*.

Kieliszewski, M., A. Kamyab, J. F. Leykam and D. T. A. Lampion (1992). A histidine-rich extension from *Zea mays* is an arabinogalactan protein. *Plant Physiol* 99: 538-547.

Kieliszewski, M., R. Zacks, J. F. Leykam and D. T. A. Lampion (1992). A repetitive propeline-rich protein from the gymnosperm douglas fir is a hydroxypropeline-rich glycoprotein. *Plant Physiol* 98: 919-926.

Kishor, P. B. K. and G.M. Reddy (1986). Retention and revival of regenerating ability by osmotic adjustment in long-term cultures of four varieties of rice. *J. Plant Physiol* 126: 49-54

Klämbt, D. (1990). A view about the function of auxin binding proteins at plasma membranes. *Plant Mol. Biol.* 14: 1045-1050.

Kleis-San F. S. M. and M. L. Tierney (1990). Isolation and characterization of a proline-rich cell wall protein from soybean seedlings. *Plant Physiol* 94: 1897-1902.

Kranz, E. and H. Lörz (1993). *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. *Plant Cell* 5: 739-746.

Krochko, J. E., S. K. Promenik and J. D. Bewley (1992). Contrasting storage protein synthesis and messenger RNA accumulation during development of zygotic and somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* 99: 46-53.

Lampert, D. T. A. (1965). The protein component of primary cell walls. *Adv. Bot. Res.* 2: 151-218

Lampert, D. T. A. and D. H. Miller (1971). Hydroxyproline arabinosides in the plant kingdom. *Plant Physiol* 48: 454-456.

Langridge, P., P. Lazzeri and H. Lörz (1991). A segment of rye chromosome enhances growth and embryogenesis of calli derived from immature embryos of wheat. *Plant Cell Reports* 10: 148-151.

Liu, Ch., Z. Xu and N. H. Chua (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5: 621-630.

Li, X-B., M. Kieliszewski and D. T. A. Lampert (1990). A chenopod extensin lacks repetitive tetrahydroxyproline blocks. *Plant Physiol* 92: 327-333

Lo, S. F., F. Filippini, F. Cozzani, D. Vallone and M. Terzi (1991). Modulation of auxin-binding proteins in cell suspensions. *Plant Physiol* 97: 60-64.

Lowe, K.S., D. B. Taylor, P.L. Ryan and K. P. Peterson (1985). Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B73. *Plant Sci.* 41: 125-132.

Lu, C., K.I. Vasil and P. Ozias-Akins (1982). Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor, Appl. Genet.* 62: 109-112.

Lu, C., V. Vasil and I.K. Vasil (1983). Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). *Theor, Appl. Genet* 66: 285-289.

Lucas, B. and A. Sotelo (1982). Aminoacid determination in pure proteins foods and feeds using too different acid hydrolysis methods. *Annal Biochem.* 123: 349-356.

Ludevid, D. M., L. Ruiz-Avila, P. Vallés, V. Stefel, M. T. Josep, M. Torné and P. Puigdamenech (1990). Expression of genes for cell-wall proteins in dividing and wounded tissues of *Zea mays* L. *Planta* 180: 524-529.

Mascarenhas, A. F., M. Pathak, R.R. Hendre, D. D. Ghugale and V. Jagannathan (1975). Tissue cultures of maize, wheat, rice and sorghum: Part IV studies of organ differentiation in tissue cultures of maize, wheat and rice. *Indran. Journal of Experimental Biology* 13: 116-119.

Mazau, D., R. Dominique and M. T. E. Tugaye (1988). Two different families of hydroxyproline rich glycoproteins in melon callus. biochemical and immunochemical studies. *Plant Physiol* 86: 540-546.

McClain, J. W. and T. K. Hodges (1986). Anatomy of somatic embryos from maize embryo cultures. *Bot Gaz.* 147 (4): 453-460.

Meinke, D. W. (1991). Perspectives on genetic analysis of plant embryogenesis. *Plant Cell* 3: 857-866.

Minuth, W. W. (1987). The state of differentiation in cultured cells. *Differentiation* 36: 1

Mott, R. L. and W. W. Cure (1978). Anatomy of maize tissue cultures. *Physiol Plant* 42:139-145

Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497

Novak J. F., S. Daskalov., H. Brunner., M. Afza., M. Dolézelová., S. Lucretti., A. Herichova and T. Hermelin (1988). Somatic embryogenesis in maize and comparison of genetic variability induced by gamma radiation and tissue culture techniques. *Plant Breeding* 101:66-79

Ockredon, D. J. and R. Mc Cleanaghan (1993). Effects of brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemminifera*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32: 41-46.

Pareddy, D. R. and Y. F. Petolino (1990). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. *Plant Science* 67: 211-219.

Pérez, L., R. Aguiljar and E. Sánchez de Jiménez (1987). Effect of an exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. *Physiol. Plant.* 69: 517-522

Pérez, L., R. Aguilar., A. M. Pérez and E. Sánchez de Jiménez (1990). Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize embryonic tissues. *Plant Physiol* 94: 1270-1275

Permingeat, R. H., J. L. Morre and R. H. Vallejos (1994). Somatic embryogenesis of maize: a highly efficient method for plant regeneration. VIII th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, (Italy). p. 25

Petolino, Y. F. and N. M. Cowen (1994). Genes conditioning *in vitro* androgenesis in maize VIII th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, (Italy). p. 81.

Radojevic, L. (1995). Tissue culture of maize (*Zea mays*) "Cudu". I. Somatic embryogenesis in the callus tissue. J. Plant Pysiol 119: 435-441.

Rahavan, V. (1978). Experimental embryogenesis in vascular plants. Academic Press, Londres, Nueva York, San Francisco. pp 10-51

Rao, K. V., P. Suprasanna and G. M. Reddy (1990). Biomedical changes in embryogenic and non-embryogenic calli of *Zea mays* L. Plant Science 66: 127-130.

Reinert, J. (1959). Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembruonem an gewebeulturen aus karotten. Planta 53: 318-333

Rhodes, C. A., C. E. Green and R. L. Phillips (1982). Regenerable maize tissue cultures derived from immature tassels. MGCNL 56: 14-15

Rhodes, C. A., K. S. Lowe and K. L. Ruby (1988). Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. Biol/Technology 6: 56-60

Roustan, J. P., A. Latche and J. Fallot (1989). Stimulation of *Dacus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and niquel. Plant Cell. Report 8:182-185.

Roustan, J. P., A. Latche and J. Fallot (1990). Control of carrot somatic embryogenesis by AgNO₃ an inhibitor of ethylene action: Effect an arginine decarboxilasa activity. Plant Science 67: 89-95.

Ruiz-Avila, L. M., D. Ludevid and P. Puigdomenech (1991). Differential expression of hidroxyproline-rich cell-wall protein gene in embryonic tissues of *Zea mays* L. Pianta 184: 130-136.

Sánchez de Jiménez E. and M. Albores (1979). Auxinas sintéticas en al inducción de los callos de maíz (*Zea mays* L.). Agrociencia 37: 151-160.

Sánchez de Jiménez E., M. Albores and V. V. M. Loyola (1981). Effect of 2,4-D analogues on the induction and maintenance of callus in maize tissue culture. *Ann. Appl. Biol.* 98:347-353.

Sánchez de Jiménez E., L. Yañez and M. Vargas (1983). Establecimiento de una línea celular de maíz (*Zea mays* L.) en cultivos *In vitro*. Capacidad de rediferenciación. *Agrociencia* 52: 101-113.

Sánchez de Jiménez E., M. Vargas and R. Aguilar (1988). Age-dependent responsiveness to cell differentiation stimulus in maize callus culture. *Plant Physiol Biochem* 26(6): 723-732.

Santos, M. A., J. M. Torné and Blanco (1984). Methods of obtaining maize totipotent tissues: I. Seedling segments culture. *Plant Sci. Lett.* 33: 309-315

Schek, U. R. and C. A. Hildebrandt (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneous and dicotyledoneous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.

Schmidt, A. D. and A. Marcus (1991). Peptidyl proline hydroxylation and growth of a soybean cell culture. *Plant Physiol* 96: 656-659.

Sheridan, W. F. (1975). Tissue culture of maize. I. callus induction and growth. *Plant Physiol.* 33:151-165.

Sheridan, W. F. (1988). Maize developmental genetics: genes of morphogenesis. *Annu. Genet.* 22: 353-385.

Showalter, A. M., J. N. Bell., C. L. Cramer., J. A. Bailey., J. E. Varner and Ch. J. Lamb (1985). Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungi elicitor and infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6551-6555.

Shillito, R. D. (1989). Regeneration of plant from protoplasts of elite inbred maize. *Bio/Technology*. 7(6): 581-587.

Sisler, E. C. and F. S. Joung (1984). Anti-ethylene effects of cis-2-butene-cyclic olefins. *Phytochemistry*. 23(12): 2765-2768.

Smith, I. (1968). Zone electrophoresis p. 166 in Smith I. (Ed) *Chromatographic and electrophoretic techniques*. vol. 2 New York. John Wiley and Sons.

Smith, L. D. and D. A. Krikorian (1989). Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. *Amer. J. Bot.* 76 (12): 1832-1834.

Songstad, D. D., R. D. Duncan and M. J. Widholm (1988). Effect of aminocyclopropane -1- carboxylic acid, silver nitrate and nitorbudienein plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Rep.* 7: 262-265.

Songstad, D. D., W. L. Petersen and C. L. Armstrong (1992). Establishment of friable embryogenic (type II) callus from immature tassels of *Zea mays* (poaceae). *American Journal of Botany* 79(7): 761-764.

Springer, O. W. and E. C. Green (1979). A histological examination of tissue culture initiation from immature embryos of maize. *Protoplasma* 101: 269-281.

Sterk, P., G. A. Booij H., Schellekens, A., Van Kammen and S. C. Vries (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3: 970-921

Steward, F. C., M. O. Mapes and K. Mears (1958). Growth and organized development of cultured cells. *Amer. J. Bot.* 45: 705-708

Street, E. H. (1973). *Plant tissue and Cell culture*. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, Edinburgh, Melbourne pp. 308-335.

Straub, P. F., D. M. Decker and S. L. Gallagher (1992). Characterization of tissue culture initiation and plant regeneration in *Sporobolus virginicus* (graminae). *American Journal of Botany* 79(10): 1119-1125.

Suk-Heong, O., H. Y. Steiner., D. K. Dougall and D. M. Roberts (1992). Modulation of calmodium levels, calmodulin methylation, and calmodium binding proteins during carrot cell growth and embryogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 297(1): 28-34.

Sewdlund, B. and D. R. Lucy (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in two-years old cultures of *Zea diploperennis*. *Plant. Cell. Rep.* 7: 144-147.

Talmadge, K., W. Kenneth., K. Wolfgang., D. Bauer and P. Albersheim (1973). The structure of plant cell walls. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol* 57: 158-173.

Timpa, J. D. and B. A. Triplett (1993). Analysis of cell-wall polymers during cotton fiber development. *Planta* 189: 101-108.

Tisserat, B., E. B. Esan and T. Murashige (1974). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1. 1-78

Tomes, D. T. and O. S. Smith (1985). The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize. (*Zea mays* L.) germplasm. *Theor Applied Genet.* 70: 505-509.

Tomes, D. T. (1985). Opportunities and limitation of the genotypic influences on establishment and plant regeneration from callus and cell cultures of crop species. In: *Biotechnology in Plant Sciences*. Academic press. New York. 3-14 pp.

Torné, J. M., M. A. Santos and J. L. Blanco (1984). Methods of obtaining maize totipotent tissues. II.-Atrophic tissue culture. *Plant Science Letters*. 33: 317-325.

Torné, J. M. and M. A. Santos (1987). Aspectos de la totipotencia en el cultivo de callos de *Zea mays* L.: Mantenimiento y variabilidad de las estructuras totipotentes. *Inv. Agrar. Prod. Prot. Veg.* 2(2): 111-120.

Torné, J.M., X. F. Claparols and M. Santos (1993). Effect of DL-alfa -difluoro methylornithine pretreatments in maize callus differentiation. *Plant Cell Physiol* 34(2): 371-374.

Vain, P. Y. and P. Flament (1989). Enhancement of production and regeneration of embryogenic Type II callus in *Zea mays* L. by AgNO₃. *Plant Cell Tissue and Organ culture*. 18: 143-151.

Vain, P., P. Flament and P. Soudain (1989). Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea mays* L. *J. Plant Physiol* 135: 537-540.

Vain, P. M., D. McMullen and J. J. Finer (1993). Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports* 12: 84-88.

Varner, J. E. and L. S. Lin (1989). Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231-239.

Vasil, Y. K. (1982). Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grass Plant tissue culture proc. 5Th Intl. Cong. Plant. tissue & cell culture IAPTC Tokyo pp. 101-104.

Vasil, Y. K. (1987). Developing cell and tissue culture system of the improvement of cereal and grass crops. *J. Plant Physiol* 128: 193-218.

Vasil, V., C. Y. Lu and I. K. Vasil (1983). Proliferation and plant regeneration from the nodal region of *Zea mays* L. (maize gramineae) embryos. *Amer J. Bot.* 70 (6): 951-954.

Vasil, V., I. K. Vasil and C.Y. Lu (1984). Somatic embryogenesis in long term callus cultures of *Zea mays* L. (graminae), *Amer. J. Bot.* 71: 158-161.

Vasil, V., Chin-Yi Lu and I. K. Vasil (1985). Histology of somatic embryogenesis in culture immature embryos of maize (*Zea mays* L.) *Protoplasma* 127: 1-8.

Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Am. Rev. Plant Molec. Biol.* 42: 579-620

Wang, S. A. (1987). Callus induction and plant regeneration from maize mature embryos. *Plant Cell Rep.* 6: 360-362.

Wareing, F. P. and C. F. Graham (1976). *The developmental biology of plants and animals*. Ed Sanders. Philadelphia Toronto pp. 73-91.

Wernicke, W., I. Potrykus and E. Thomas (1982). Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor*- the morphogenetic pathways. *Protoplasma* III, 53-62

Wilkson, T. C., and S. A. Thompson (1987). Genotype, medium, and genotype X medium effects on the establishment of regenerable maize callus. *Maydica* 32: 89-105

Williams, E. G. and G. Maheswaran (1986). Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57: 443-462.

Yamada, Y. (1977). *Tissue culture on cereals in applied and fundamental aspects of plant cell and organ culture*. Springer-Verlag. New York. pp. 144-145.

Yong-Hwan, K. and J. Janick (1991). Abscisic acid and proline improve desiccation tolerance and increase fatty acid content of celery somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 24: 83-89.

Zhong, H., C. Srinivasan and M. B. Sticklen (1992). *In vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L.). *Planta* 187: 490-497.