

67
221



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INDUCCION Y MANTENIMIENTO DE CULTIVOS
EMBRIOGENICOS in vitro DE DIFERENTES
VARIETADES DE MAIZ (Zea mays L.)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

CRISTINA GARCIA FLORES



México, D. F.

1991

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

1.-Resumen	1
2.-Introducción	3
3.-Hipótesis	5
4.-Objetivo general	5
5.-Fundamentación del tema	6
5.1. Biología de <u>Zea mays</u> L.	6
5.1.1. Ubicación taxonómica	6
5.1.2. Anatomía y morfología	6
5.1.3. Fisiología	11
5.2. Generalidades del Cultivo de Tejidos Vegetales	15
5.3. Cultivo <u>in vitro</u> de <u>Zea mays</u> L.	17
5.4. Generalidades de la Embriogénesis Somática	24
5.4.1. Aspectos Generales	24
5.4.2. Embriogénesis Somática en Zanahoria	27
5.4.3. Factores Importantes en la Embriogénesis Somática	28
5.4.4. Características Morfológicas y Citoquímicas de la Embriogénesis Somática	29
5.5. Embriogénesis en Cereales, Especialmente en <u>Zea mays</u> L.	31
6.-Diseño Experimental	48
7.-Metodologías	51
7.1. Obtención del Material Biológico	51
7.2. Tratamiento de Desinfestación	51
7.3. Preparación y Caracterización de los Medios de Cultivo	52
7.4. Siembra de Embriones Maduros	58

7.5. Resiembras y Parámetros a Evaluar	58
7.6. Técnica Histológica	65
7.6.1. Fijación	65
7.6.2. Deshidratación e Impregnación de Parafina	65
7.6.3. Inclusión de Tejidos	66
7.6.4. Obtención de Cortes	66
7.6.5. Eliminación de Parafina y Tinción de Cortes	67
8.- Resultados	70
8.1. Obtención de Callo	70
8.2. Evaluación del Crecimiento en los Cultivos	73
8.3. Presencia de Regiones Embriogénicas	76
8.4. Evaluación de Proembriones Somáticos	79
8.5. Inducción de Vascularización	81
8.6. Efecto del Acido Giberélico (GA ₃)	83
8.7. Análisis Histológico	85
8.7.1. Caracterización del Callo Primario	85
8.7.2. Caracterización del Callo con Resiembras	87
8.7.3. Caracterización de los Cultivos en el Medio Adicionado	88
8.7.4. Características de los Callos que Fueron Tratados con ABA	91
8.7.5. Características de los Callos que Fueron tratados con GA ₃	92
8.8. Análisis Histológico de los Callos Obtenidos al Final del Experimento	92
9.- Discusión	101
10.- Conclusiones	112
11.- Apéndice	121

12.-Bibliografía	144
------------------------	-----

INDICE DE FIGURAS

1.-Morfología de la planta de <u>Zea mays</u> L.	9
2.-Morfología de la inflorescencia de <u>Zea mays</u> L.	10
3.-Semilla madura de <u>Zea mays</u> L.	13
4.-Embrión maduro de <u>Zea mays</u> L.	14
5.-Desarrollo de un embrión cigótico (monocotiledonea)	129
6.-Desarrollo de un embrión somático (dicotiledonea)	130

INDICE DE CUADROS

1.-Familias de plantas en las que se ha observado el proceso de embriogénesis somática	26
2.-Tratamientos de desinfección que se probaron en embriones maduros de las tres variedades que se utilizaron en este trabajo	61
3.-Medio basal Murashige - Skoog, (1962)	62
4.-Medio basal de Reinert y Yeoman, (1982)	63
5.-Medio basal Chu, (1975)	64
6.-Modificación hecha por Engleman, para la preparación de colorantes	69

CUADROS DEL APENDICE

7.-Valores de apreciación para la inducción de callo , desarrollo de raíz y de plántula en cada variedad	132
8.-Rendimiento de cada una de las variedades en ambos medios de cultivo (R ₂ y N6 ₂)	133
9.-Incremento en el crecimiento de los cultivos de las tres variedades de maíz, durante las resiembras tanto en medio R ₂ como en medio N6 ₂	134
10.-Evaluación del material biológico que se encuentra en la etapa IV, presencia de regiones embriogénicas	138
11.-Evaluación de proembriones	139
12.-Evaluación de los callos con vascularización	140
13.-Evaluación del cambio en consistencia del callo	141

GRAFICAS

1.-Crecimiento de los cultivos de la variedad Chalqueño	135
2.-Crecimiento de los cultivos de la variedad VS-22	136
3.-Crecimiento de los cultivos de la variedad H-135	137

Principales Abreviaturas Utilizadas

CTV - Cultivo de tejidos vegetales

MS - Medio de cultivo de Murashige and Skoog

Nb - Medio de cultivo de Chu

EMB - Medio de cultivo de Reinert y Yacoma

2,4-D Ácido 2,4-dicloro-fenoxi-acético

MCPH Ácido 2-(2-metil,4-clorofenoxi) propiónico

ABA Ácido abscísico

GAs Ácido giberélico

ACC Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico

RESUMEN

El proceso de morfogénesis bajo condiciones in vitro, ha sido un aspecto al que se han enfocado muchas de las investigaciones que se realizan actualmente en el campo del cultivo de tejidos vegetales.

El maíz es una especie vegetal sumamente importante a nivel mundial por lo cual ha sido estudiada bajo condiciones in vitro, desde 1947, logrando hasta la fecha adelantos importantes en el conocimiento de su biología. De esta forma en el presente trabajo se emplearon tres variedades de maíz (Chalqueño, VS-22 y H-135), de las cuales se pretendió inducir a través de las técnicas in vitro la formación de embriones somáticos. Para lograr dicho objetivo, en primer lugar se propició la formación de callo, empleando el medio de cultivo "R" (modificación del MS) y N6 ambos adicionados de 4 mg/l de MCPP. Al final del periodo de inducción se evaluó la respuesta de formación de callo para cada variedad en cada medio de cultivo.

La mejor respuesta se observó en el medio R, tanto para la variedad Chalqueño como para la H-135. El medio N6 fue adecuado también para la variedad Chalqueño y para la VS-22. Posteriormente el callo obtenido se colocó en un medio de crecimiento con el fin de incrementar la cantidad de material biológico (los cultivos se resebraron durante dos ocasiones). Después de la segunda resiembra los cultivos se colocaron en un medio especial para lograr que el callo fuera embriogénico, este medio (tanto R como N6), se encuentran adicionados de 10 mg/l de $AgNO_3$ y 6 % de sacarosa. Una vez que el callo fue tratado para ser embriogénico, se observó un cambio en las características que

originalmente presentaba, es decir, la coloración cambió de blanquecina a amarillenta llegando a ser casi café, y su consistencia pasó a ser sumamente compacta y mucilaginoso.

Todos los callos que presentaron estas características se colocaron en un medio adicionado de ABA y posteriormente de GA₃ con la finalidad de propiciar la maduración y germinación de los embriones somáticos. Con el fin de corroborar la presencia de estas estructuras en los cultivos, se realizó un análisis histológico a través del cual se determinó que los callos que no fueron tratados con ABA ni con GA₃, presentaron estructuras embriogénicas en diferentes estadios de desarrollo.

INTRODUCCION

El maíz es una especie vegetal con un alto grado de domesticación sin; embargo, a pesar de ser uno de los cultivos mejor conocidos, su potencial genético no ha sido totalmente explotado y por lo tanto el aprovechamiento de este recurso es menor de lo que podría esperarse.

En México, como en el resto de Latinoamérica, esta especie es la base de la alimentación de su población, actualmente no es posible satisfacer esta demanda interna con los niveles de producción por lo que la región se ve obligada a importar grandes volúmenes del cereal, lo que trae como consecuencia la salida de divisas.

Específicamente en nuestro país, además de que no se satisface la necesidad de este recurso, existe un problema aún más grave y es que la superficie sembrada con maíz es cada vez menor y esto se debe a la modificación del uso del suelo, como consecuencia de la rápida urbanización y el deterioro de los ecosistemas.

La biotecnología vegetal puede ser una alternativa para la búsqueda de soluciones a una parte de la problemática que presenta la producción de maíz.

El cultivo de tejidos vegetales es, dentro de esta perspectiva una de las más importantes, ya que a través de sus técnicas, permite abordar el análisis de la capacidad morfogénica de las variedades empleadas en la producción de semilla en nuestro país.

En particular, el maíz es un especie sumamente difícil de establecer bajo condiciones de cultivo in vitro, además de esto son realmente pocos los genotipos de esta especie que hasta la fecha

han respondido a la estimulación para que se dé el proceso de morfogénesis. A esta problemática se debe el poco avance que se tiene en el conocimiento de dicho proceso y es que existen procesos morfogénéticos normales durante el desarrollo de las plantas que no han sido debidamente estudiados. Así que no se conocen con precisión los procesos histológicos, fisiológicos y bioquímicos que se involucran en la formación de las estructuras que originarán finalmente una planta.

Básicamente en este trabajo se pretende abordar el estudio de la embriogénesis somática en tres variedades de maíz, las cuales tienen gran importancia económica en los estados de Puebla, Tlaxcala e Hidalgo.

En este caso, para el estudio de tal proceso morfogénético se empleará un compuesto que es el $AgNO_3$. Según trabajos anteriores este compuesto, incrementa la capacidad morfogénética de los callos de maíz (Songstad et al, 1988) al actuar como antagonista del efecto inhibitorio que tiene el etileno sobre el cultivo.

Cabe mencionar que es la primera vez que las variedades empleadas en este trabajo se someten a tal tipo de tratamiento por lo cual es conveniente la realización de un estudio histológico de los cultivos finales, con el objeto de evaluar más claramente cual fue el avance del proceso de embriogénesis somática en cada una de las variedades empleadas.

3.-HIPOTESIS

Dado los antecedentes que se tienen en cuanto al empleo de altas concentraciones de sacarosa y de la adición de $AgNO_3$ para la obtención de cultivos de callos embriogénicos, se espera que de igual forma al trabajar bajo estas condiciones con las variedades VS-22, H-135 y Chalqueño, también se obtengan cultivos embriogénicos.

4.-Objetivo general

Determinar las condiciones de cultivo que permitan inducir y mantener cultivos embriogénicos de maíz en medio sólido.

Objetivos particulares

I.- Definir a través del empleo de diferentes medios de cultivo, cual de ellos es el mejor para la inducción de callo en cada una de las variedades de maíz propuestas.

II.- Definir la importancia del empleo de una elevada concentración de sacarosa para la obtención de un cultivo embriogénico.

III.- Determinar la importancia de la adición de $AgNO_3$ para la obtención de un cultivo de callos con características embriogénicas.

IV.- Realizar un análisis histológico del material biológico obtenido de los diferentes tratamientos con el fin de determinar cual es el más adecuado para que se dé el proceso de embriogénesis

S.- FUNDAMENTACION DEL TEMA

5.1. Biología de Zea mays L.

5.1.1. Ubicación taxonómica

Reino	Vegetal
División	Anthophyta
Clase	Monocotyledonae
Superorden	Commeliniflorae
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Subfamilia	Panicoidae
Género	<u>Zea</u>
Especie	<u>mays</u>

De acuerdo con Dahlgren et al., (1985).

5.1.2. Anatomía y morfología

El maíz tiene un ciclo vegetativo que puede variar entre los 80 y 200 días comprendiendo desde la siembra hasta la cosecha. Esta planta puede llegar a tener una altura que va desde 40 a 60 cm en variedades enanas y de 2 a 3 m en variedades gigantes.

En general no se producen macollos (ramificaciones), cuando éstos llegan a presentarse se originan del nudo basal. La raíz surge de la radícula del embrión y dado que ésta es temporal, se da la formación de raíces secundarias a partir del nudo basal. También existen otro tipo de raíces que van a sostener a la planta las

cuales se desarrollan a partir de los nudos más próximos al suelo; la formación de estos tres tipos de raíces es muy importante para la planta ya que además de tener la función de sostén, son elementales para la absorción de nutrientes.

El tallo es cilíndrico y está dividido por aproximadamente 16 nudos, dentro del parénquima del tallo el floema carece de células de transferencia, sin embargo, se pueden distinguir dos tipos de tubos cribosos, uno con paredes relativamente delgadas y abundantes conexiones citoplasmáticas con las células acompañantes; el otro tipo tiene paredes más delgadas, carece de células acompañantes y presenta conexiones con las células del parénquima vascular. Al igual que muchas monocotiledóneas el maíz no presenta un cilindro vascular definido, pero si se observan haces vasculares que corren paralelamente en los entrenudos y que integrándose forman una red en la región donde se encuentran los nudos.

Las hojas parten de cada nudo de dos en dos, están opuestas y su vaina forma un cilindro alrededor del tallo. La diferenciación de la hoja se da a partir del tejido meristemático apical antes de que se inicie la diferenciación de la inflorescencia masculina. El tallo principal de la planta termina en una espiga que contiene espiguillas estaminadas de dos flores y cada flor con dos estambres y así conforme las flores se van abriendo, las anteras son empujadas hacia afuera por el alargamiento de sus filamentos provocando ésto el desprendimiento de los granos de polen. La mazorca se origina como ramificaciones en los nudos, cada una de ellas está integrada por un raquis del que surgirán las espigas y la mazorca misma, (Figura 1 y 2).

MORFOLOGIA DE UNA PLANTA DE MAÍZ

- (1) Planta
- (2) Tallo
- (3) Hoja
- (4) Sistema radicular
- (5) Raíz seminal o principal
- (6) Raíces adventicias
- (7) Raíces de sosten
- (8) Raíces aéreas
- (9) Inflorescencia masculina
- (10) Espiguillas, una sésil y la otra pedicelada
- (11) Flor masculina
- (12) Par de glumas
- (13) Tres estambres fértiles
- (14) Pistilo rudimentario
- (15) Inflorescencia pistilada
- (16) Rama lateral modificada
- (17) Hojas cubriendo a la inflorescencia
- (18) Estigma
- (19) Mazorca
- (20) Granos de maíz

S E P (1990)

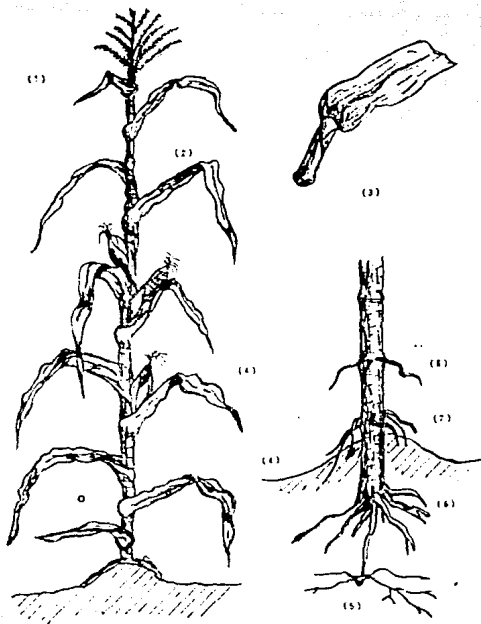


Figura 1. Morfología de la planta de Zea mays L.

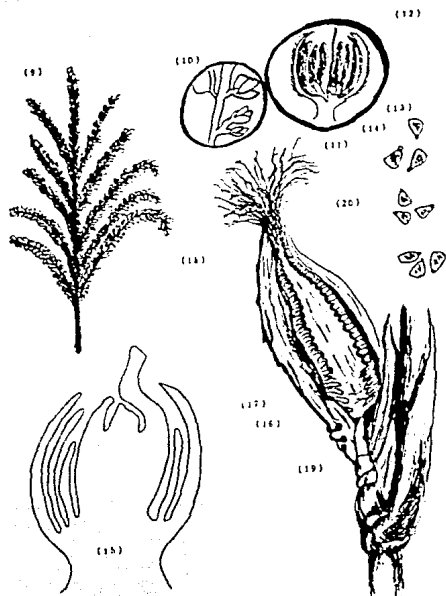


Figura 2. Morfología de las inflorescencias de *Zea mays* L.

El fruto del maíz es una cariopsis por lo que el pericarpo cubre a la semilla sin testa y esto es debido a que en esta planta se han perdido completamente los integumentos formandose así la cubierta del grano. Hacia el interior de éste se encuentra la nucela y la capa de aleurona, siguiendo el endospermo y finalmente el embrión; este último se compone de un eje embrionario y el escutelo el cual sirve como zona de translocación de nutrientes desde el endospermo hasta el eje embrionario, (Figura 3)

El eje embrionario está formado por la plúmula, la radícula, el coleóptilo que protege a los primordios foliares, el mesocotilo el cual constituye la zona de inicio de las raíces adventicias y al punto de unión entre el escutelo y el eje embrionario, la radícula con una cofia en su extremo, la cual se encuentra protegida por la coleorriza en cuyo extremo inferior se localizan los restos del suspensor, (Figura 4)

5.1.3. Fisiología

La fisiología del maíz está determinada, en gran medida por el factor genético. La forma de crecimiento y de desarrollo de la planta depende de las condiciones ambientales, pero solo hasta cierto punto. Crece rápido y con rendimientos elevados en temperaturas que están entre los 20 y 30 °C, es susceptible a bajas temperaturas y el rango de temperatura óptimo depende básicamente del estadio de desarrollo, y es por esto que durante la germinación requiere de una temperatura que se encuentre entre los 10 y 40 °C, cuando se presenta el crecimiento vegetativo es conveniente una temperatura de 15 a 40 °C y cuando se da la

floración la temperatura adecuada oscila entre los 20 y 30 °C. Así entonces bajo condiciones apropiadas de temperatura, humedad y aereación, el maíz germina dentro de los seis días posteriores a la siembra. No requiere de luz para germinar y en general no presenta problemas de latencia o dormancia.

El cambio de la fase vegetativa a la fase productiva se da de manera temprana cuando el periodo de cultivo coincide con días cortos, durante los días largos florece más tardíamente, por lo tanto se trata de una especie regulada por fotoperiodo. La floración es afectada por la temperatura, esto es que temperaturas superiores a 30°C provoca la aparición temprana de la inflorescencia masculina y temperaturas menores de 20°C ocasiona la maduración temprana de la inflorescencia femenina. La disposición floral favorece para que se dé una polinización cruzada; bajo condiciones normales, la autofecundación es alrededor de un 5 %; la diseminación del polen se lleva a cabo por viento, gravedad y con ayuda de las abejas.

Con respecto a su nutrición, la deficiencia de Nitrógeno provoca el amarillamiento de las hojas, en general la carencia de nutrientes se refleja en el aspecto de las hojas.

El maíz presenta un genoma formado por 10 cromosomas, los cuales son diferentes morfológicamente por su longitud, los nudos característicos y la localización del centrómero. (Kato;1981 y Razo;1989). Debido a que es una especie monoica se ha estimado que el 95 % de los óvulos son fecundados por polen de otras plantas y es por esto que se considera una planta heterociga.

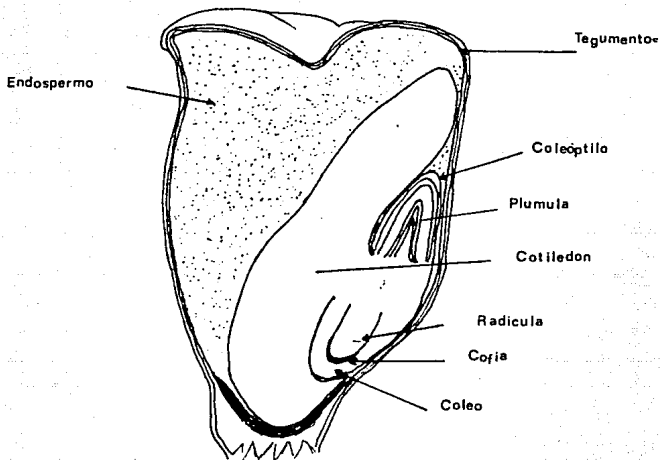


Figura 3. Semilla madura de Zea mays L.

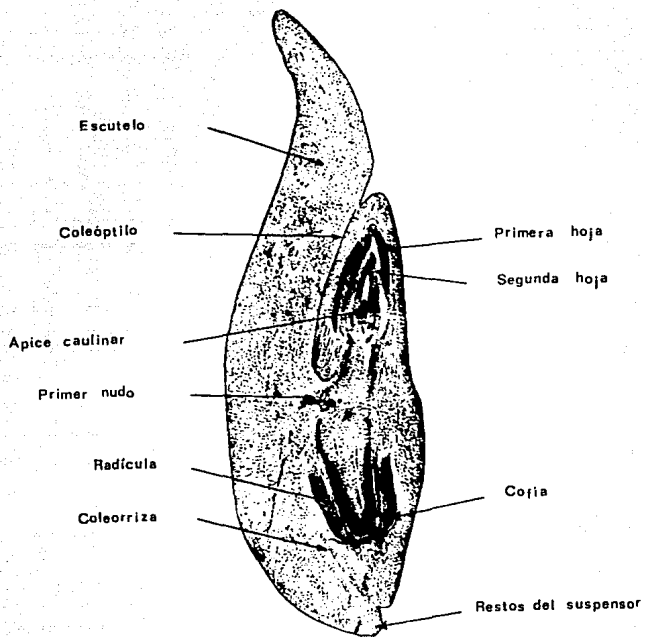


Figura 4. Embrión maduro de *Zea mays* L.

5.2. Generalidades del Cultivo de Tejidos Vegetales

El nombre genérico de cultivo de tejidos vegetales (CTV) se emplea para designar aquellos cultivos asépticos (libres de contaminantes) de células, tejidos, órganos o cualquier otra estructura vegetal por periodos prolongados de tiempo en sistemas in vitro. Sus metodologías se basan en la teoría celular y en una derivación de ésta que es el principio de totipotencialidad celular, es decir, en que cada célula somática es capaz de generar un organismo completo, dado que posee toda la información genética para ello. De esta manera, bajo ciertas condiciones será posible mantener células vegetales en cultivo, libres y no especializadas y a partir de éstas, rediferenciar nuevamente las plantas completas.

Existen varios tipos de CTV y de acuerdo a la clasificación propuesta por Thorpe (1981), estos son:

1.- Cultivo de callos: Cuando en un explante se induce la dediferenciación celular para obtener masas de células indiferenciadas.

2.- Cultivo de células en suspensión: Se refiere a la disgregación de los callos y a su cultivo en medio líquido con agitación constante.

3.- Cultivo de órganos: Es el cultivo de anteras, ovarios, raíces o cualquier otro órgano de la planta.

4.- Cultivo de meristemas: Cuando se cultivan las regiones meristemáticas de cualquier parte de la planta.

5.- Cultivo de protoplastos: Es el aislamiento y cultivo de protoplastos vegetales y puede ser a partir de células cultivadas o directamente de tejidos de la planta.

6.- Cultivo de embriones: Los embriones que se han formado in situ se aíslan para hacer que concluyan su desarrollo bajo condiciones in vitro.

La importancia del CTV ha ido en aumento, especialmente en estos últimos años (Gautheret, 1982) ya que este campo no solo es considerado como una herramienta en investigaciones botánicas altamente especializadas sino también como una alternativa con gran potencial de aplicación práctica en la agricultura e industria.

Inicialmente el CTV se utilizó para realizar estudios sobre metabolismo y diferenciación celular (White, 1963), ya que estas técnicas permiten la simplificación de los sistemas de estudio representados por las plantas maduras, lo cual se traduce en evitar muchos aspectos de organización de las plantas completas.

Hoy en día los métodos in vitro son aplicados para la obtención de plantas libres de virus (Vasil, 1988), estudios de interacción hospedero-patógeno, en la conservación de germoplasma (Tomes, 1985) y en la obtención de metabolitos secundarios para la alimentación industria y farmacia (Fujita, 1987),

además se han implementado técnicas para el mejoramiento genético. Es así como el cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en una poderosa herramienta para el estudio de la biología vegetal, lo cual explica el interés a nivel mundial por el desarrollo y especialización de dichas técnicas.

5.3. Cultivo in vitro de Zea mays L.

Conforme al interés que motivó a los pioneros del cultivo in vitro, los primeros trabajos realizados en Zea mays buscaron establecer las condiciones que permitieran el cultivo de tejidos y con ello se abriera la posibilidad de hacer investigación básica sobre la biología de esta especie, bajo condiciones in vitro.

La Rue (1947), es considerado el primer investigador que logró el establecimiento de cultivos de endospermo de raíz; obtiene callos a partir de endospermo de semillas inmaduras de 8 a 18 días después de la polinización, además observó al parecer el desarrollo de un embrión a partir de estos callos, mismo que no pudo sobrevivir; a través del análisis microscópico de sus cultivos reportó la presencia de numerosas masas o centros meristemáticos.

Más tarde varios autores repitieron este trabajo, siguiendo la misma metodología y encontraron que la respuesta bajo condiciones in vitro es diferente para cada variedad.

La técnica empleada por La Rue (1947), se reportó a los dos años, en ésta indica que usó además del endospermo de semillas inmaduras, el medio de White y el de Riker para establecer sus cultivos; ambos medios adicionados de un factor de crecimiento y

suplementos orgánicos tales como: jugo de tomate, extracto de levadura, uva, ciruela, Radfcula acuática, granos verdes de maíz o leche de vaca. Estos cultivos se mantuvieron más de un año a través de subcultivos hasta que el trabajo fue reportado.

Sin embargo antes que él ya en 1922, Kotte había logrado obtener cultivos de raíces de maíz, solo que por muy poco tiempo; esto lo logró empleando un medio que contenía extracto de Liebig y en 1923 Robbins y Haneval reportaron el mantenimiento de cultivos de raíces de maíz por veinte semanas, en un medio que contenía extracto de levadura, en lugar del extracto de Liebig (Gautheret, 1982), pero a pesar de esto sus cultivos no sobrevivían por mucho tiempo, esto se logró hasta 1940 por McClary, quien empleó un medio que contenía una alta concentración de cloruro de sodio (Gautheret, 1985).

Los cultivos de endospermo logrados por La Rue se emplearon durante varios años como estándar en algunos estudios. Posteriormente se encontraron variedades de maíz con endospermos cuyo contenido de almidón y de grasas era muy elevado motivo por el cual no pudieron ser cultivadas in vitro bajo las condiciones que ya se habían establecido hasta ese momento. Por otra parte también se realizaron investigaciones hechas por Tamaoki y Ullstrup (1958) quienes tomaron en cuenta la composición de diversos medios de cultivo, pero sus resultados fueron poco relevantes ya que solo lograron una aparente y limitada proliferación celular de los cultivos de endospermo iniciados a partir de semillas inmaduras (de 7 a 12 días de polinización) en la variedad L-317, empleando una modificación al medio de Nitsch adicionado con 5 g/l de extracto de levadura.

Lo que se pretendía básicamente era lograr establecer un medio definido, y de ésta forma evitar interpretaciones erróneas de las respuestas estudiadas en los cultivos bajo condiciones in vitro, pues el empleo de suplementos de composición compleja como el jugo de tomate o extracto de levadura dificultaban la elaboración de un análisis real de los resultados. Así entonces el primer medio totalmente sintético empleado para el cultivo de endospermo de maíz fue usado por Straus en 1960, quien logró hacer crecer callos a partir de endospermo de maíz de la línea Negro mexicano, estos cultivos obtenidos fueron empleados posteriormente para la realización de diversos estudios. El medio sintético desarrollado por Straus está compuesto por sales minerales, 2 % de sacarosa, vitaminas y 1.5×10^{-2} M de asparagina. Este medio de cultivo es el más empleado para obtener callos de endospermo de maíz.

Posteriormente Farrar y Ganugapati (1970) estudiaron el desarrollo de callos a partir de endospermo de maíz sobre un medio de cultivo sólido en el cual, la asparagina fue sustituida por diferentes sales de amonio. Lo que ellos obtuvieron fue que las sales de amonio, de succinato y citrato produjeron un buen crecimiento de callos pero las de oxaloacetato fueron tóxicas. Shannon y Liu (1977) lograron el cultivo de endospermo de maíz de tipo ceroso y demostraron que el cultivo puede crecer en un medio el cual contenga solamente sales inorgánicas, sacarosa y tiamina, además de esto encontraron que la tasa de crecimiento puede ser incrementada cuando se adiciona asparagina al 2 %. También observaron, que las auxinas y las citocininas reducen el crecimiento inicial del cultivo a partir de endospermo de maíz y

al parecer estos fitorreguladores no tienen un efecto importante sobre el peso final del cultivo. En este trabajo la tiamina fue la única vitamina requerida para el crecimiento del cultivo; el pH del medio tuvo influencia directa sobre la velocidad del crecimiento del cultivo y en este caso se encontró que el pH óptimo fue de 5.5, por último se definió que la morfología final del cultivo varía de acuerdo al medio de cultivo que se emplee.

Shannon y Batey (1973) logran establecer cultivos de endospermo de las líneas A-636 y R-168, además llegaron a obtener cultivos en suspensión de la línea A-636, los cuales han sido empleados para estudio de división celular y constitución microsomal. Sin embargo debido a que el endospermo es genéticamente triploide, no es un material adecuado para estudios bioquímicos y genéticos. Por ello existen también una serie de reportes de cultivos de maíz usando explantes de diferentes partes de la planta .

Tomakoi y Vilstrup (1958) fueron los primeros en intentar obtener callo de maíz a partir de meristemas intercalares pero no tuvieron éxito ya que solo se inducía la proliferación en explantes que contenían tejido nodal cuando se empleaba el medio de Gautheret, pero estos cultivos no llegaban a ser subcultivados.

Otros resultados que se consideran valiosos fueron los reportados por Mascarenhas en 1969 (Hendre et al, 1969) quien logró el cultivo de callos de diversos cereales y entre ellos se encontraba el maíz; los callos se obtuvieron a partir de secciones de plántulas y éstos tenían la característica de que al ser transferidos del medio sólido en el que se encontraban al líquido, proliferaban como raíces.

Gresshoff y Doy (1973) reportan el establecimiento de líneas de callo diploide de maíz a partir de embrión seccionado y macerado en un medio de cultivo sintético el cual contenía ácido naftalenacético y cinetina. Reportan además de la obtención de callo, la capacidad de diferenciación de raíces y brotes, además de la estabilidad tanto en el crecimiento como el nivel ploidía de sus cultivos durante un año.

Johnson y Holden (1974) describen la ultraestructura de callos provenientes de tejido nodal del coleóptilo, dicho explante es cultivado en medio Murashige Skoog (MS) adicionado con 2,4-D y leche de coco. En este trabajo se observó que las células del callo eran semejantes a las células meristemáticas, lo que sugiere que sí obtuvieron la dediferenciación del tejido.

En 1974 Green, Phillips y Kleese, intentaron la inducción de callos a partir de embriones maduros y de discos de tejido nodal, empleando el medio Linsbainer-Skoog (RM), adicionado de 2,4-D en un rango de 2 a 15 mg/l y 20 g/l de sacarosa; definiendo de esto que una concentración de 15 mg/l de 2,4-D es la más adecuada para la obtención de callo, probaron diferentes líneas y cruza entre ellas y lo que obtuvieron fue que había una gran variabilidad de respuesta, ya que hubo diferencia en la capacidad para formar callos como también en el peso de los mismos. Además observaron que los mejores resultados se obtenían con el primer nudo de coleóptilo. En cuanto a la sacarosa, cuando se emplearon concentraciones de 30 g/l y 10 g/l de agar el callo presentó una gran cantidad de raíces, este problema disminuyó al adicionar solo 20 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar.

Green y Phillips (1975), reportan por vez primera la

obtención de callos con capacidad morfogenética a partir de tejido escutelar de embriones inmaduros obtenidos de semillas híbridas. los embriones se disectaron después de los 12 días de la polinización y fueron cultivados en medio MS el cual contenía 1 mg/l de 2,4-D, mismo que más tarde se eliminó con el fin de inducir la formación de brotes adventicios.

Este trabajo, tuvo una importancia destacada ya que de él surge el protocolo que sirvió por mucho tiempo como método rutinario para la obtención de callos de maíz y su rediferenciación.

Posteriormente Sheridan (1975), probó el efecto del ácido giberélico y la cinetina los cuales fueron adicionados al medio basal de Linsmaier y Skoog para la inducción de callos a partir de embriones inmaduros; cabe mencionar que además de este explante, también empleó otras partes de la planta, pero no obtuvo resultados importantes en ninguno de los casos.

En estos experimentos Sheridan elimina el hidrolizado de caseína del medio basal ya que observó que esto no afecta a la tasa de crecimiento celular por lo cual según este autor, deja de ser un elemento esencial para el cultivo. Sin embargo, esto no es tan cierto ya que en trabajos posteriores se llega a determinar que el hidrolizado de caseína incrementa la tasa de crecimiento del callo (Sheridan, 1975).

Estos trabajos fueron analizados por Cure y Mott (1978), basándose en un estudio anatómico de los cultivos y de todo el proceso morfogenético y es así como pone en duda los resultados obtenidos de los trabajos anteriores ya que de acuerdo a su análisis, los callos de maíz anteriormente reportados solo son producto de un crecimiento aberrante, muy similar a raíces. Además,

discute que los brotes observados por Green son producto de la formación de yemas adventicias en las raíces y no un proceso de morfogénesis de novo. Sin embargo el análisis de los cultivos de la línea A-188 demostró que por lo menos para este caso sí era de novo la formación de yemas adventicias (Tomes ,1985).

Sheridan establece también un cultivo en suspensión de maíz el cual creció como agregados celulares de diversos tamaños y también como células sueltas pero sus cultivos carecieron de capacidad morfogénica.

En conclusión el callo que obtuvo este autor es firme, opaco, friable y presenta una coloración que se encuentra entre crema y amarillo; además el mejor medio para el sistema líquido fue el medio basal de Linsmaier y Skoog adicionado de 2 % de sacarosa y 4 mg/l de 2,4-D.

Oswald, Nicholson y Bauman (1977), lograron establecer un sistema de células en suspensión de diferentes líneas, para esto emplearon tejido somático de maíz. Las condiciones óptimas para la incubación de este sistema fueron 24 °C a 125 rpm y con un pH de 6.2 . Los autores observan diferencias en cuanto a la viabilidad de las células, además de que el EDTA mostró ser una fuente de toxicidad. La periodicidad que presentan los patrones de crecimiento sugieren que existe un proceso de sincronización de las células. Es en este trabajo donde se definió que el maíz es la primera especie de plantas en la cual se emplea la vitamina E para incrementar la viabilidad celular.

En maíz, se ha visto que es esencial la presencia de auxinas tanto para la inducción como para el mantenimiento de los cultivos. Además, también se ha observado que ésta inhibe la

diferenciación y mantiene el crecimiento de las células desorganizadas.

Los trabajos antes mencionados facilitaron el avance del cultivo de tejidos de maíz durante los años posteriores. Hasta ese momento se contaba ya con una metodología que permitía el establecimiento de cultivos celulares, los cuales era posible mantener por periodos prolongados de tiempo. De cierta forma ya se tenía claro que la variación que presentan los cultivos, dependen del genotipo y de las condiciones de cultivo por lo cual no se podía llegar a una generalización. Hasta la fecha no se tiene un protocolo general para el cultivo de maíz; siendo éste un serio problema porque si aún no se tiene una metodología bien definida para el sistema sólido, en el sistema líquido también se han tenido dificultades para establecer un cultivo de células en maíz.

5.4. Generalidades de la Embriogénesis Somática

5.4.1. Aspectos generales

Generalmente los embriones se originan a partir de la fertilización de una ovocélula por el núcleo espermático, los embriones también pueden surgir a partir de células del esporofito o bien del gametofito, sin que se involucre una unión sexual. En este caso los embriones se conocen como embriones adventicios, pseudoembriones, embrioides o bien embriones somáticos. El proceso por el cual se forman es conocido como embriogénesis adventicia o embriogénesis somática.

Raghavan (1976), define un embrión somático como una

estructura bipolar producida asexualmente, el cual carece de una conexión vascular con el tejido madre, sin embargo, desde el punto de vista funcional y estructural es parecido a un embrión cigótico y de la misma forma llegaría a dar origen a una nueva planta. Este proceso puede ocurrir de manera natural o bien bajo condiciones in vitro, habiéndose encontrado una incidencia más alta de la formación de estos embriones en tejidos de nucela, tegumento y sinérgidas.

La embriogénesis somática fue primeramente observada en cultivo de células en suspensión de zanahoria (Daucus carota L.), por Steward et al, (1958) y en cultivo de callos de la misma especie en medio sólido por Reinert, (1959).

Este proceso de embriogénesis somática ha sido hasta la fecha reportado en más de 30 familias de plantas, (Raghavan, 1976), (Cuadro 1). Los inóculos que se ha empleado para la obtención de embriones somáticos a través de cultivos de tejidos han sido:

- a) Células vegetativas de la planta madura como son: hojas, tallos y peciolo.
- b) Tejido reproductivo, (nucela, tegumento y sinérgidas) incluyendo al cigoto.
- c) Hipocotilo y cotiledones de embriones, así como también segmentos de plántulas.

Existen generalmente dos vías para que se dé la formación de embriones somáticos (Sharp et al, 1980), y estas son:

- a) Vía directa: sin formación de tejido calloso previo a la embriogénesis.
- b) Vía indirecta: con formación de tejido calloso previo a la embriogénesis.

FAMILIA	ESPECIE	EXPLANTE
Aquifoliaceae	<u>Ilex aquifolium</u> L.	cotiledón, embrión
Araliaceae	<u>Hedera helix</u> L.	tallo maduro
Asclepiaceae	<u>Tylophora indica</u> L.	tallo
Betulaceae	<u>Corylus avellana</u> L.	embrión
Caricaceae	<u>Carica papaya</u> L.	pecíolos, óvulos
Cucurbitaceae	<u>Cucurbita pepo</u> L.	cotiledón
Hemamelidaceae	<u>Liquidambar styraciflua</u> L.	hipocotilo
Leguminosae	<u>Medicago sativa</u> L.	protoplastos
Papaveraceae	<u>Eschscholzia californica</u>	placenta
Rubiaceae	<u>Coffea arabica</u> L.	hoja
Rutaceae	<u>Citrus sinensis osbeck</u>	óvulos

Cuadro 1 : Embriogénesis somática observadas en algunas familias vegetales (Evans et al, 1983).

Es así como a través de estas dos vías la célula madura de una planta adulta puede retroceder al estado embriogénico, ya sea de células simples de vida libre en cultivos líquidos en suspensión o formando parte del tejido calloso.

La embriogénesis asexual es una cualidad de las células vegetales por lo que es también posible pensar que este proceso se encuentra regulado por mecanismos represivos. Se ha planteado que los factores represivos sean sustancias volátiles y no volátiles en donde posiblemente se incluya el ácido 3-indolacético (AIA), auxinas sintéticas, etileno, giberelinas y en algunos casos el etanol (Carman, 1990).

5.4.2. Embriogénesis somática en zanahoria

Desde que se logró obtener cultivos embriogénicos en zanahoria esta especie ha sido empleada hasta nuestros días como modelo para el establecimiento de un cultivo embriogénico de casi cualquier especie, este cultivo se obtuvo de la siguiente forma:

El inoculo original se obtiene de 1 cm de peciolo o 0.5 cm² de raíz, el cual se siembra en medio sólido MS, adicionado de 4.5 M de 2,4-D para inducir la formación de callo, a la cuarta semana cuando ya se obtiene el callo se pasa al rededor de 3 g de callo a medio líquido, con agitación constante (160 rpm). La embriogénesis se induce cuando se transfieren estos cultivos a un medio sin auxinas y el desarrollo de los embriones se da cuando se hace una transferencia a medio sólido sin reguladores de crecimiento. Finalmente para el enraizamiento se emplea el medio MS, solo que las sales minerales se adicionan diluidas a la mitad,

5.4.3. Factores importantes en la embriogénesis somática

Los factores que inducen la formación de embriones somáticos en plantas son varios, pero los más importantes son los siguientes:

a) El genotipo vegetal, ya que cada genotipo tiene una respuesta diferente al ser cultivado bajo condiciones in vitro.

b) El grado de diferenciación del tejido empleado para este fin.

c) Los componentes del medio de cultivo. En este caso es importante mencionar que las auxinas y la proporción de Nitrógeno han sido catalogados como factores esenciales para inducir la formación de embriones somáticos.

d) Luz y temperatura; en este caso no se puede generalizar la forma en que influyen estos dos factores ya que se ha observado una respuesta diferente para cada especie.

e) En el caso de embriogénesis somática indirecta la edad del callo es importante, esto es porque se ha observado que el potencial embriogénico se pierde con el tiempo, pero además se da un cambio en los niveles de ploidía que puede deberse a la presencia de auxinas y como es de suponerse esto tiene una consecuencia importante al final del cultivo.

5.4.4. Características morfológicas y citoquímicas de la embriogénesis somática.

Se considera que son dos eventos críticos los que están involucrados en la programación de este proceso:

- 1) La inducción de la citodiferenciación de las células preembriogénicas.
- 2) El desenlace de la secuencia del desarrollo de estas células.

Estos dos eventos en la mayoría de los casos se dan en un medio que contiene 2,4-D en el cual, el callo prolifera y forma agregados de células embriogénicas las cuales tienen un citoplasma abundante cuando es transferido a un medio sin hormonas, esos agregados comienzan a mostrar un desarrollo asincrónico de embriones y cada uno de estos embriones pasará por las etapas secuenciales de desarrollo propias de un embrión somático, (Figura 5).

Las células embriogénicas se caracterizan por un citoplasma muy denso, granos de almidón muy abundantes y un núcleo que se puede decir que es relativamente grande y difuso, en el nucleolo se tinte intensamente. A través de colorantes se sabe también que estas células tienen altas concentraciones de proteínas y de RNA.

Se ha observado en agregados embriogénicos de zanahoria una mayor cantidad de granos de almidón en las células que están en la superficie. Además el núcleo de estas células se encuentra rodeado de vacuolas pequeñas, y si se compara con las células internas, estas presentan vacuolas centrales. En este tipo de cultivo también se ha registrado elevada actividad enzimática.

Las células superficiales presentan cierta uniformidad y esto es debido a la presencia de plasmodesmos. Las mitocondrias son ovales y los dictiosomas compactos. También se han observado cuerpos multivesiculares dentro del citoplasma y con frecuencia en la periferia de las células guardando una asociación muy estrecha con los plasmodesmos. Las divisiones mitóticas se presentan con mayor frecuencia en las capas celulares de la superficie y con menos frecuencia, o no se dan, en las células internas altamente vacuoladas.

Quando los cultivos de callo de zanahoria se transfieren sin 2,4-D hay una aceleración inicial del crecimiento y un cambio en la periferia de los agregados de liso a ondulado. Estas ondulaciones surgen a partir de una activa proliferación de las células superficiales, las cuales se rigen por un patrón característico de segmentación. La formación del embrión somático es un proceso que continúa después de esta proliferación. También ocurren ciertos cambios ultraestructurales, particularmente en las células superficiales. Hay un incremento en el número de hileras de retículo endoplásmico y de ribosomas hacia los ángulos del plano de división celular. Los dictiosomas se hacen más numerosos y menos compactos. Mientras que las mitocondrias continúan presentes. Los cuerpos multivesiculares se presentan en la periferia de las células, en su citoplasma y en las vacuolas. Se ha observado que no existen cuerpos lipídicos en embriones somáticos jóvenes, por lo cual es posible que estas moléculas no estén directamente implicadas en el proceso de embriogénesis somática (Street, 1974).

En esta especie se han observado grupos celulares característicos de no más de cuatro células, lo cual sugiere que el

origen del embrión somático es unicelular; sin embargo aún no está bien determinado si el origen es uni o pluricelular.

Los embriones somáticos presentan diferenciación interna de tejidos. El embrión globular desarrolla una epidermis claramente definida cuyas células contienen amiloplastos. En la etapa globular madura el embrión somático es muy parecido a un embrión cigótico tanto en su morfología como en su anatomía.

Como se puede ver el proceso de embriogénesis somática es altamente complejo y muy difícil de caracterizar, se puede decir que ha sido casi definido en su totalidad en zanahoria, sin embargo en otras especies además de que han sido muy pocos los avances, no se ha podido definir bien un protocolo que nos permita obtener resultados similares a los de zanahoria, siendo este el caso de maíz.

5.5. Embriogénesis en cereales, especialmente Zea mays L..

La mayoría de las especies de plantas que pertenecen a las gramíneas pueden ser propagadas in vitro, sin embargo pocos son los genotipos de estas plantas que responden favorablemente para que se dé el proceso de morfogénesis.

Norstong, K. (1970), fue el primero en inducir la formación de embriones somáticos a través del cultivo de embriones inmaduros de cebada; sin embargo estos embrioides no fueron capaces de desarrollarse hasta plantas completas. Así en cuanto a la obtención de embriones somáticos, se ha logrado obtener callos embriogénicos a partir de embriones inmaduros, inflorescencias y

hojas primarias en un gran número de especies de granos Vasil, K. (1982).

En embriones inmaduros de los granos; los callos embriogénicos se forman a través de divisiones de las células subepidérmicas del escutelo, muy cerca del nudo escutelar.

En cultivos de inflorescencias; el callo se origina sólo en ciertas regiones y las divisiones celulares se restringen a las capas superficiales.

En hojas jóvenes, la zona donde prolifera el tejido (formación de callo) es en la cara que se encuentra en contacto con el medio de cultivo.

Generalmente en gramíneas el tejido maduro o casi completamente diferenciado no es capaz de presentar la formación de brotes y mucho menos de cultivos embriogénicos (Vasil, 1982). Esta respuesta se piensa que es debido a:

a) Al darse una especialización de las células para formar parte de un tejido maduro, se produce un cambio epigenético irreversible.

b) Al tratarse de un cambio irreversible (maduración) no se puede dar la expresión del potencial morfogénico.

Ocupándonos exclusivamente del maíz; desde los primeros experimentos de Green y Phillips (1975), un gran número de autores han reportado la generación de plantas a partir de cultivo de tejidos de diferentes líneas de maíz, vía embriogénesis somática.

Green y Phillips, (1975), obtienen callos con capacidad

morfogenética a partir de escutelo de embriones inmaduros del híbrido A-188, los cuales se extrajeron después de los 14 días de la polinización.

Los callos se iniciaron y mantuvieron en un medio de cultivo que contenía los compuestos inorgánicos del medio MS, vitaminas y aminoácidos del medio de Straus, 20 g/l de sacarosa, 8 g/l de agar y 2 mg/l de 2,4-D por 30 días y finalmente pasaron a un medio sin 2,4-D. De los embriones obtenidos se formaron algunas plantas, las cuales al pasar a suelo, solo un 15 % crecieron normalmente.

Lu y colaboradores (1982), reporta por primera vez embriogénesis somática a partir de cultivos de callos obtenidos de embriones inmaduros de la variedad Silver Queen en medio MS, adicinado con 0.5 mg/l de 2,4-D y 12 % de sacarosa.

Green (1982), observo el desarrollo de embriones somáticos en cultivos de callos de la línea A-188, aclarando que los callos empleados con este fin eran friables. Además emplea 6 % de sacarosa en el medio de cultivo con el fin de incrementar la osmolaridad en el medio de cultivo e inducir más la formación de embriones somáticos.

Vasil en 1983, habla de aspectos importantes para el mejoramiento de la embriogénesis somática y la regeneración de plantas de maíz bajo condiciones in vitro. En este trabajo ya se habla de la importancia del empleo de concentraciones altas de sacarosa al inicio del cultivo para la inducción de callos embriogénicos y también la necesidad de disminuir esta concentración con el fin de permitir la maduración de los embrioides formados, además, discute porqué el genotipo es un

factor determinante para obtener la respuesta embriogénica.

Ya en 1984, Vasil reporta la obtención de callos embriogénicos a partir de embriones inmaduros, solo que en este caso hace referencia a la presencia de un callo friable y otro muy compacto el cual caracteriza como callo embriogénico.

En 1985, se publican toda una serie de trabajos con maíz que hablan del proceso de embriogénesis somática desde varios puntos de vista, entre los más importantes se encuentran:

Radojévic, (1985) obtiene callos embriogénicos a partir de embriones inmaduros de maíz, los cuales siembra en medio MS adicionado de altas concentraciones de 2,4-D (5-10 mg/l) y kinetina. Además realiza un análisis histológico de sus cultivos y observa que existen varias capas de células meristemáticas en la superficie. En este trabajo se llega a obtener plantas maduras con semillas a partir de los embrioides formados.

Lowe, (1985) obtiene callos también a partir de embriones inmaduros, los cuales siembra en medio MS con 0.5 mg/l de 2,4-D y 12 % de sacarosa, reporta que con este tratamiento logró tener un callo sumamente compacto (callo tipo 1), para sembrar estos callos la sacarosa se reduce a 2 %. Así se logra obtener embrioides y posteriormente plantas completas a partir de callos que tienen una edad de 2 años. En dicho trabajo se plantea cual es el aspecto de un callo embriogénico determinando que puede ser de dos formas

- a) Callo friable y de crecimiento rápido
- b) Callo compacto y de apariencia musilaginosa

En ambos casos se obtuvieron embrioides que dieron lugar a plantas completas mismas que llegaron a la madurez.

Tomes, (1985) se encarga del estudio de la influencia del genotipo en la inducción de callos embriogénicos en germoplasma de maíz elite, en este trabajo es donde realmente se habla de la existencia de dos tipos de callos embriogénicos, los cuales se definen de la siguiente forma:

Callo tipo I: Firme, compacto, pequeño y de crecimiento muy lento, a veces de apariencia musilaginoso.

Callo tipo II: Sumamente friable, de crecimiento rápido y en cuya superficie se definen claramente los embriones somáticos.

Además este autor realiza una comparación en la respuesta embriogénica y el parentesco que existe entre los genotipos, concluyendo que dicho parentesco es muy importante en la capacidad de formar callos embriogénicos.

Kamo, (1985) trabaja con el híbrido A-188, siembra embriones inmaduros en medio N₆ en oscuridad constante, obteniendo un callo embriogénico tipo II (friable). La maduración de los embriones somáticos obtenidos se dió al transferir estos cultivos al mismo medio adicionado de 6 % de sacarosa y sin la presencia de 2,4-D. Se obtuvieron plantas completas, las cuales llegaron hasta la madurez presentando un fenotipo normal.

Armstrong y Green, (1985) obtienen un callo embriogénico

friable al adicionar en el medio Nc una concentración de 6 mM de L-prolina, observando que la adición de este compuesto incrementa la frecuencia de embriones somáticos. Las plantas regeneradas crecen hasta la madurez y solo cuatro fueron anormales morfológicamente y contenían un polen estéril; de todas las plantas obtenidas el 77 % fueron capaces de producir semillas. Además se llega a definir que:

- a) La adición de L-prolina incrementa la producción de callos embriogénicos tipo II
- a) La L-prolina es una fuente de Nitrógeno importante para los cultivos embriogénicos de maíz
- c) La glutamina no es tan efectiva como la L-prolina para la formación de embriones somáticos o callos tipo II

Everett (1985), se ocupa de la caracterización de marcadores bioquímicos en callos embriogénicos de maíz, definiendo que uno de los marcadores es la glutamato deshidrogenasa.

Vasil (1985), reporta la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos friables y de cultivo en suspensión, pero no tiene mucho éxito.

Duncan (1985), trabaja con una gran cantidad de genotipos de maíz (202), formula toda una serie de medios empleando como base la composición de los medios MS, Nc, B5 y RT; a través de los cuales logra obtener plantas completas y aumentar por cruza (formación de híbridos) la producción.

Un aspecto importante que se concluye de este trabajo es que

existen limitaciones genéticas para la regeneración de plantas por lo cual el germoplasma puede ser afectado severamente por dichas limitantes.

Al año siguiente (1987), el mismo autor publica un trabajo en el que trata de explicar como es que puede darse la acumulación de L-prolina en el medio de cultivo, determinando que ésta es importante porque hace tolerantes a los cultivos de maíz a bajas temperaturas. Además trata de explicar como es que puede afectar esa tolerancia al proceso de regeneración. En este trabajo se utilizan los híbridos B-37wx, H-99 y Mo-17 en las que la acumulación de L-prolina en el cultivo se induce con una combinación de manitol (0.53 M) y ABA (0.1 mM). Además de Duncan, surgen otros autores que tratan de buscar otras alternativas para la regeneración de maíz, es entonces como en este mismo año se publica lo siguiente:

Conger y Novak, (1987) obtienen a partir de segmentos de hoja colocados en medio SH, callos embriogénicos o bien embriones somáticos. Al hacer un estudio histológico de sus cultivos, observan que los embrioides surgen directamente del explante, posteriormente provocan la germinación de estos, incrementando la concentración de sacarosa al 6 %.

Novak, (1987) obtiene embriones somáticos de líneas híbridas y esta respuesta la compara con la variabilidad genética de las mismas, la cual es inducida por radiaciones gama. Observando que la variación es mayor en las semillas irradiadas.

Kamo (1987), reporta por primera vez la formación de callos.

embriogénicos a partir de protoplastos de maíz. En este caso emplea el híbrido obtenido de A-188 X Black Mexican Sweet, la inducción de callos se hace en embriones inmaduros y el cultivo en suspensión lo inicia a partir de callos tipo II, el medio que utiliza es MS adicionado de 4 mg/l de 2,4-D. Los protoplastos se subcultivan en un medio cuyo nivel osmótico sea relativamente bajo (adicionado de 0.3 M de manitol), con el fin de propiciar la división celular.

Close (1987), hace un estudio del efecto que tiene la asimilación de auxinas por las plantas, ya que se ha visto que actúa como regulador de crecimiento y como regulador osmótico, provocando de esta forma que se presenten embriones somáticos en los cultivos. Trabaja con maíz elite empleando embriones inmaduros los cuales siembra en medio MS, adicionado por separado de:

- a) 2,4-D en un rango de 5-20 μ M
- b) ácido benzoico
- c) ácido abscísico

Lo que obtiene es que los mejores callos se presentan en los tratamientos con 2,4-D. Los altos niveles de sacarosa (9-12 %) y una concentración baja de auxina incrementan la frecuencia de embriones somáticos y por último llega a la conclusión de que existe un efecto similar cuando se adiciona ABA al medio de cultivo, para tal caso la mejor concentración de dicho compuesto fue de 0.5 μ M.

Como se puede ver en este año ya se logran avances importantes para la regeneración en dicha especie; lo cual permite tener una visión más clara acerca de la problemática que

implica el proceso de embriogénesis somática en maíz.

Durante los siguientes años han ido surgiendo publicaciones de trabajos en donde se reporta la regeneración de plantas tanto por organogénesis como por embriogénesis somática, así entonces tenemos que ya se reporta la obtención de plantas completas a partir de protoplastos (Rhodes, 1988; Prioli and Shillito, 1989), los cuales fueron aislados de callos embriogénicos.

En nuestro país se iniciaron también esfuerzos por obtener cultivos celulares de maíz, con capacidad de rediferenciación empleando para ello variedades comerciales importantes para el país en 1979 Sánchez de Jiménez y colaboradores reportan el efecto del 2,4-D y del ácido - (2-metil), 4-cloro lenoxipropiónico (mecoprop o MCPP) en la inducción de callo a partir de diferentes tipos de explantes (embrión maduro, tallo y raíz) de diferentes variedades, cultivados en medio MS; lo que se llegó a determinar fue que el mecoprop puede suplir con grandes ventajas al 2,4-D tanto en la inducción como en el mantenimiento de los callos a partir de embriones maduros (Sánchez et al, 1981), así mismo observaron que el empleo de cinetina en una concentración mayor de 0.5 mg/l inhibe la formación del callo; establecieron también que el empleo del embrión de semillas maduras presenta un buen porcentaje de inducción de callo comparable al de los otros explantes empleados, además, de la ventaja de poder disponer del explante durante todo el año agrícola. Encuentran así mismo diferencias en la respuesta entre los diferentes genotipos. En los últimos años este grupo ha logrado progresos importantes

en el establecimiento de las condiciones de cultivo para la rediferenciación de callos pues en 1988 reporta la presencia de numerosas estructuras parecidas a embrioides, a partir de cultivos de callos de la variedad Tuxpeno -1, mantenidos en medio MS modificado, eliminando la presencia de reguladores de crecimiento exógenos e incrementando la concentración de sacarosa al 5%. Cabe mencionar que ya en un reporte previo (Sánchez et al, 1983) se cuenta con algunas evidencias que indican un cierto potencial morfogénico de los cultivos y esto es porque se observó la presencia de meristemoides.

Desde los primeros reportes sobre morfogénesis se ha dicho que el tipo de explante más empleado para la inducción de callo embriogénico es el embrión inmaduro, ya que se ha visto que en este se obtiene la mejor respuesta, sin embargo también se han reportado éxitos a través del empleo de embriones maduros (Wang, 1987; Sánchez et al, 1983 y 1988) o bien a partir de hojas (Conger, 1987), en los casos en los que se reporta la regeneración a partir de protoplastos, estos han sido aislados de cultivos de callos que fueron inducidos a partir de embriones inmaduros. Se han discutido algunas razones acerca de la incapacidad que han mostrado tejidos con alto nivel de diferenciación para producir callos embriogénicos, encontrándose que en el caso del mesófilo de hojas, las células se encuentran detenidas en la fase G₁ y que han sido incapaces de responder bajo condiciones in vitro para pasar a la fase S e iniciar la división celular (Wang et al, 1989); también se ha propuesto que esta incapacidad puede estar

relacionada con la pérdida de DNA como consecuencia de una diferenciación previa (Halperin, 1986).

También es ampliamente reconocido el alto nivel de variabilidad en la respuesta que muestran los diferentes genotipos y de hecho se ha generalizado cada vez más la idea de que dicha variación tiene bases genéticas, es decir, que la capacidad morfogenética y el desarrollo de los callos está determinada por uno o más alelos dentro del genoma.

Otro aspecto importante y que no ha sido tomado en cuenta con atención es el papel que juega la interacción entre genotipos específicos y el medio ambiente donde se encuentren las plantas proveedoras de explantes, de hecho Tomes en 1985 ya reporta que dicha interacción interviene en la frecuencia de inducción de callos tipo II.

En cuanto al contenido de hormonas en el medio de cultivo, que ha sido considerado el factor más importante en otras especies, para maíz se ha observado que la mejor respuesta para la inducción de callo se obtiene con el empleo de 2,4-D como auxina, en comparación con AIA y ANA (Green et al 1984), aunque también se ha propuesto el empleo del MCPP (Sánchez et al, 1981) o dicamba (Duncan et al, 1985). Por otra parte, de acuerdo a las publicaciones anteriormente analizadas, es claro que la disminución de los niveles de auxina o su eliminación por completo, provoca la formación de embriones somáticos, es decir, se desencadena el evento morfogenético.

Durante mucho tiempo se ha aceptado también que en la regeneración de raíz las citocininas no juegan un papel muy

importante y más aún se les ha atribuido cierto nivel de inhibición para la formación de callo (Sánchez et al 1979); sin embargo, en 1988 Duncan y Widholm proponen un protocolo en el que se plantea un periodo de cultivo de los callos (obtenidos a partir de embriones inmaduros), de 6 días en el medio empleado por Duncan en 1988, el cual se encuentra adicionado de 3.5 µg/l de 6BAP, (citocinina), antes de transferirlos para propiciar la regeneración.

En el caso de la fuente de carbono se han propuesto concentraciones que van de un 6 % a un 12 % de sacarosa las cuales se ha visto que estimulan la formación de brotes.

En cuanto a los requerimientos de Nitrógeno, se han tenido resultados favorables en medio MS y en Na a pesar que entre ambos existe una notable diferencia en el balance entre $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, que es de 1 y 7 respectivamente. Con el empleo de asparagina y L-prolina se ha logrado un mejoramiento para la formación de callo tipo II, mientras que el empleo de glutamina (ampliamente utilizado en otras especies) no tiene ningún efecto o bien presenta un efecto inhibitorio y esto ha sido reportado por Tomes en 1985.

La posibilidad de definir un medio que resulte adecuado para la mayoría de los genotipos ha sido motivo de interés, así Duncan por ejemplo en 1985 elabora toda una serie de medios de cultivo que le permiten definir un medio "adecuado" al cual denomina medio "D" logrando con dicho medio producir callos regenerables de 196 genotipos diferentes de maíz.

También se ha observado que existe una pérdida en la

capacidad morfogénica tanto en callos como en cultivos en suspensión y esto varía dependiendo del genotipo (Green, 1982; Sánchez et al, 1988) por lo cual se recomienda efectuar una continua selección del tipo de callo embriogénico, eliminando el callo no embriogénico durante los subcultivos, esto es muy importante ya que de esta manera el callo mantiene por más tiempo la capacidad morfogénica (Vasil, 1987; Tomes, 1985).

Para el establecimiento de cultivos en suspensión, es muy importante lograr callos embriogénicos tipo II, ya que de esta forma las suspensiones pueden ser más finas (Vasil, 1986), además las células mantienen por más tiempo la capacidad morfogénica.

En 1989 Raymond reporta la regeneración de plantas fértiles a partir de un híbrido elite de maíz. En este trabajo los callos que se obtienen de embriones inmaduros son friables y en ningún caso son mucilaginosos, de estos callos se establece el cultivo embriogénico en suspensión. El callo se induce en medio MS adicionado de 0.5 mg/l de 2,4-D y 12 % de sacarosa, dos semanas después de la siembra, los callos se subcultivan en medio B5 adicionado de 0.5 mg/l de 2,4-D y 2 % de sacarosa, posteriormente se colocan en medio N6 con 2 mg/l de 2,4-D y 3 % de sacarosa; para establecer el cultivo en suspensión se emplea este mismo medio. Los cultivos se agitan a 120 rpm, en obscuridad constante a 27 °C; bajo estas condiciones se aislan los protoplastos mismos que forman pequeños callos, los cuales se plaquean para la regeneración de plantas en medio N6 adicionado de 10 mg/l de kinetina y 0.25 mg/l de 2,4-D. Dos semanas después se

colocan en medio No sin reguladores de crecimiento; finalmente las plantas que se obtuvieron no presentan anomalías morfológicas ni reproductivas .

Recientemente en 1990, Gordon reporta ya la transformación de células de raíz y la formación de plantas transgénicas que son fértiles; los callos tipo II empleados en este trabajo se obtuvieron de embriones inmaduros de plantas obtenidas de las cruza A-188 x B73 y A-188 x B84, sembrados en medio No adicionado de 1 mg/l de 2,4-D. Para el cultivo en suspensión emplea el medio MS con la misma concentración de auxina y es en este tipo de cultivo en el que las células embriogénicas son transformadas genéticamente; posteriormente se plaquean los callos que se forman en el medio líquido en medio MS adicionado de 0.25 mg/l de 2,4-D y 10.0 mg/l de BAP, durante dos semanas, al término de las cuales se coloca en el mismo medio pero sin reguladores de crecimiento. Al igual que los trabajos anteriores de cultivo en suspensión, las plantas llegan a la madurez sin presentar algún problema.

Como es de notarse, ya en los últimos dos años, se han logrado avances relevantes para obtener un cultivo embriogénico en suspensión del cual se obtengan plantas completas y estas sean fértiles sin presentar ningún problema. Sin embargo los genotipos de los cuales se ha obtenido la respuesta tanto de embriogénesis como de regeneración, han sido muy específicos, y aunque este último autor plantea que su protocolo puede ser un sistema reproducible para la regeneración de plantas transgénicas de raíz, esto tendrá que probarse pues como es sabido en cultivo de tejidos

vegetales los genotipos de esta especie responden de diferente forma.

En 1989, Moustafá propone un método que resulta importante como un marcador de la respuesta morfogénica, este autor reporta una correlación significativa entre la capacidad de morfogénesis y la reducción de MnO_4^- a MnO_2 por los callos de maíz lo cual permite emplear la reducción del permanganato como ensayo en la capacidad de regeneración.

Finalmente, hay que mencionar que existe un gran interés por comprender cuales son los factores que van a determinar la respuesta morfogénica. A pesar de no ser un sistema fácil, el cultivo in vitro de maíz, ha sido aprovechado en la investigación básica en la citología (Baiza et al, 1989), diferenciación celular (Sánchez et al, 1988), metabolismo, etc..Y así de esta forma ir aclarando como son los mecanismos a través de los cuales se va dando este proceso morfogénico.

5.6. Efecto del Nitrato de plata en la Embriogénesis somática

En los últimos años se ha empleado el nitrato de plata para incrementar la respuesta de morfogénesis en los cultivos de maíz. Uno de los primeros reportes fue el de Songstad y colaboradores en 1988. En este trabajo se determina la influencia del etileno en el crecimiento de los callos y la regeneración de plantas. Así también analiza el efecto antagónico que tienen sobre este compuesto la presencia en el medio de cultivo de nitrato de plata

y el norbornadieno. Para esto los autores trabajan con embriones inmaduros de los híbridos Pa91 y H99, los cuales se colocaron en un medio que denominan "D" (Duncan et al, 1985), compuesto por: macronutrientes del N₃, micronutrientes del B₅, vitaminas del medio RT, dicamba 15 M, L-prolina 12 mM, hidrolizado de caféina 500 mg/l, KNO₃ 28 mM, tiamina 1.1 M, sacarosa 6 % y glucosa 56mM. Los cultivos se incuban por 21 días en obscuridad constante a 28 °C, los callos obtenidos se mantienen en medio "D" a través de resiembras cada cuatro semanas.

La relevancia de esta publicación radica en que por primera vez se plantea la utilización de nitrato de plata y norbornadieno para incrementar la capacidad morfogénica en callos de maíz, ambos compuestos actúan como antagonistas para la acción del etileno, así se determinó que a concentraciones de 250 μ M de norbornadieno o bien 100 μ M de AgNO₃, se incrementa hasta 12 veces la capacidad de morfogénesis en los callos. Esta actividad inhibitoria que tiene el etileno fue corroborada al adicionar en el medio de cultivo ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) en una concentración de 1.0 mM, este ácido es un precursor del etileno y por lo tanto la producción de dicho gas se incrementa, observándose la inhibición tanto del crecimiento como de la respuesta morfogénica del cultivo.

Duncan en el mismo año, publica un trabajo en el cual obtiene un mejoramiento en la regeneración de plantas a partir de callos de maíz, al adicionar al medio 3.5 mg/l de BAP durante un periodo de 3-6 días (Duncan, 1988). El incremento en la regeneración fue significativo ya que los callos se trataron previamente con

AgNO₃. Esto lleva al máximo el número de plantas regeneradas por gramo de callo, es decir, se logra un incremento de un 113 % a un 148 % .

En 1989 Vain, determina también que existe un mejoramiento en la producción y regeneración de callos embriogénicos tipo II de maíz, provocado por el empleo de AgNO₃. Al adicionar este compuesto en los callos se induce la habilidad de regeneración sin afectar el aspecto morfológico de los mismos, además no se detectó la presencia de etileno en los primeros 18 días del cultivo.

6.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la realización del presente trabajo experimental se diseñó un protocolo que consta de varias etapas.

En la primera etapa se contempla la inducción de callo a partir de embriones maduros de las variedades VS-22, H-135 y Chalqueño en dos medios de cultivo (adicionados de 4 mg/l de MCPP) que son R: (medio basal modificado por Sánchez et al, 1988) y N64 (medio basal Chu et al, 1975). El callo primario (obtenido del embrión maduro) se obtiene cuatro semanas después de iniciado el cultivo, así se procede a realizar la primera resiembra en medio R₁ y N6₁ (los mismos medios con 2mg/l de MCPP). Quince días después se hace una segunda resiembra en el mismo medio.

La segunda etapa consiste en probar el efecto de AgNO₃ en la embriogénesis asexual por lo que al terminar el periodo de la última resiembra mencionada se selecciona el callo más compacto y se coloca en medio R: y N6: el cual contiene AgNO₃ en una concentración de 10 mg/l, 6 % de sacarosa y 1mg/l de 2,4-D; en este medio los cultivos permanecerán por cuatro semanas al final de las cuales los cultivos se colocan en medio R_{0.5} y N6_{0.5} también adicionado de 10 mg/l de AgNO₃ solo que aquí la sacarosa y el 2,4-D se reducen a la mitad, es decir, 3 % y 0.5 mg/l respectivamente. La duración de esta etapa igualmente es de cuatro semanas.

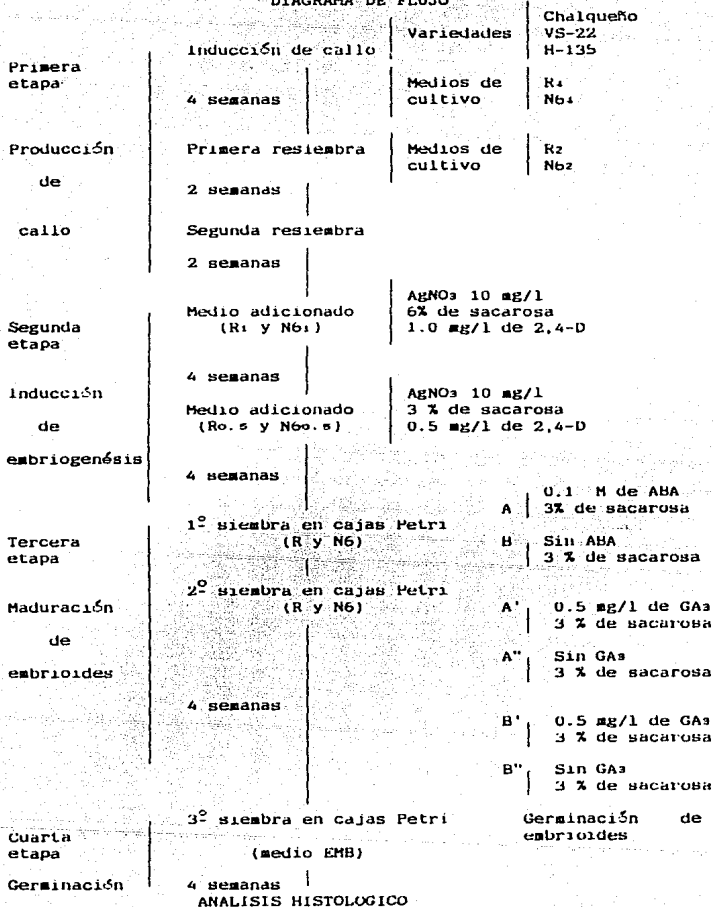
Posteriormente en la tercera etapa se pretende inducir la formación de embrioides, sembrando pequeñas porciones de callo

embriogénico en cajas de petri, empleando tanto el medio R como el N6 y probar el efecto del ABA (ácido abscisfco). En esta parte del trabajo, se hace una división de los callos en ambos medios y de esta forma se tiene un grupo "A" y un grupo "B". Así el medio de un grupo (A) contendrá 0.1 M de ABA y el siguiente grupo (B) carecerá de este; en ambos casos la sacarosa se mantiene al 3 % y la duración de este cultivo es de cuatro semanas. al final del periodo sigue una segunda resiembra en cajas de petri en el que cada uno de los dos grupos se divide nuevamente en dos (grupo A = A' y A'' ; B= B' y B'') debido a que ahora se pretende averiguar el efecto del GA₃ (ácido giberélico). Por consiguiente una parte de los cultivos del grupo A se colocan en un medio adicionado de 0.5 mg/l de GA₃ y la otra parte en un medio que carece totalmente de fitorreguladores.

Finalmente en la última etapa se pretende provocar la germinación de las posibles estructuras embriogénicas. Para tal efecto se plantea emplear el medio EMB, (Reinert and Yeoman, 1982).

Con el fin de determinar cual es el tratamiento en el que van a formarse las estructuras embriogénicas, se anexa a este trabajo un analisis microscópico de los cultivos obtenidos al final del experimento.

DIAGRAMA DE FLUJO



ANÁLISIS HISTOLÓGICO

7.- METODOLOGIAS

7.1. Obtención del material biológico

Se utilizaron embriones maduros provenientes de las variedades VS-22 y H-135, mismas que fueron proporcionadas por PRONASE, lo cual permitió que al menos dos de las tres variedades que se emplearon en este trabajo estuvieran certificadas.

También se emplearon embriones de la variedad Chalqueño, la cual se trajo directamente de la región de Chalco donde se produce.

Los embriones colocados en el medio de cultivo estuvieron completos, tal como se muestra en la figura 4. Esto es porque la formación de callo resulta más favorable cuando el escutelo se encuentra presente y en contacto con el medio de cultivo (Radjevic, 1984; Armstrong y Green, 1985; Sánchez, 1988). Cada embrión después de ser disectado de la semilla se limpia perfectamente, es decir, se eliminaron por completo los residuos de endospermo, el pericarpio y el pedicelo, así de esta forma el material biológico queda listo para someterse al tratamiento de desinfección.

7.2. Tratamiento de desinfección

De todos los tratamientos probados (tabla 2), se determinó aplicar los siguientes:

a) Para la variedad VS-22 y H-135, se da una hora de remojo en agua corriente con recambio constante de ésta, en seguida se procede a trabajar bajo condiciones asépticas por lo cual se distribuye el material biológico en matraces Erlenmeyer

(estériles), colocando 100 embriones en cada uno. Se agregan 50 ml de una solución de etanol al 70 % durante 30 segundos, al cabo de los cuales se decanta y se agraga hipoclorito de sodio al 10 % durante 15 minutos, se decanta esta solución y se dan cuatro enjuagues con agua desionizada estéril, finalmente los embriones se colocan en cajas de Petri para ser sembrados en el medio de cultivo respectivo.

b) Para la variedad Chalqueño, se emplea el mismo procedimiento que para las variedades anteriores hasta llegar al paso de los cuatro enjuagues, solo que para este maíz después de los enjuagues se agrega una solución de cloranfenicol de 30 g/ml y se mantiene en agitación constante durante 30 minutos, finalmente se decanta la solución de antibiótico y se procede a la siembra de los embriones.

7.3. Preparación y caracterización de los medios de cultivo

a) Preparación

Para facilitar la preparación de los medios de cultivo, se elaboran soluciones "stock" de los diferentes compuestos que constituyen a estos medios, tal como se indica en las tablas 3,4,5.

Para preparar un litro de medio "R" (Sánchez et al, 1981), en un vaso de precipitados se añade una cantidad determinada de agua desionizada (volumen conocido) la cual se mantiene en agitación constante a través de una barra magnética y una parrilla con agitación; el motivo de dicha agitación es que la mezcla sea

homogenea y así de esta forma evitar precipitaciones al ir agregando las soluciones stock, mismas que se adicionan de la manera siguiente:

Solución	ml/l
A	10
B	50
C	10
D	10
E	10
F	10
G	10
H	5
I	5
J	5
K	2

Sacarosa 30 g/l

Hidrolizado de caseína 200 mg/l

Reguladores de crecimiento (dependiendo de la etapa)

Ajustar el pH del medio a 5.8 con una solución de HCl 0.1 N o KOH 0.1 N.

Se completa el volumen en un matraz aforado de un litro.

Una vez aforado el medio de cultivo, se vacía de nuevo al vaso de precipitados y se agregan 8 g de agar, se tapa con papel aluminio y manteniendolo en agitación constante se deja calentar hasta que el agar se disuelva por completo, sin permitir que el medio de cultivo hierva.

Para preparar un litro de medio N^o 6 (Chu et al, 1975), se añaden igualmente las soluciones stock a una cantidad conocida de agua desionizada los volúmenes que se añaden son los siguientes:

Solución stock	ml/l
1	10
2	100
3	10
4	10
F (MS)	10
H (MS)	5
I (MS)	5
J (MS)	5
K (MS)	2

Sacarosa 30 g/l

Hidrolizado de caseína 200 mg/l

Reguladores de crecimiento (dependiendo de la etapa)

Ajustar pH a 5.8

Aforar a un litro

Agregar 8 g de agar y calentar hasta que este se disuelva por completo sin dejar hervir.

Finalmente para ambos casos el medio de cultivo se vacía en frascos gerber en alícuotas de 25 ml, estos frascos se sellan con tapas de plástico. Una vez terminada la preparación del medio de cultivo, se esteriliza en autoclave a 121 °C y 1.5 libras de presión durante 15 minutos.

Para preparar un litro de medio EMB (Reinert and Yeoman, 1982), se adiciona a una cantidad conocida de agua desionizada las siguientes cantidades de las soluciones stock:

Solución stock	ml/l
a	1.35
b	10
c	10
d	10
e	10
f	10
g	10
h	1.0
i	2.0

Sacarosa 30 g/l

Ajustar pH a 5.8

Completar el volumen en un matraz aforado, posteriormente se agregan 8 g de agar, se deja calentar hasta que éste se disuelva por completo sin dejar hervir; finalmente se distribuye en matraces Erlenmeyer para esterilizarse. Una vez estéril el medio bajo condiciones de asepsia se vacía en cajas de Petri de 9 cm de diámetro (estériles) en alícuotas de 25 ml.

b) Niveles de hormonas y otras sustancias inductoras en los medios de cultivo

i) Medio para la inducción de callo (R₄ y N6₄)

Tanto el medio R₄ como el N6₄ se adicionaron de una auxina sintética similar al 2,4-D que es el ácido 2-(2-metil)4 cloro fenoxipropiónico (MCP) en una concentración de 4 mg/l. Dicha concentración se emplea porque en trabajos anteriores (Sánchez et al, 1988) se ha visto que bajo estas condiciones hormonales se obtiene una buena respuesta de formación de callo en maíz.

ii) Medio de resiembra (R₂ y N6₂)

En este caso se adiciona al medio de cultivo 2 mg/l de MCP, como podemos ver este fitorregulador se reduce a la mitad porque lo que se pretende ahora es que el callo ya obtenido incremente su tamaño.

iii) Medio adicionado (R₁ y N6₁)

Este medio se caracteriza por contener el agente que ayuda a que se presente la respuesta embriogénica en el callo, es decir, que es en este medio donde se adiciona AgNO₃ en una concentración de 10 mg/l según Songtand (1988); además es aquí donde se da un incremento importante de sacarosa (6 %) y el subíndice 1 indica que solo se adiciona 1 mg/l de auxina pero ahora se trata de 2,4-D.

iv) Medio adicionado (R_{0.5} y N6_{0.5})

Para este medio además de los 10 mg/l de AgNO₃, lo que va a caracterizarlo es que tanto la sacarosa como el 2,4-D se reducen a la mitad, es decir, 3 % y 0.5 mg/l respectivamente.

En particular para este medio el AgNO₃ se pesa y se disuelve por separado. La solución que se obtiene se adiciona al medio de

cultivo cuando en este se ha disuelto completamente el agar (se torne transparente).

v) Medio para la primera siembra en cajas de Petri (R c/ABA y R s/ABA o N6 c/ABA y N6 s/ABA)

Estos medios tienen como base al medio R y N6, carecen completamente de auxina, pero ahora cada uno se divide en dos de manera que una parte (grupo A) contiene ABA a una concentración de 0.1 M y la otra parte (grupo B) carece de fitorreguladores. Para ambos casos la sacarosa se mantiene al 3 %.

vi) Medio para la segunda siembra en cajas Petri (R c/GA₃ y R s/GA₃ o N6 c/GA₃ y N6 s/GA₃)

En este caso lo que caracteriza al medio es que carece de ABA, porque ahora el fitorregulador a probar es el GA₃ en una concentración de 0.5 mg/l. Así cada uno de los grupos de la primera siembra en cajas de Petri se divide en dos subgrupos más, de tal manera que una parte de cada subgrupo lleva GA₃ y la otra carece del mismo.

vii) Medio para la germinación de los embriones somáticos (EMB)

Finalmente este medio se emplea porque se ha visto que es adecuado para la germinación de embriones cigóticos de maíz (Reinert and Yeoman 1982) y se caracteriza además de sus sales que lo componen, por carecer de fitorreguladores de crecimiento y de hidrolizado de caseína.

En el caso de los medios empleados en la tercera y cuarta etapa, después de aforarse se distribuyen en matraces Erlenmeyer de un litro (500 ml por matraz), se adiciona la cantidad de agar conveniente, se sella con papel aluminio y se esteriliza. El ABA y el GA₃ se añaden por separado al medio de cultivo después de ser esterilizados por filtración.

Las cajas de Petri de 9 cm de diámetro se esterilizan por separado. Una vez estériles las cajas y el medio de cultivo, antes de que gelifique se vacía en alícuotas de 25 ml bajo condiciones asépticas. Finalmente las cajas se sellan con parafilm y se deja solidificar el medio y de esta forma queda listo para ser sembrado.

7.4. Siembra de embriones maduros

Ya desinfectado el material biológico, bajo condiciones estrictas de asepsia se procede a sembrar. Para esto los embriones se colocan en una caja de Petri de 9 cm de diámetro, con ayuda de unas pinzas de disección previamente sumergidas en etanol y flameadas, se colocan cuatro embriones sobre el medio de cultivo, de tal forma que el eje embrionario quede en contacto con el medio, ya que de no ser así la formación de callo sería muy pobre. Una vez sembrado el material biológico, se incuba en oscuridad constante a 26 ± 2 °C durante cuatro semanas.

7.5. Resiembras y parámetros a evaluar

Cuatro semanas después de la siembra de embriones para la inducción de callo, en cada uno de los medios de cultivo y para cada variedad se evaluó el porcentaje de inducción de callo, de

raíces y de plántulas. Después de esta evaluación se hizo la primera resiembra del callo primario y como también se determinó la cantidad de callo producida, los frascos gerber se pesaron antes y después de colocar este callo. Dos semanas más tarde se realiza una segunda resiembra con el fin de incrementar la cantidad de material biológico (callo), al igual que la resiembra anterior, los frascos se pesaron antes y después de colocar el callo y esto fue así porque una parte de los cultivos se sometió a una serie de resiembras con el fin de determinar el crecimiento del callo y las características que va presentando durante éste. La otra parte de los cultivos se resembró a los quince días en medio R₁ y N₆. Los callos que se colocaron en este medio fueron seleccionados de tal forma que su consistencia fuera generalmente compacta, además dichos callos se seccionaban en pequeñas porciones colocándolas muy cercanas unas de otras sobre el medio de cultivo en donde permanecieron durante cuatro semanas, en todo este periodo de incubación se realizaron observaciones visuales para definir cual era la respuesta del callo en este medio de cultivo. Al finalizar las cuatro semanas, solo los callos completamente sanos (que no estuvieran necrosados) se colocaron en medio R_{0.5} y N_{6.5} por cuatro semanas más. Durante este periodo de incubación también se realizaron observaciones visuales, evaluando además el número y la calidad de las formaciones embriogénicas. Las protuberancias que presentaban los callos se contaron, así como las características de las mismas para lo cual se dividieron en tres grupos: grupo I protuberancias con apariencia sumamente viscosa, grupo II con apariencia friable, grupo III de apariencia compacta.

Hasta esta resiembra los cultivos se encuentran en condiciones de completa oscuridad.

Posteriormente se realizó la primera siembra en cajas de Petri, colocando en cada caja pequeñas porciones de callo embriogénico pertenecientes a los tres grupos ya descritos, los cultivos se incubaron en fotoperiodo de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad, durante cuatro semanas. En estos cultivos se evaluó la inducción de vascularización ya que ésta fue una respuesta característica que se presentó en los callos. De esta forma se hizo un conteo total de los callos con vascularización por cada tratamiento.

Más tarde se realizó una segunda siembra en cajas de Petri con el fin de propiciar el desarrollo de las estructuras embriogénicas, en estos cultivos se evaluó visualmente la apariencia de callo tomando en cuenta básicamente su consistencia. Se observó en los callos un cambio de consistencia muy drástico, mismo que fue evaluado definiendo tipos de callo, teniendo entonces: tipo bofo, parcialmente bofo y compacto. La duración de esta resiembra también fue de cuatro semanas y se incubaron de igual manera que los cultivos anteriores en cajas Petri.

Finalmente se realizó una tercera siembra en cajas Petri, empleando el medio EMB sin fitorreguladores, con el fin de propiciar la germinación de los embriones somáticos. En este caso sólo se hicieron observaciones visuales de los cultivos para definir su comportamiento. Cabe mencionar que en este caso sólo se subcultivaron los callos compactos del cultivo anterior.

Para determinar la eficiencia de cada uno de los

Tratamientos de desinfección

Agente desinfectante	Tratamiento										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Detergente en solución / 5'					X	X					
Enjuagues con agua corriente										X	X
Etolanol al 70% 30 seg 05'	X	X	X	X			X	X	X	X	X
NaOCl 3M 2 gotas lveen 20 05'	X					X					
NaOCl 10 % 2 gotas lveen 20 10' 15' 20'		X	X	X			X	X	X	X	X
CaO(Cl)2 0.7 % por 2 hrs.					X						
Enjuagues con agua desionizada estéril	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
HCl 0.01 N 30 seg							X	X			
Sol. de antibiótico por 30'											X
4 enjuagues con agua desionizada estéril	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Cuadro 2 .Muestra los tratamientos de desinfección que se probaron en embriones maduros de las tres variedades utilizadas en este trabajo.

Soluciones stok del medio Murashige-Skoog

Solución	Compuesto	Cantidad (gr)	Volumen (ml)
A	CaCl ₂ . 2H ₂ O	44.0	cbp ---1000
B	NH ₄ NO ₃	16.5	cbp ---1000
	KNO ₃	19.0	
C	KI	0.083	cbp ---1000
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.0025	
D	KH ₂ PO ₄	17.0	cbp ---1000
	H ₃ BO ₃	0.62	
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.025	
E	MgSO ₄ . 7H ₂ O	37.0	cbp ---1000
	MnSO ₄ . H ₂ O	1.89	
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.0025	
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.86	
F	FeSO ₄ . 7H ₂ O	2.784	cbp ---1000
	EDTA. Naz	3.726	
Cantidad (mg)			
G	myo-Inositol	2.5	cbp ---250
H	Ac. nicotínico	0.025	cbp ---250
I	Tiamina-HCl	0.05	cbp ---250
J	Piridoxina-HCl	0.025	cbp ---250
K	Glicina	0.25	cbp ---250

Cuadro 3 . Medio basal Murashige - Skoog, (1962).

Nota: Para preparar la solución F se calienta ligeramente la solución de EDTA y posteriormente se agrega lentamente la solución de fierro.

Preparación de las soluciones stok del medio EMB

Solución	Compuesto	Cantidad (gr)	Volumen (ml)
A	CaCl ₂ .H ₂ O	44.0	cbp --- 1000
B	KI	0.001	cbp --- 250
	KCl	0.745	
C	KH ₂ PO ₄	2.04	cbp --- 250
	H ₃ BO ₃	0.001	
	NH ₄ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.001	
D	MgSO ₄ . H ₂ O	1.2	cbp --- 250
	MnSO ₄ . H ₂ O	0.039	
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.001	
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.001	
E	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.05	cbp --- 250
F	CaSO ₄ . 2H ₂ O	0.05375	cbp --- 250
		Cantidad (mg)	
G	Ac. nicotínico	2.5	cbp --- 250
H	Tiamina - HCl	0.05	cbp --- 250
I	Piridoxina - HCl	0.025	cbp --- 250

Cuadro 4 - Medio basal de Reinert y Yeoman, (1982).

Preparación de las soluciones stok del medio N6

Solución	Compuesto	Cantidad (gr)	volumen (ml)
1	CaCl ₂ · 2H ₂ O	16.6	cbp ---1000
2	KNO ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄	28.3 4.63	cbp ---1000
3	KI KH ₂ PO ₄ H ₃ BO ₃	0.08 40.0 0.16	cbp ---1000
4	MgSO ₄ · 7H ₂ O MnSO ₄ · H ₂ O ZnSO ₄ · 7H ₂ O	18.5 0.33 0.15	cbp ---1000
F(MS)	FeSO ₄ · 7H ₂ O EDTA · Na ₂	2.784 3.726	cbp ---1000
Cantidad (mg)			
H(MS)	Ac. nicotínico	0.025	cbp ---250
I(MS)	Tiamina-HCl	0.05	cbp ---250
J(MS)	Piridoxina-HCl	0.025	cbp ---250
K(MS)	Glicina	0.25	cbp ---250

Cuadro 5 . Medio basal Chu, (1975).

tratamientos, se hizo un análisis histológico del material biológico obtenido al final de este trabajo.

7.6. Técnica histológica (para microscopio óptico)

A continuación se describe la técnica utilizada para obtener preparaciones histológicas, mismas que serán observadas al microscopio óptico en un sistema de campo claro

7.6.1. Fijación

De los cuatro tratamientos obtenidos al final del experimento, se tomaron muestras de 20 a 30 callos por tratamiento, los cuales fueron colocados en una solución fijadora llamada FAA, durante cinco días; esta solución se compone de:

Formaldehido.....	100 ml/l
Acido acético glacial	50 ml/l
Alcohol etílico 96 %	500 ml/l
Agua corriente	350 ml/l

una vez fijado el material se procedio a deshidratarlo.

7.6.2. Deshidratación e impregnación de parafina

Después de los cinco días de exposición en la solución fijadora, las muestras fueron deshidratadas mediante su paso por la siguiente serie gradual de etanol:

Etanol 30 %	30 minutos
50 %	30 minutos
70 %	30 minutos
85 %	30 minutos

100 %

30 minutos

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

Etanol absoluto-Xilol 1:1	30 minutos
Parafina-Xilol 1:1	24 horas
Parafina pura 54-56 °C	24 horas

La mezcla de parafina-xilol y la parafina pura fueron mantenidas en estado líquido dentro de una estufa a 56 ± 2 °C .

7.6.3. Inclusión de los tejidos

Para la inclusión se utilizó parafina de la marca Paraplas de punto de fusión $54-56$ °C, la cual fue mantenida en estado líquido dentro de una estufa a 56 ± 2 °C. Se utilizaron moldes de cartulina de 2×1.5 cm . En cada bloque de parafina se colocó un solo callo, el cual a través del microscopio estereoscópico y con ayuda de una aguja de disección se acomodó en la parte media del bloque, estos se dejaron enfriar durante 24 horas y posteriormente se procedió a cortar.

7.6.4. Obtención de cortes

Los cortes que se obtuvieron fueron de 9 micras de grosor, utilizando un microtomo marca American optical. Con ayuda de un pincel los cortes se colocan en un baño de flotación el cual contiene agua corriente a una temperatura de 45 °C y 0.5 gr/l de gelatina. Una vez que el corte está bien extendido se coloca sobre el portaobjetos, por último se deja secar a temperatura ambiente y posteriormente se procede a desparafinar el tejido.

7.6.5. Eliminación de parafina y tinción de los cortes

Para eliminar la parafina de los cortes, los portaobjetos que los contenían se colocaron en una estufa a 56°C durante 15 a 20 minutos, al término de los cuales se introducen a xilol absoluto durante 10 minutos (se hacen dos cambios de 5 minutos cada uno). Para eliminar completamente los restos de parafina, los cortes se pasan por una serie gradual de etanol:

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

Para la tinción de los cortes se empleó la técnica de Safranina - verde rápido, (modificación propuesta por Engleman, 1988) tal como se presenta en el cuadro 6. Así entonces después de pasar por agua corriente, los cortes se colocan en una solución de Safranina-fenol durante 24 horas, al final de las cuales los cortes se enjuagan cuidadosamente con agua corriente y se pasan nuevamente por una serie gradual de alcoholes 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

Finalmente se eliminan los restos de xilol y se procede a montar con bálsamo de canada. De esta forma se obtuvieron las preparaciones fijas las cuales se observaron utilizando un microscopio óptico en un sistema de campo claro.

Preparación de colorantes

1.- Safranina - fenol

Compuesto	Cantidad (g/l)
Safranina O	0.5
Sulfato de amonio	130.0
Fenol	0.1

La safranina se disuelve en 500 ml de agua corriente, posteriormente se añase el sulfato de amonio y el fenol, completando finalmente con agua corriente.

2.- Verde rápido

En este caso se pesan 0.75 g de verde rápido y se disuelven en 250 ml de etanol al 96 % . Esta solución se agita durante 30 minutos al final de los cuales se filtra, quedando el colorante listo para ser usado.

Cuadro 6: Modificación hecha por Engleman (1988), Centro de Botánica, Colegio de Posgraduados, Chapingo.

B.-RESULTADOS

B.1. Obtención de callo

Al término de la inducción de callo, se llevo a cabo la evaluación para determinar el rendimiento de cada una de las tres variedades en los dos medios de cultivo (R₁ y N6₁) empleadas en este trabajo.

En primer lugar se hizo una evaluación de apreciación tomando en cuenta los siguientes parámetros: formación de callo, desarrollo de raíz y de plántula.

Para evaluar la formación de callo se determinó que no importaba su tamaño ya que en este caso solo se iba a ser referencia al número de embriones que formaron o no callo, así entonces, al final de un conteo se define que el número promedio más alto lo presenta la variedad Chalqueño, siendo muy pequeña la diferencia entre ambos medios (5%) por lo que esta característica coloca a la variedad en primer lugar en cuanto a la inducción de callo.

Para la evaluación de raíces y de plántulas el criterio a seguir fue el siguiente: para raíces estas se tomaron en cuenta cuando midieron más de 1 cm, es decir, cuando ya se presentaba el desarrollo de una raíz como tal; para el caso de plántula, ésta se consideraba si media más de tres cm ya que antes de este tamaño solo se observa una estructura blanquecina que en muchas ocasiones queda como tal. De esta forma el desarrollo de raíces y de plántulas fue evaluado y de igual manera, la variedad Chalqueño fue la que presentó menos desarrollo de estas estructuras y la diferencia entre ambos medios también fue muy pequeña (8%). Definitivamente

en cuanto a las características de la inducción esta variedad fue la que presentó la mejor respuesta ya que lo ideal es que se presente callo sin raíces y sin plántulas.

En el caso de los embriones de la variedad VS-22 que se sembraron en medio N64, aunque el porcentaje de inducción de callo fue menor (67%) que en R4 (76%), los callos en este medio no presentaron tantas raíces ni plántulas. Los embriones que se colocaron en medio R4 presentan pocas raíces pero las plántulas son abundantes. La variedad H-135 presenta una respuesta que sigue casi el mismo patrón que la VS-22, ya que los embriones que fueron sembrados en medio N64 presentan una respuesta de formación de callo que es menor que los que se encuentran en medio R4, sin embargo estos callos casi no presentan raíces ni plántulas. Los embriones que se colocan en medio R4 muestran un mayor porcentaje para formación de callo sin embargo éste se desarrollan muchas raíces y plántulas.

En esta etapa de inducción de callo se sembraron un total de 5760 embriones (tomando en cuenta las tres variedades en los dos medios de cultivo), de los cuales 1877 fueron de la variedad Chaiqueño, 1926 de la VS-22 y 1953 de la H-135. De esta forma 2846 embriones se colocaron en medio R4 y 2913 en medio N64. Así al término del periodo de inducción se obtuvo que 1904 embriones NO formaron callo, lo cual implica que en 4349 embriones SI se dio la formación de callo.

Estadísticamente al aplicar la prueba de Ji-cuadrada se determinó que hay diferencia significativa en cuanto a la

respuesta de cada variedad para la inducción de callo y de esta forma se define que las variedades Chalqueño y VS-22 presentan más capacidad para generar callo que la que muestra la variedad H-135. Si se toma en cuenta a la variedad y al medio de cultivo para determinar las características de la respuesta de inducción de callo, se obtiene que no hay significancia entre los datos obtenidos, es decir, que la cantidad de embriones que produzcan callo en cada una de las variedades, es la misma, independientemente del medio de cultivo que se utilice.

Para completar la información con respecto a la inducción de callo (cuadro 8), del total de embriones sembrados de cada una de las variedades y en cada medio, se evaluó el porcentaje de contaminación el cual resulta ser mayor (2.7 %) en la variedad Chalqueño y que fue sembrada en medio R₁.

Finalmente se determinó la cantidad de callo obtenido por embrión, esto se hizo tomando en cuenta el número total de embriones sanos y la cantidad total de callo obtenido. Este dato es importante ya que el número total de embriones sanos para todas las variedades en los dos medios de cultivo fue mayor de 900 pero no rebaso los 1000. Así entonces se obtuvo que la variedad en la que se produjo mayor cantidad de callo, fue Chalqueño en medio R₁; esto viene a reafirmar la respuesta obtenida en cuanto a la formación de callo, es decir, que dado los resultados presentados la variedad que presenta más capacidad de formación de callo y que produce más cantidad del mismo es Chalqueño; por lo tanto es la que se define como la de mejor rendimiento.

siguiendole las variedades VS-22 y H-135.

8.2. Evaluación del crecimiento en los cultivos

Como ya se mencionó anteriormente en este texto, es la primera ocasión que se trabaja con estas tres variedades de maíz, motivo por el cual se decidió que la evaluación del incremento en el crecimiento sería un dato importante; de esta forma se determinó evaluar el peso de los callos durante cuatro resiembras y esto también se hizo para cada variedad en cada medio de cultivo. El incremento en su crecimiento se determinó a través del peso fresco en gramos (cuadro 9); así el comportamiento de las tres variedades fue el siguiente:

En la variedad Chalqueño el peso inicial de los callos que se colocaron en medio R₂ fue de 4.26 g y para los callos en medio N₆ fue de 3.93 g como se nota casi se parte de la misma cantidad de material, sin embargo al transcurso de las resiembras muestran un comportamiento diferente ya que como se observa en la gráfica 1, los cultivos que se mantuvieron en medio R₂ si muestran un aumento en peso el cual se va dando paulatinamente aumentando solo un 205.6 % al final de la cuarta resiembra, mientras que los callos que se encontraban en medio N₆ presentaron un incremento más notorio ya que estos cultivos llegan a tener un porcentaje de incremento de 1032.5 %, lo cual implica que de 4.93 g iniciales, al final se obtuvo 44.51 g de callo.

En la variedad VS-22, se parte de una cantidad de callo también similar en ambos medios (11.96 g en R₂ y 13.02 g en N₆). En esta variedad se observa una respuesta contraria a la de Chalqueño ya que los cultivos que se encuentran en medio R₂ presentan un

porcentaje de incremento considerable (719.8 %), lo cual implica que de 11.96 g iniciales, se llega a obtener 98.1 g de callo al final de la cuarta resiembra. Los callos que se encuentran en medio N6z van creciendo poco a poco en cada resiembra alcanzando solamente un 370.8 % de incremento, esto en comparación con los que están creciendo en medio R2 corresponde a menos de la mitad.

Si continuamos hablando de crecimiento podemos notar que la variedad H-135, muestra un patrón de crecimiento igual al de Chalqueño, esto es, que los callos que se encuentran en medio R2 presentan poco crecimiento durante las cuatro resiembras llegando a tener finalmente un porcentaje de incremento de 175.3, sin embargo los cultivos que se encuentran en medio N6z presentan un crecimiento importante desde la segunda resiembra y de 18.38 g iniciales de callo, al final se obtienen 77.53 g, lo cual corresponde a un 321.8 % de incremento

Esto es lo que se puede definir directamente de los datos obtenidos al evaluar el crecimiento de los callos. Estadísticamente al realizar un análisis de varianza se obtuvo de una forma más precisa el patrón de crecimiento de los cultivos de las tres variedades en cada una de las resiembras, de esta forma, inicialmente (peso inicial) las cantidades de callo de las cuales se parte en cada caso, presentan el siguiente orden: la cantidad más pequeña la presenta Chalqueño en medio N6z (3.93 g) y en medio R2 (4.26 g), le sigue la variedad VS-22 en medio R2 (11.96 g) y en medio N6z (13.02 g), por último la variedad H-135 que se encuentra en medio R2 (15.73 g) y en N6z (18.38 g), presentan el mayor peso inicial. Más tarde cuando se realizó la

primera resiembra y se obtiene el primer incremento, la variedad en la que se presenta el incremento más pequeño es H-135 en medio R2, le sigue Chalqueño en medio R2 y en medio N62 pero estos tres incrementos son menores al que presentan H-135 en medio N62 y VS-22 en medio R2 estos incrementos son menores al que presenta VS-22 en medio N62. De este primer incremento lo que se puede definir es que la variedad Chalqueño que se encuentra en medio R2, aunque su peso inicial fue uno de los mayores, el incremento que presentó en este caso fue uno de los menores. La variedad VS-22 en esta resiembra se coloca a la cabeza, es decir, en este caso es la variedad en la que para ambos medios se registra el mayor incremento, sobre todo los callos que se encuentran en medio N62. Durante la tercera resiembra se obtuvo el segundo incremento el cual al ser analizado por el mismo método, coloca a las variedades de la forma siguiente : el incremento más pequeño lo presentan los cultivos de la variedad VS-22 que se encuentran en medio N62, siguiéndole los cultivos de H-135 y Chalqueño en medio R2, H-135 y Chalqueño en medio N62, el mayor incremento en este caso lo presentan los cultivos de la variedad VS-22 que se encuentran en medio R2. Como se puede notar los cultivos de la variedad VS-22 que se encuentran en medio N62 presentan el incremento más pequeño, siendo que en la resiembra anterior fue el que presentó el mayor incremento.

Finalmente en la cuarta resiembra al obtenerse el tercer incremento, se define más claramente el comportamiento de los cultivos, de esta forma la variedad Chalqueño que es el que presenta uno de los incrementos mayores en la tercera resiembra en este caso presenta el menor incremento. En la variedad H-135

sucede que si se revisan las cantidades iniciales es el que cuenta con más peso, sin embargo, ahora ocupa uno de los incrementos menores. Chalqueño en medio R2 presenta un incremento más o menos estable durante las resiembras, ya que nunca llega a ocupar uno de los primeros lugares pero tampoco uno de los últimos, lo mismo sucede con H-135 en el mismo medio.

La variedad VS-22 en ambos medios de cultivo presenta el incremento mayor, principalmente los cultivos que se encuentran en medio R2. Esto es importante porque desde el primer incremento, dicha variedad en este medio de cultivo se mantiene a la cabeza en cuanto a crecimiento. Así entonces desde el punto de vista estadístico los cultivos de esta variedad son los que presentan un mejor crecimiento.

Las desviaciones estandar reafirman lo anteriormente descrito, así entonces todas las variedades presentan un incremento en su crecimiento. De esta forma el medio R2 resultó ser el más adecuado para que se dé un buen crecimiento en callos de la variedad VS-22. Para las variedades Chalqueño y H-135 el mejor medio resultó ser el medio N62 y ambas variedades siguen casi el mismo patrón de crecimiento durante todas las resiembras.

8.3. Presencia de regiones embriogénicas

En este caso se hizo una evaluación del número total de callos en cada variedad, es decir, que se hizo un conteo final del número de callos que se encontraban en cada uno de los dos medios de cultivo. En los callos se determinó la presencia de regiones embriogénicas para cada variedad y medio de cultivo. Así se puede

apreciar que tanto en medio N60.5 y Ro.5 la variedad VS-22 ocupa los más altos porcentajes principalmente en el medio N60.5 en el que de 119 callos, se registran 67 con regiones embriogénicas que equivalen a un 56.0 %, siendo este el valor más alto. El porcentaje más pequeño lo presenta la variedad Chalqueño en la cual de 64 callos solamente 12 presentan regiones embriogénicas y esto corresponde a un 19 %.

Los callos de la variedad H-135 muestran una respuesta en cada medio que se puede catalogar como diferente; esto es porque en medio Ro.5 de un total de 173 callos, solo en 43 se localizan regiones embriogénicas y esto equivale a un 25.0 %; sin embargo cuando los callos de esta variedad se encuentran en medio N60.5, de un total de 199 callos, 98 de ellos poseen regiones embriogénicas lo cual corresponde a 49.0 %, como vemos la respuesta en este medio es mucho mejor para esta variedad en particular. Esto se hace notar porque en el caso de VS-22 aunque alcanza un valor de respuesta más alto, entre ambos medios esta es casi pareja (51.0 y 56.0 %) ya que ambos rebasan el 50 % pero no el 60 %.

Estadísticamente, la presencia de estas regiones embriogénicas fue evaluada por la prueba de Ji-cuadrada, a través de la cual se pudo determinar que la no inducción de la formación de regiones embriogénicas por el medio de cultivo es significativa en ambos medios de cultivo, lo cual indica que dichos medios requieren de la adición de una sustancia inductora para que así se incremente la presencia de dichas regiones embriogénicas. Cuando SI se presentan dichas regiones, a través de la misma

prueba estadística, se determinó que es significativa la diferencia que existe en la respuesta que se obtiene en los dos medios de cultivo, es decir, que el medio Ro.5 es menos adecuado para la inducción de la formación de dichas regiones embriogénicas, resultando entonces que el medio Nbo.5 es el más favorable en esta segunda etapa.

Al evaluarse por el mismo método la capacidad de cada variedad, se definió lo siguiente: las variedades Chalqueño y H-135 tienden a presentar menos callos con regiones embriogénicas, sin embargo VS-22 es la variedad que tiene más capacidad para que en la superficie de los callos se formen regiones embriogénicas. En general esta variedad tiende a presentar más callos con estas regiones principalmente en medio Ro.5, pero para que se pueda dar esta respuesta, el cultivo tiene que pasar por un periodo de adaptación en el medio de cultivo.

En esta etapa también se registro la presencia de raíces, ya que se observó un desarrollo muy abundante de estas estructuras, principalmente en el medio Ro.5 para las variedades VS-22 y H-135. En este caso lo que se hizo fue contar el número de callos que presentaron raíces y las dos variedades antes mencionadas son las que presentan el mayor número de estos callos (28.0 y 25.0 respectivamente). Sin embargo en la variedad Chalqueño que se encuentra en el mismo medio presenta solo un 5 % de callos con raíces. Los cultivos de VS-22 y H-135 que se encuentran en medio Nbo.5 presentan un porcentaje similar (23.0 y 24.0 respectivamente). En general para estas dos variedades la respuesta de formación de raíces es muy pareja ya que en todos los casos se rebasa el 20% pero no el 30 % .

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

El parámetro de necrosis se observa claramente en la variedad H-135 que se encuentra en el medio Ro.5 en donde el porcentaje de los callos necrosados llega a ser de 17 %, el valor que le sigue es de 12 % y corresponde a la misma variedad pero ahora se encuentra en medio N60.5. Para VS-22 que se encuentra en medio Ro.5 muestra un 2 % y cuando se encuentra en medio N60.5 no se registran callos necrosados.

De las formas blanquecinas que se registraron, en la variedad VS-22 fue donde se presentaron con mayor abundancia ya que de un total de 219 callos, en 102 se observan estas formaciones y esto corresponde a un 47.0 %. El valor que le sigue es el que presenta la variedad Chalqueño en la que de 64 callos 21 las presentan, esta cifra corresponde a un 33 %. En las variedades que se encuentran en medio N60.5 (VS-22 y H-135) el porcentaje de callos que presentan formaciones blanquecinas es el mismo (20 %) ,por último la variedad que casi no presenta estas formas es H-135 en medio Ro.5 ya que de un total de 173 callos, solamente 2 las presentan lo cual corresponde al 1 %.

8.4. Evaluación de proembriones somáticos

Al final de la segunda etapa se realizó una evaluación con el fin de determinar la cantidad total de proembriones somáticos en cada medio de cultivo. Para esto, se procedió a observar las características que dichas estructuras presentaban por lo cual se decidió hacer una clasificación para su evaluación tomando en cuenta su consistencia; definiendo de esta forma tres tipos de proembriones somáticos: tipo 1 presenta una consistencia viscosa y

muy hidratada, el tipo 2 es muy friable pero no hidratada y el tipo 3 es muy compacto, cabe mencionar que estos últimos son los que más interesan para los fines de este trabajo debido a que estos proembriones son los que tienen más probabilidad de llegar a ser embriones somáticos ya que esta respuesta está determinada en parte por la consistencia compacta.

Esta evaluación se llevo a cabo sin tomar en cuenta la variedad dado que ya anteriormente se hizo una evaluación de las regiones embriogénicas que presentaban los callos de las tres variedades en cada medio de cultivo (cuadro 10), de esta forma lo que se tomo en cuenta básicamente fue el medio de cultivo. Así entonces en medio Ro.5 de 475 callos se tienen 240 proembriones somáticos de los cuales solamente 22 son tipo 3. En este caso los proembriones tipo 2 son los que se presentan con más abundancia (79 %), lo mismo sucede con los cultivos que se encuentran en medio N60.5 en el que de 533 callos se evalúan 644 proembriones de los cuales 81 son tipo 3, siendo también más abundantes los tipo 2.

Desde el punto de vista estadístico se determinó que los cultivos presentan una respuesta diferente en cada medio de cultivo, es decir, los cultivos que se encuentran en medio Ro.5, tienden a presentar menos proembriones que los cultivos que se encuentran en medio N60.5, siendo estos últimos los que presentan tendencia a generar más proembriones. En ambos casos la respuesta es independiente del tipo de proembriones que se determinaron anteriormente, esto es, porque solo se evaluó el efecto que tiene el medio de cultivo.

Al realizar una evaluación tomando en cuenta el tipo de proembrión

y el medio de cultivo, se definió que en medio Ro.5 los cultivos muestran menos capacidad para producir proembriones y es por eso que Nbo.5 se propone como mejor medio para este fin. Los proembriones se presentan de la siguiente manera; con menor frecuencia los del tipo 1, le siguen los del tipo 3 y por último los que se presentan con mayor frecuencia son los del tipo 2.

Los callos necrosados fueron muy pocos en ambos medios lo cual no implica una pérdida importante de material biológico. De esta forma se confirmó la cantidad de material disponible para las siembras posteriores en cajas petri en los que se propiciaría la maduración y el desarrollo del embrión somático.

B.5. Inducción de vascularización

Cuando se realizó la siembra de los proembriones somáticos en cajas petri las cuales contenían el medio adicionado con ABA o bien no contenía dicho fitoregulator, la respuesta que se observó fue la presencia de vascularización y esta característica se evaluó cuando fue más pronunciada, lo cual ocurrió cuando los cultivos se transfirieron a un medio que contenía GAS o bien que carecía de él; estos datos se indican en el cuadro 12, en la que se registro la cantidad de callos por caja y de estos cuantos estaban vascularizados. El conteo se realizó sin considerar tanto el medio de cultivo como la variedad, esto fue con el fin de definir más claramente cual fue la respuesta de los callos en cada una de los cuatro tratamientos al final de este periodo. De esta forma, resultó que al final de la etapa III los callos

que no se trataron con ABA y si con GAs presentan más vascularización, esto es, que de un total de 382 callos, 284 presentan tejido vascular y esto corresponde a un 74.0 %, estas cifras determinan que en dicho tratamiento es en el que más vascularización se presenta. Esto fue confirmado estadísticamente a través de la prueba de Ji-cuadrada. Cuando los callos en el primer cultivo en cajas de petri fueron tratados con ABA y a la siguiente resiembra se trataron con GAs, estos también presentaron una vascularización abundante porque de un total de 324 callos, 196 (61 %) fueron callos vascularizados lo cual coloca al tratamiento en el segundo lugar para inducir vascularización. Específicamente en esta evaluación, se puede decir que los cultivos que fueron sometidos a estos tratamientos son los que tienen más tendencia a presentar vascularización ya que además estadísticamente, no hay diferencia significativa entre ellos. En el tratamiento en que los callos se trataron con ABA y al medio siguiente no se le adicionó GAs se registra también más de un 50 % de callos con vascularización esto es que de 394 callos, en 216 se observan estructuras vasculares. En estos tres casos los callos fueron tratados con fitorreguladores y en general en todos se presenta un alto porcentaje de vascularización, sin embargo los callos que no se trataron con ningún fitorregulador durante esta etapa, son los que presentan menos vascularización esto es, que de 273 callos solo 135 están vascularizados, dicho dato corresponde al 50 % siendo menor en un 5 % de los que fueron tratados con ABA y sin GAs. Estos callos presentan buenas características en cuanto a que son más compactos y sus estructuras embriogénicas están más definidas, lo cual

significa que probablemente los mejores resultados se presentaron en este tratamiento porque además estadísticamente se obtiene que los callos presentan menos vascularización.

De esta forma se puede decir que la adición de ABA y de GA₃ no propicia al menos en esta etapa del cultivo la maduración ni la germinación del embrión somático.

Dado los resultados obtenidos de los diferentes tratamientos, tal parece que es conveniente que los cultivos que presenten estructuras embriogénicas deben ser colocados primeramente en un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento, de esta forma las regiones de los callos de las cuales surgiran los embriones somáticos se reafirmaran más claramente en la superficie del callo. Una vez pasando esta etapa, se podrá entonces proceder a la adición de fitorreguladores con el fin de propiciar la maduración y la germinación de estos embriones somáticos, esto de cierta forma garantiza una buena respuesta de este proceso morfogénico.

8.6. Efecto del ácido giberélico (GA₃)

En la segunda parte de la etapa III los callos se trataron con GA₃ y además de la vascularización que presentaron estos cultivos, también se observó que al adicionar este fitorregulador, se dio un cambio más pronunciado en la consistencia del callo al adquirir una apariencia bofa, por lo que se consideró esta otra característica importante de evaluar. Dichas evaluaciones se realizaron de igual forma que las presentadas en el cuadro 13 (sin tomar en cuenta el medio de

cultivo ni la variedad), es decir, solo se evaluó la presencia o ausencia de GAs en el medio de cultivo. Así entonces cuando se empleo GAs, de un total de 776 callos, 289 (37.0 %) tienen apariencia bofa y 215 (28.0 %) son parcialmente bofos, si se comparan estas cifras con lo obtenido en los cultivos en los que no se adicionó GAs, se puede notar que los resultados son similares. Esto es importante porque cuando se hace el conteo para evaluar la cantidad de callos que presentan una consistencia compacta, se determina que la respuesta es casi la misma, sin embargo, cabe hacer notar que esta consistencia se presentó más claramente en los callos que no fueron tratados con GAs y si se revisa nuevamente el cuadro 12 es en estos callos donde también se presenta poca vascularización.

Estadísticamente se determinó que no hay diferencia significativa de la respuesta que se obtuvo tanto de los callos que fueron tratados con ABA, como los que no lo fueron, es decir, la probabilidad que tienen los cultivos para presentar cualquiera de los tres tipos de consistencia es la misma, independientemente de que sean tratados o no con GAs, lo cual permite plantear que probablemente este no fue el momento adecuado para la adición de dicho fitoregulador (GAs), ya que la finalidad es propiciar la germinación del embrión somático obtenido y no el cambio de consistencia de los cultivos.

En este caso la necrosis mostró cifras importantes, sobre todo en los cultivos que se trataron con GAs ya que se obtuvo un 11.0 %, lo cual significa una pérdida importante de material biológico.

8.7. ANALISIS HISTOLOGICO

8.7.1. Caracterización del callo primario

El callo se observó a los seis días después de la siembra de embriones maduros y surge de la parte media del embrión, se caracteriza por ser amorfo, de color blanquecino y muy friable. En general para las tres variedades de maíz los callos presentaron las características antes mencionadas, pero mientras va pasando el tiempo de inducción y este callo primario va creciendo su coloración cambia a amarillenta y su consistencia pasa a ser compacta; la textura final es granular. Cabe mencionar que existe un callo, (en menor cantidad) que siempre permanece friable.

Al microscopio este callo primario presenta dos tipos de células que se distinguen por su morfología:

Células tipo 1.- Se caracterizan por ser grandes, alargadas, con una gran vacuola, núcleo pequeño y excéntrico, con citoplasma poco denso y pared celular gruesa. Presentando así las características típicas de una célula parenquimatosa. Estas células por lo general se encuentran en la parte interna del callo.

Células tipo 2.- Estas células son pequeñas, su citoplasma tiene granulos abundantes, poco vacuoladas, su núcleo es relativamente grande y su pared celular es delgada. Estas células se encuentran en la superficie del callo y por las características que presentan se piensa que se trata de células meristemáticas a través de las cuales el callo va creciendo.

Con frecuencia se encuentran mezclados ambos tipos celulares en algunas regiones del callo.

Con respecto a la formación de callo en maíz, Mott y Cure (1978) han puesto en duda tal proceso ya que realizan un estudio histológico de cultivos que se originan de diferentes partes de la planta. De sus observaciones concluyen que el callo se forma por un crecimiento aberrante de raíces, lo cual indica que no existe realmente una regeneración de raíces *in vitro* sino más bien la presencia de estas es el resultado de la proliferación de un tejido que ya se encontraba presente. Sin embargo en el siguiente año Springer y Green (1979) también hacen un estudio histológico de los callos obtenidos a partir de embriones inmaduros y a través de dicho análisis proponen que el callo se origina a partir del tejido que forma al escutelo, en especial de la región epitelial ya que esta zona se caracteriza por ser altamente meristemática y por lo tanto se da una rápida proliferación celular. Estos autores determinaron también que existe una regionalización celular, es decir, que en la superficie del callo se encuentran zonas meristemáticas de las cuales se originan brotes y por lo mismo se plantea que el origen de estos sea multicelular.

En cuanto a la formación de callo proponen que la proliferación del tejido ocurre en la zona cambial, es decir, la zona donde se une el escutelo con el eje embrionario y el desarrollo de raíces lo plantean como una evidencia de que si se da el proceso de morfogénesis en estos cultivos; concluyendo entonces que los callos se encuentran formados por células parenquimatosas. Finalmente reportan la presencia de xilema y floema en sus callos, esto último es importante porque en este trabajo de tesis también

se obtuvieron cortes de callos con tres resiembras en los que se logra apreciar la presencia de tejido vascular pero nunca en estos callos se presenta el origen de un embrión somático.

En los callos primarios que se obtuvieron, son muy pocos los que presentan raíces, más bien las raíces que se evalúan al final de la inducción, proceden del mismo embrión.

8.7.2. Caracterización del callo con resiembras

Este tipo de callo presenta un cambio en su consistencia y su textura esto implica que se hace más compacto y su textura granular es más firme. Su coloración es amarillenta y mientras más resiembras tenga el color va siendo más oscuro, hasta llegar a ser café; esto además de atribuirse a las resiembras, se debe a que el callo por su mismo crecimiento va acumulando sustancias de desecho (producto de su metabolismo) que muchas veces provocan que el callo se necrose.

En cuanto a la presencia de raíces, estas aumentan su frecuencia mientras se incrementa el número de resiembras, lo cual se debe a la concentración endógena de auxinas en el cultivo, es decir, como el medio en que se hace la resiembra (mantenimiento del callo) está adicionado de una auxina, hay restos de este compuesto que quedan en el cultivo y de esta forma se va acumulando cada vez más, lo cual provoca que la presencia de raíces sea cada vez mayor. Sin embargo cabe mencionar que estas estructuras son más abundantes en los cultivos de las tres variedades que se encuentran en el medio de cultivo R₂, esta característica se presenta más claramente en la variedad VS-22. Los cultivos que se

encuentran en el medio N62 también presentan raíces pero en menor cantidad o bien muchas veces no las presentan, como sucede en la variedad Chalqueño; una característica importante que se observó durante las resiembas fue que la variedad VS-22 que se encontraba en este medio no presenta formación de raíces y esto demuestra la alta variabilidad de un genotipo.

Las raíces son un verdadero problema debido a que dificultan la resiembra del callo, siendo en ocasiones tan abundantes que provocan la pérdida del material biológico.

En el callo de resiembra también se presentan regiones en su superficie que se distinguen por ser blanquecinas y sumamente friables; esto hace pensar que se trata de la proliferación de las regiones meristemáticas y que por lo tanto a través de estas se da el crecimiento del callo.

También se observa que los callos se van haciendo cada vez más mucilaginosos excepto las zonas blanquecinas que proliferan en la superficie.

8.7.3. Caracterización de los cultivos en el medio adicionado

Se sabe de antemano que un cultivo bajo condiciones in vitro tiene un alto índice de totipotencialidad y el maíz no es la excepción, sin embargo, no ha sido fácil lograr que se manifieste dicha capacidad en esta especie, por lo que se ha planteado la existencia de mecanismos de represión, los cuales hasta la fecha no han sido debidamente caracterizados dado la complejidad y variabilidad de los mismos. Es por ello que

se han empleado sustancias que propician que se dé el proceso de morfogénesis bajo condiciones in vitro.

En maíz, lo más reciente que se ha hecho para incrementar la respuesta morfogénica es emplear el $AgNO_3$ lo cual ha dado buenos resultados. Por ello en este caso el compuesto antes mencionado se empleó en una concentración de 10 mg/l (Vain et al, 1989). Los callos que se sometieron a este tratamiento presentan las características siguientes: compactos, de textura granular y de coloración amarillenta. Al transcurrir la primera semana en el medio adicionado (R₁ y N₆) los callos toman una coloración oscura y son ya muy mucilaginosos, pero además los callos que se colocaron en el medio R₁ presentan desde la primera semana raíces abundantes y esto ocurre con más frecuencia en la variedad Chalqueño y con menos frecuencia en VS-22. Lo anterior no implica que en el medio N₆ no se dé la formación de raíces lo que pasa es que en estos callos las raíces se presentan con más retraso pero nunca tan abundantes como en el medio R₁.

Definitivamente en este aspecto (formación de raíces) se emplea una respuesta contraria si se compara con lo que se obtiene durante las resiembras ya que para este caso la variedad que presenta más raíces es Chalqueño y la que presenta menos es VS-22, lo cual indica una manifestación clara de la variabilidad de los genotipos que se emplean en este trabajo.

Otra característica que también resultó de interés es que originalmente el medio que contiene el nitrato de plata, tiene una coloración amarillenta; cuando se colocan los callos en este medio y mientras va pasando el tiempo, el medio de cultivo vuelve a

tener su color original y esto pasa principalmente en la zona donde se encuentra colocado el callo. Posiblemente el cambio en la coloración del medio se deba a:

a) El callo que se coloca en el medio de cultivo al ir creciendo desprende sustancias propias de su metabolismo las cuales reaccionan con los iones de plata y entonces se da un cambio en la coloración.

b) Otra razón es que el mismo callo absorba el nitrato de plata por lo cual cambie la coloración del medio.

Sin embargo no se tiene bien establecido a que se debe el cambio en la coloración en el medio de cultivo.

Además de las características ya mencionadas cuando los callos se colocan en un medio de cultivo que contiene 6 % de sacarosa, presentaron un cambio muy notable en cuanto a su consistencia y esto se debe al aumento de la osmolaridad en el medio de cultivo lo cual provoca que los callos tengan una consistencia sumamente compacta y mucilaginosa. Al observar estos cultivos al microscopio estereoscópico, en la superficie del callo se ven protuberancias de color más claro (blanquecino). En los cultivos que se encuentran en el segundo medio adicionado (Ro. 5 y N60.5), al realizar cortes histológicos, se observó una organización celular en la superficie como se muestra en la microfotografía 14, en la que se ve claramente que la organización se presenta en la región donde se encuentran las protuberancias y las células que las forman son pequeñas en relación con las células que forman el tejido parenquimatoso

(interior del callo). Estas organizaciones tienen como base a un tejido formado por células parenquimatosas en el cual se observan restos de tejido vascular.

8.7.4 Características de los callos que fueron tratados con ABA

El tratamiento con ABA comprende la primera parte de la etapa III en la que se pretende la maduración de los embriones somáticos. Al iniciar el cultivo de callos en este medio se tuvo mucho cuidado en seleccionar solo porciones de callo con una consistencia compacta, sin embargo, al transcurrir el tiempo se observó que los callos se cubren de hebras las cuales finalmente se catalogaron como vascularización, esta respuesta fue general para todas las variedades y en ambos medios de cultivo.

En muchos de los callos desaparecieron las regiones que ya se habían catalogado como embriogénicas, esto ocurrió de manera azarosa lo cual no permitió catalogar a una variedad ni cultivo en especial, pero si se observó que algunos callos que contenían regiones embriogénicas en la superficie no sufrieron ningún cambio, aun en su crecimiento.

En los callos que se colocaron en un medio que no contenía ABA, solo se observó el desarrollo de pequeñas raíces las cuales no fueron tan abundantes, no crecieron y tanto su coloración como sus características embriogénicas se conservaron.

8.7.5. Características de los callos cuando fueron tratados con GA₃

En este caso una parte de los callos que se emplearon tuvieron la característica de presentar vascularización (tratados con ABA), pero se tuvo cuidado que fueran compactos. En general lo que se observó fue que al paso del tiempo los callos se van haciendo friables a tal grado que llegan a tener una apariencia bofa lo cual provoca que en muchos de ellos las regiones embriogénicas se pierdan por completo.

8.8. ANALISIS HISTOLOGICO DE LOS CALLOS OBTENIDOS AL FINAL DEL EXPERIMENTO

Finalmente se obtuvieron cuatro tratamientos:

- I.- Con ácido abscísico y sin ácido giberélico (c/ABA s/GA₃)
- II.- Sin ácido abscísico y sin ácido giberélico (s/ABA s/GA₃)
- III.- Con ácido abscísico y con ácido giberélico (c/ABA c/GA₃)
- IV.- Sin ácido abscísico y con ácido giberélico (s/ABA c/GA₃)

Aunque no se llegó a obtener muestras de todas las variedades en los cuatro tratamientos, si se llegó a definir de manera general, cual fue el comportamiento de los callos en cada tratamiento; así entonces se define lo siguiente:

Tratamiento I (c/ABA s/GAs)

En este tratamiento los callos se colocaron primero en un medio que contenía ABA y posteriormente pasaron a un medio libre de hormonas. Aunque muchos de los callos presentaron apariencia boba, algunos toleraron ser procesados histológicamente lo cual permitió obtener preparaciones fijas en las que se observó lo siguiente:

En VS-22 (N6) se presentó una organización celular pero no es propia para ser caracterizada como tipo embriogénesis más bien se trata de células parenquimatosas que están organizadas.

En H-135 y Chalqueño (R) se observa muy poca organización (casi no hay) y tampoco es característica de una embriogénesis somática.

Tratamiento II (s/ABA s/GAs)

Se definió que en los cultivos de la variedad VS-22 que fueron colocados desde la inducción de callo hasta el cultivo final en medio N6, se presentó el desarrollo de embriones somáticos. Estos callos durante la tercera etapa se colocaron en un medio que careció totalmente de reguladores de crecimiento, lo cual es importante tomar en cuenta ya que de esta forma se puede definir que esta variedad obedece claramente a lo establecido primeramente en zanahoria (Steward y Reinert, 1969) y posteriormente para otras especies. Cuando los cultivos se colocan en un medio que carece completamente de reguladores de crecimiento, la respuesta es que se desencadena el proceso de

mortogenésis somática este evento ha sido observado también en maíz por Vasil, (1983); Kamo, (1987); Duncan, (1988), y en esta variedad sucede lo mismo.

En este tratamiento la variedad Chalqueño y H-135 (N6) no presentan formación de embriones somáticos pero si se observa aunque no es muy pronunciada, cierta organización celular. Este arreglo celular está formado por células redondas y alargadas de tal forma que se puede decir que ambos tipos celulares guardan la misma proporción.

Las variedades que se colocaron en medio K, finalmente presentan una consistencia muy bofa por lo cual no toleraron ser tratadas para obtener preparaciones fijas, de las pocas que se llegaron a obtener solo se observan las paredes celulares y como esto no es uniforme, no se puede determinar su organización celular.

De la variedad VS-22 se obtuvieron preparaciones fijas en las que se encuentran embriones somáticos en etapa globular y en tres estadios de desarrollo (microfotografía 1) ya que estos embrioides varían claramente en su tamaño. Si se observa la figura 5 ; las estructuras que en estas microfotografías apreciamos son muy similares a las que se marcan con E y F solo que en este caso se trata de una embriogénesis cigótica.

En la microfotografía 2 se observa que los embriones surgen de un tejido formado por células parenquimatosas y este hecho viene a reafirmar la idea que existe acerca de la plasticidad que dichas células presentan para volver a retomar sus características meristemáticas (Esau, K. 1982). También podemos observar que a través del tejido parenquimatoso, existe un tejido vascular y este es otro hecho característico de una embriogénesis somática, es

decir, parte de las células parenquimatosas se diferencian en tejido vascular el cual va a estar cubierto de estas mismas células, las cuales para este caso son células alargadas que se encuentran como base para los embrioides (microfotografía 3). Si se observa con más detalle (160 X), se ve que existe una estructura entre el embriode y el tejido parenquimatoso que bien puede ser el suspensor. Esta estructura no se observa en la microfotografía 4 lo cual puede deberse al nivel donde se hizo el corte, sin embargo en ambos (3 y 4) se presenta una organización celular en la periferia que constituye a la epidermis.

En esta variedad y por los cortes obtenidos, también se localizaron proembriones somáticos (microfotografía 5), los cuales ya presentan una organización celular en la periferia (protodermis) para dar origen a la epidermis, en su interior las células presentan un tamaño uniforme y su forma casi redonda se hace notar claramente como lo señala la flecha. Esta estructura no se encuentra fija a ningún otro tejido lo cual se debe a que el tejido base no resistió pasar por la técnica histológica y esto se puede notar porque solo se observan las paredes celulares.

En cuanto al tejido de conducción en estos cortes se observa (microfotografía 6) principalmente células de xilema que se distinguen por teñirse intensamente.

Se presentan otros cortes en los que se ve como es que a partir del mismo tejido parenquimatoso (microfotografía 7) pero en diferente región, surge una raíz (a) y un embrión somático (b). Esta fotografía es muy ilustrativa ya que permite establecer

cuales son las diferencias entre un embriode y una raíz en estadios muy tempranos de desarrollo. Como podemos ver las dos estructuras surgen de una capa de células parenquimatosas asociadas al tejido vascular el cual se observa mejor en la microfotografía 8. Así entonces la futura raíz a pesar de ser tan pequeña, ya presenta una regionalización celular y por lo tanto se puede apreciar la cofia y la zona meristemática.

El embrión somático que se presenta en estas microfotografías (7 y 8) ya se encuentra en un estadio de desarrollo más avanzado que los que observamos en las microfotografías 1,2,3,4. Una diferencia notable en cuanto a la futura raíz es que en el caso del embriode la organización celular es uniforme por lo que se puede decir que no existe ninguna regionalización en dicha estructura.

En la microfotografía 9 se obtiene algo similar a las dos anteriores, solo que en este caso la raíz y el embriode se encuentran totalmente aparte; la raíz presenta también una regionalización celular por lo que se distingue la zona que comprende la caliptra y la zona meristemática, todo esto delimitado por una capa que es la epidermis.

El embrión somático se encuentra cortado longitudinalmente y esto permite apreciar el haz vascular, en cuya superficie están las células parenquimatosas de las cuales se origina. Se observa la epidermis y el tejido provascular del embriode, la organización celular es uniforme. En este caso no se observa la presencia de un suspensor, pero esto probablemente se debe al nivel que se hizo el corte. El tejido vascular que presenta este embriode es similar al que se muestra en los embriones cigóticos de la figura 5.

También se observan cortes de tejido vascular, mismo que se encuentra rodeado de células parenquimatosas lo cual apoya la idea de que el embrión somático no tiene conexión con el tejido vascular tal como lo plantea Raghavan (1976).

Con el fin de comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, se presentan dos fotografías de embriones somáticos. El de la izquierda se obtuvo en el presente estudio y el de la derecha corresponde a un embrión somático de B. inermis, tomado del capítulo 2.4 del libro *The Developmental Biology of Plants and Animals*. (Wareing, 1976).

Así en las microfotografías que aquí se señalan como el número 10, en ambos cortes podemos observar que existe un tipo celular característico y que existen regiones más densas las cuales posiblemente sean sitios donde la división celular es sumamente intensa. En "A" no se nota el suspensor y esto se debe a que el corte se hizo en una región más allá de esta estructura.

Específicamente en las figuras 5 y 6, ambas representan el desarrollo de un embrión, solo que en el caso de la figura 5 se trata de una embriogénesis de una planta monocotiledónea y el desarrollo es in situ. La figura 6 representa este desarrollo pero en una dicotiledónea pero aquí si es una embriogénesis somática. Ambas figuras permiten hacer una comparación a grosso modo de las etapas de desarrollo durante los dos tipos de embriogénesis; la etapa globular que se presenta en las dicotiledóneas, la podemos apreciar hasta la etapa G de la figura 5, en una monocotiledónea. Finalmente la etapa de torpedo en el caso de la planta dicotiledónea en que ya se diferencian los dos cotiledones

y el haz vascular. Lo mismo pasa en la planta monocotiledónea, solo que en este caso se trata de un cotiledón que de igual manera posee un tejido vascular.

En aumentos mayores (160 X) de los embriones en la etapa globular se pudo catalogar de una forma muy detallada el tipo de células que constituyen a dichas estructuras. En la microfotografía 11 se muestra que estas células tienen forma casi redonda, su pared celular sumamente delgada debido a que se están dividiendo constantemente, su citoplasma se observa denso, el núcleo es tan grande que ocupa una buena porción del volumen celular y el nucleolo también presenta un tamaño importante y se tiñe intensamente. El arreglo celular es característico de una región meristemática, además no existen grandes espacios entre las células.

Todas estas características son propias de una célula meristemática, lo cual implica que ya se dió una diferenciación celular que trajo consigo una diversidad histológica más marcada. Es decir, en el callo se presentaron cambios en las características celulares por lo que se da un reajuste en sus relaciones mutuas y esto trae como consecuencia una organización del tejido.

La microfotografía 12 ilustra otro tipo de diferenciación celular, solo que en este caso se trata de células que se han diferenciado en tejido vascular (más especializado), por lo que se pueden observar células del xilema con su forma característica (hexagonal) y células que constituyen al floema.

En el extremo derecho se presenta tejido formado por células parenquimatosas.

También se observó otro tipo de diferenciación celular, la cual constituye finalmente una raíz. La microfotografía 13 muestra como esta estructura. Tiene marcada claramente una regionalización celular, así podemos distinguir la cofia, la caliptra, en el centro de esta estructura se observa la zona meristemática, y más arriba la zona de alargamiento celular y superficialmente se encuentra a la protodermis.

Tratamiento III (c/GAs s/ABA)

En este tratamiento se obtuvieron muestras de cultivos que se encontraban tanto en medio R como en medio N6 y en ambos casos no se observó organización alguna excepto para la variedad VS-22 en la que se llegó a observar células parenquimatosas muy poco organizadas lo cual no corresponde a ningún tipo de diferenciación.

Tratamiento IV (c/GAs c/ABA)

En este caso solo en los cultivos que se encontraban en medio N6 se observó cierta organización en la que se presentan células pequeñas, las cuales no presentan características meristemáticas. Estas células se encuentran acompañadas de células más grandes y alargadas (otra forma de células parenquimatosas).

Aunque este tejido no se caracteriza como embrionario, si se presenta una regionalización dada por los dos tipos celulares. Además de esto, cabe mencionar que se presentan protuberancias (abultamientos celulares), pero no se trata de embriones somáticos.

9.-DISCUSION

Las variedades empleadas en este trabajo, muestran características importantes que las hacen aptas para poder trabajar con ellas bajo condiciones in vitro, estas aptitudes se pueden apreciar desde el momento en que, de los embriones maduros de cada una de las variedades se obtiene la formación de callo, esto aunque no es una respuesta pareja en todas las variedades, ya es un elemento importante para saber que si se pueden manipular bajo condiciones in vitro. Para poder definir cual es la variedad que presenta mejores características como ya se mencionó anteriormente en todos los casos se hizo un análisis visual que fue apoyado por un análisis estadístico .

En este caso para la inducción de callo tanto visualmente como estadísticamente, la variedad Chalqueño es la que presenta más capacidad para la formación de callo en ambos medios de cultivo, principalmente en medio R. Los embriones de esta variedad no solo tienen más capacidad de generar callo sino además la cantidad es mayor que en las otras dos variedades.

Las variedades VS-22 y H-135 presentan también una buena respuesta, solo que en este caso las cantidades son menores. Esto apoya datos de otros autores (Green, 1982; Duncan, 1985) que indican que el genotipo es determinante para la respuesta de cultivos in vitro.

Cuando se evaluó la presencia de raíces y plántulas, también la variedad Chalqueño fue la que presentó menor cantidad de estas estructuras, las otras variedades muestran un desarrollo abundante de raíces y de plántulas; esto lo podemos confirmar si se revisa

el cuadro / (apéndice). De cierta manera ya se empieza a mostrar la diferencia en cuanto a la respuesta de los genotipos, esto es, porque definitivamente se puede decir que el medio de cultivo no tiene una influencia relevante para que se dé la formación de callo, además, las condiciones de siembra e incubación son las mismas, de este modo se puede decir con plena certeza que la variedad más apta hasta este momento es Chalqueño.

Cuando fue evaluado el crecimiento, la variedad VS-22 fue la que presentó el mejor crecimiento, tal como se observa en la gráfica 2.

Las desviaciones estandard en general, apoyan aun más a los datos que se obtuvieron, los cuales indican que si hubo crecimiento de los cultivos.

La respuesta en crecimiento, aunque definitivamente depende del genotipo, no se puede pasar por alto la influencia que tiene el cambio de los cultivos de un medio viejo a un medio nuevo, es decir, el callo aunque no fue manipulado al ser resembrado, siempre tiene que pasar por una etapa de reacondicionamiento en el nuevo medio de cultivo, lo cual implica que en ese periodo casi no exista crecimiento.

El callo de raíz durante las resiembras, va cambiando de consistencia friable a compacta y también se da un cambio en su coloración, en este caso de una coloración blanquecina pasa a ser casi de color café.

El callo del cual se parte para inducir el proceso de embriogénesis somática, presenta las características que lo

catalogan como callo tipo I , (Tomes, 1985).

Como ya ha sido reportado, es importante un incremento de sacarosa en el medio de cultivo (Vasil,1982; Radojevic,1984; Novak,1987;Duncan,1989) y $AgNO_3$ (Songstad,1988; Phillippe,1989) para incrementar la formación de embriones somáticos en cultivos de maíz. En este trabajo al transferir los cultivos a un medio con estas características y que además se encuentra adicionado de 0.5 mg/l de 2,4-D , se observan ciertos cambios tanto en su textura como en su consistencia, de esta forma se pueden distinguir en la superficie de dichos callos regiones en las que el tejido es mucho más compacto, lo cual provoca que se formen abultamientos y esto es lo que se define como regiones embriogénicas, que de acuerdo a las características celulares son zonas donde existe una intensa división celular.

La respuesta que los cultivos muestran en esta segunda etapa es un poco diferente en las tres variedades. La variedad VS-22 es la que responde mejor, ya que además de que las características del callo son propias de un cultivo embriogénico, en estos fue donde se registró el mayor número de dichas regiones embriogénicas y más específicamente en los cultivos que se encontraban en el medio No.5. En general en este medio es en el que se observaron más regiones embriogénicas para todas las variedades , así entonces en el medio No.5 se observa una respuesta más pobre en los callos.

Con el incremento en la sacarosa básicamente lo que se pretende es el aumento de la osmolaridad en el medio de cultivo por lo cual se provoca que el callo pase a ser de consistencia muy compacta (esta respuesta varía con el genotipo). La adición de

AgNO₃ se realizó con el fin de contrarrestar el efecto que tiene el etileno tanto en el crecimiento como en la manifestación del proceso de morfogénesis de los cultivos

Reportes recientes explican (Songstad, 1988) el efecto de dicho compuesto en el proceso de embriogénesis y regeneración de plantas de maíz. Se ha reportado que existe un alto contenido de etileno en cultivos que no son embriogénicos, es decir, que no tienen la capacidad de producir embriones somáticos. Las resiembras son un factor importante, ya que durante ellas se van acumulando productos propios del metabolismo celular, uno de ellos es precisamente el etileno, y es por eso que la capacidad morfogénica de los cultivos, se va perdiendo (por tener un mayor número de resiembras) mientras más viejo sea dicho cultivo. Es por ello que en este trabajo se emplearon cultivos con solamente dos resiembras. Como el etileno puede estar presente en estos cultivos probablemente se emplearon en el momento más adecuado para que el medio de cultivo fuera adicinado de AgNO₃.

Además de estos dos factores, también se sustituyó el MCPP (regulador de crecimiento con el que se indujo callo) por 2,4-D, esto se hizo debido a que el empleo de esta fitohormona ha sido ya muy reportado (Vasil, 1982; Radojević, 1984) para hacer al callo embriogénico, tal es el caso del trabajo que Kamo reporta en 1985, en donde emplea toda una serie de concentraciones de 2,4-D, obteniendo los resultados más relevantes en los callos de maíz que se encontraban en medio no adicionado de 0.5 mg/l de dicho fitorregulador.

Estos tres factores en el medio de cultivo, son solo el

principio de todos los cambios que se requieren para inducir en un callo de raíz la formación de embriones somáticos.

En la segunda parte de esta etapa, la sacarosa se redujo (6%-3%) lo cual provocó en el callo que con el paso del tiempo su consistencia fuera cambiando a friable y que las regiones embriogénicas que llegaron a ser pequeños abultamientos, se hicieran más notorios y en algunos casos creceran.

Estadísticamente la respuesta fue muy pobre, lo cual hace pensar que el medio de cultivo debe ser adicionado de compuestos tales como L-prolina (Armstrong- Green, 1985), compuestos de composición compleja como el agua de coco (Duncan, 1985), ácido abscísico (Close, 1987), o bien algún compuesto que sea una fuente de Nitrógeno adecuada en el medio de cultivo.

En cuanto a los requerimientos hormonales es necesario definir más claramente una concentración adecuada de esta auxina hasta llegar a su eliminación total en el medio de cultivo.

Mucho tiene que ver el genotipo, ya que para inducción de callo Chalqueño es la variedad que responde mejor, mientras que en el caso del crecimiento VS-22 es la que presenta los mejores resultados.

Cuando ya se someten los cultivos al tratamiento para hacerlos embriogénicos, la variedad Chalqueño es la que menos responde. La variedad que mejores características presenta (de acuerdo a lo que se pretende) es la VS-22 en medio Nbo. 5.

Una característica importante que presentaron los callos en esta etapa fue el desarrollo de raíces, para que se diera esta respuesta tuvo que ver mucho el medio de cultivo en el cual se

encontraba el callo, esto es, que los que se colocaron en medio No. 5, presentan abundantes raíces desde los primeros días de establecido el cultivo, esto hace pensar, que si lo que se quiere es que se desencadene ese evento morfogénico, este medio es ideal para el desarrollo de raíces pero no para el desarrollo de embriones somáticos, esta respuesta es general para los callos de las tres variedades que se colocaron en este medio.

En el caso del medio de cultivo No. 5, los callos presentan muy pocas raíces o bien en muchos no existen.

Esto hace pensar que si bien ya se definió que el medio No. 5 es el más adecuado para la diferenciación de regiones embriogénicas en la superficie del callo, es en este medio donde se deben hacer las pruebas convenientes con los compuestos antes mencionados para mejorar la respuesta morfogénica, poniendo un especial interés en la variedad VS-22, ya que en esta es donde se obtuvo la mejor respuesta.

Una vez que ya se definió más la zona de crecimiento celular (meristemática o región embriogénica), estos abultamientos (proembriones) muestran ser diferentes aunque se encuentren cercanos unos de otros, esto se debe más que nada a la forma en que les llegan los nutrientes y sobre todo el agua, si se considera que en este caso ya se está hablando de cultivos que se encuentran en un medio bajo en sacarosa, por lo que el agua es más abundante en las células y es por ello que muchos de los proembriones tienen una consistencia muy viscosa y demasiado hidratada. Estas características muchas veces impiden que se dé un crecimiento celular rápido, por lo cual la estructura se va

perdiendo con el tiempo y es por ello que este tipo de proembrión que en este trabajo se le designó de tipo I, no es el más apropiado para someterlo a tratamientos posteriores con el fin de propiciar su crecimiento y su maduración. Otro tipo de proembrión, fue el que se catalogó como tipo II, el cual es demasiado friable y no muestra estar tan hidratado. Este proembrión no es conveniente, ya que en las resiembras posteriores únicamente crece (como si fuera un callo pequeño) y nunca se diferencia por completo por lo que tampoco es conveniente para los fines que se persiguen en este trabajo.

El tipo de proembrión que más conviene para este fin es el que fue catalogado como tipo III, el cual se obtiene en mayor cantidad en el medio No. 5. Este tipo de estructura se caracteriza por ser compacta lo cual le confiere cierta resistencia a los cambios que puedan ocurrir al ser transferidos de un medio a otro, aumentando esto la probabilidad de que dichas estructuras lleguen a ser embriones somáticos. Además de esto, otra razón importante por lo cual se les considera un buen material, es que hasta ese momento estas estructuras, ya se encuentran diferenciadas por completo del resto del callo.

Estadísticamente se determinó que existe una respuesta diferente de los cultivos, es decir, en el medio No. 5 los proembriones se presentan con menor frecuencia mientras que en los cultivos que se encuentran en medio No. 5 sucede lo contrario, esto muestra claramente la influencia que el medio tiene sobre los cultivos. Si se hace una comparación de los componentes de ambos medios, el medio No. 5 contiene mayor cantidad de $CaCl_2$ (dos veces más), y en cuanto a la fuente de Nitrógeno inorgánico en este medio

se da en forma de nitrato mientras que en el medio No.5 esta en forma de amonio. Además el medio Ro.5 tiene una fuente de Nitrógeno orgánico que es el Hidrolizado de caseína. Estas son solo algunas diferencias entre ambos medios. También hay que tomar en cuenta los requerimientos hormonales, en este caso solo se está adicionando 2,4-D en una concentración de 0.5 mg/l lo cual hace pensar que la adición de una citocinina como lo plantea Duncan (1988), puede mejorar la respuesta y así se incrementa el número de proembriones, es decir, lo que este autor plantea es dar al callo un tratamiento con una concentración baja de auxina y $AgNO_3$; después de dicho tratamiento los callos se colocan en un medio adicionado de una citocinina, en este caso el autor emplea BAP y con esto incrementa la respuesta de morfogénesis en sus cultivos de raíz.

Definitivamente el medio de cultivo más favorable es el No.5, por lo que podría ser que para experimentos posteriores se induzca la formación de callo en medio R4 y posteriormente solo se trabaje con el medio No6 y de esta manera definir que tan conveniente es el empleo de este medio para lograr una buena respuesta de morfogénesis en los cultivos y más específicamente en la generación de embriones somáticos. De resultar lo planteado anteriormente, se pueden llevar estos cultivos a medio líquido y a través de éste obtener dichos embriones somáticos.

Una vez que se logró obtener proembriones somáticos, el siguiente paso fue propiciar su crecimiento, motivo por el cual en ambos medio de cultivo se eliminó el $AgNO_3$ y el 2,4-D, la concentración de sacarosa siguió siendo de 3%, pero ahora se adicionó ABA en una

concentración de 0.5 mg/l, esto se hizo tomando como referencia lo realizado por Close en 1987, quien después de obtener embriones somáticos de maíz, procede a probar varias concentraciones de ABA para propiciar su maduración y la concentración más favorable que encontró fue la que se emplea en este trabajo de tesis.

Aunque solo se trabajó con los callos más compactos y que presentaban las mejores características embriogénicas, la respuesta que dichos cultivos presentaron, no fue el crecimiento de los proembriones sino que se presentó un desarrollo de tejido vascular que bien se podría catalogar como aberrante. Aunque la respuesta no fue 100 % pareja, esta característica de vascularización fue la que más se hizo notar.

Dicha característica se evaluó después de que los callos fueron tratados con GA₃, lo cual permitió definir de manera más clara el efecto de los dos fitorreguladores y esto es porque existieron tratamientos que involucraron a estos dos fitorreguladores, a uno solo o bien a ninguno de los dos. Así entonces al evaluar el desarrollo de tejido vascular, se define que los callos que no fueron tratados con ABA presentan menos vascularización, tal es el caso del primer grupo (cuadro 12) sin embargo, cuando el cultivo ha pasado por un tratamiento que no lleva ABA y posteriormente se somete a un tratamiento en el que el único fitorregulador que se adiciona es GA₃ el desarrollo de tejido vascular se manifiesta en más del 70 % de los callos, esta cifra cataloga al tratamiento como el que más induce vascularización. Cabe mencionar que el tratamiento con GA₃ se realizó con la finalidad de propiciar la maduración de los embriones somáticos. En los otros dos tratamientos (c/ABA y c/GA₃,

c/ABA y s/GAs) se obtiene también que más de un 50 % de los cultivos presentan vascularización, pero estos porcentajes no logran alcanzar al que presenta el grupo 2.

Lo que se interpreta de esta respuesta es que no fue el momento adecuado en el desarrollo de los embriones somáticos para tratarlos con estos dos fitorreguladores, ya que en ninguno de los casos se llegó a obtener la respuesta esperada (crecimiento y maduración del embrión somático). Esto implica que es necesario definir claramente el momento y la concentración adecuada de dichos fitorreguladores, que lleven a mejorar realmente el proceso de embriogénesis somática en los cultivos de estas tres variedades de maíz.

Muy aparte de la vascularización, cuando los cultivos se trataron con GAs, se observó un cambio en la consistencia del callo pasando a ser sumamente bofo, pocos fueron los callos que conservaron su consistencia original (compacta). Esto último es importante de mencionar, ya que tuvo consecuencias muy serias en el momento en que se quiso inducir la germinación de los embrioides. Esto es, cuando se hizo una tercera siembra en cajas petri que contenían medio EMH, a pesar de que solo se colocaron en dicho medio los callos de consistencia compacta, la respuesta (no se evaluó cuantitativamente) fue que no ocurrió germinación alguna, los callos y embrioides tanto en su crecimiento como en su aspecto físico, no presentaron cambio alguno. Además de esto, las consecuencias más serias se presentaron al hacer el análisis histológico debido a que los callos no resistieron el tratamiento de fijación y mucho menos el de deshidratación, motivo por el cual no se llegó a obtener desde el punto de vista histológico muestras

suficientes de todos los cultivos obtenidos al final del experimento.

9.-CONCLUSIONES

- La variedad de raíz que da mejores resultados en cuanto a la capacidad de formación de callo y producción del mismo fue Chalqueño en medio R1 y es por esto que se define como la variedad de mejor rendimiento.
- El medio de cultivo más favorable para el mantenimiento y crecimiento de las variedades Chalqueño y H-135 es el N6z. Ambas variedades siguen el mismo patrón de crecimiento durante todas las resiembras.
- El medio de cultivo más favorable para el mantenimiento y crecimiento de la variedad VS-22 es el R2 ya que en este medio se presenta el mayor crecimiento comparándolo con las otras dos variedades.
- El callo del cual se parte para tener un cultivo embriogénico debe ser compacto, de color opaco, con una pigmentación blanca, de crecimiento lento, estructuralmente complejo y que sea capaz de mantener su potencial de regeneración.
- Una concentración elevada de sacarosa en el medio de cultivo, es muy importante ya que provoca la diferenciación en el callo de regiones con características meristemáticas que más tarde pasan a formar estructuras llamadas proembriones y que finalmente daran origen a un embrión

somático.

-La adición de $AgNO_3$ es importante para el cultivo, ya que provoca que en el callo se reafirme más esa consistencia compacta y por lo tanto sean más evidentes los pequeños proembriones en la superficie del callo.

-El medio de cultivo N6.3 resulta ser más favorable tanto para hacer al callo embriogénico como para la formación de proembriones somáticos.

-En esta etapa de desarrollo de los embriones somáticos, la adición de ABA y GA3 no es conveniente, por lo tanto es necesario definir el momento y además la concentración adecuada de estos fitorreguladores para que se propicie un mejoramiento como tal de este proceso morfogénico en maíz.

-Los cultivos de la variedad VS-22 que fueron colocados desde la inducción de callo hasta el cultivo final en medio N6 y que corresponden al tratamiento II (s/ABA y s/GA3), fueron los únicos en los que se presentó el desarrollo de embriones somáticos, los cuales se identificaron plenamente a través de cortes histológicos.

-De acuerdo con lo obtenido en este trabajo, el evento morfogénico de interés, se desencadena una vez que el callo se colocó en un medio libre de fitorreguladores.

-El análisis histológico de los cultivos es determinante para definir la ocurrencia de un evento morfogénico y de esta forma identificar claramente a los embriones somáticos en un cultivo embriogénico.

-Es necesaria la elaboración de un protocolo de trabajo que permita realizar estudios con más precisión del proceso de embriogénesis somática desde los puntos de vista biológico y bioquímico.

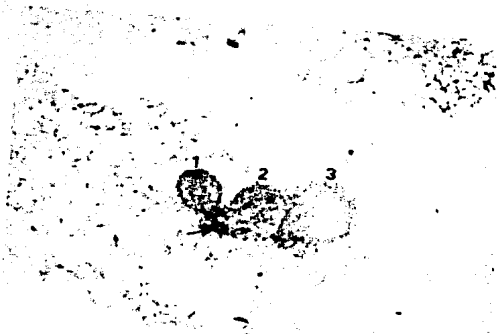
Microfotografía 1.-Embriones somáticos en etapa globular, variedad VS-22, en tres estdíos de desarrollo (10 x).

Microfotografía 2.- Embriones somáticos en un mayor aumento mostrando: Tv = tejido vascular, x = xilema.

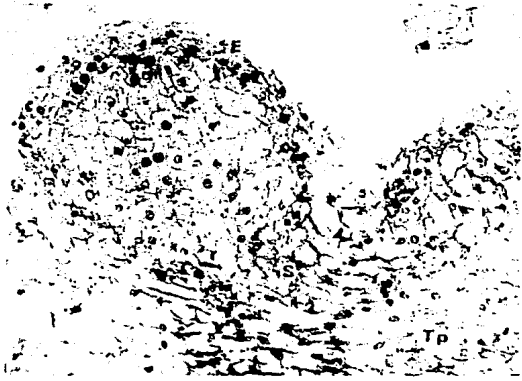
Microfotografía 3 y 4 .- Embrión somático en etapa globular (1), acercamiento (160 x) que permite apreciar con más detalle: E = epidermis, S = suspensor, Tp = tejido parenquimatoso

Microfotografía 5 .-Proembrión somático con un aumento de 160 x, por lo cual se nota claramente: E = epidermis, cm = células con características meristemáticas

Microfotografía 6 .- Embriones somáticos en etapa globular, el aumento al cual se encuentran (40x), permite apreciar : E = epidermis, S=suspensor, Tp= tejido parenquimatoso x = xilema.



3



4





Microfotografía 7.- Muestra un corte longitudinal de una raíz (a) y un embrión somático (b).

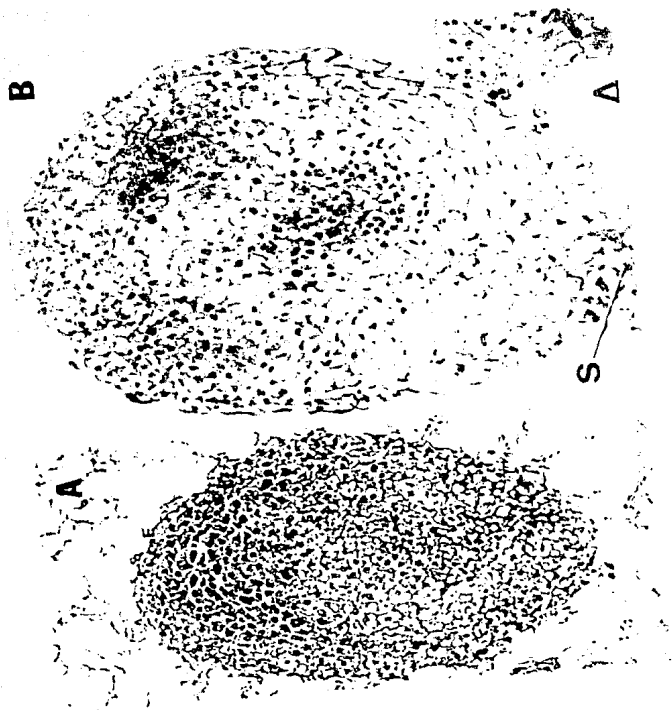
Microfotografía 8.- Corte longitudinal de un embrión somático (b) a mayor aumento (40 x), lo cual permite apreciar: S= suspensor, Tp: tejido parenquimatoso, Tv= tejido vascular.



Microfotografía 9.- Corte longitudinal de un embrión somático y una raíz. En la raíz podemos apreciar: E:epidermis, zm:zona meristemática, ca:caliptra. En el embrión somático se nota claramente:E: epidermis, hv: haz provascular del embrión, Tv: tejido vascular.

Microfotografía 10.- Comparación de cortes histológicos:
(A) Corte longitudinal de un embrión somático obtenido en el experimento.
(B) Corte longitudinal de un embrión somático de bibliografía.

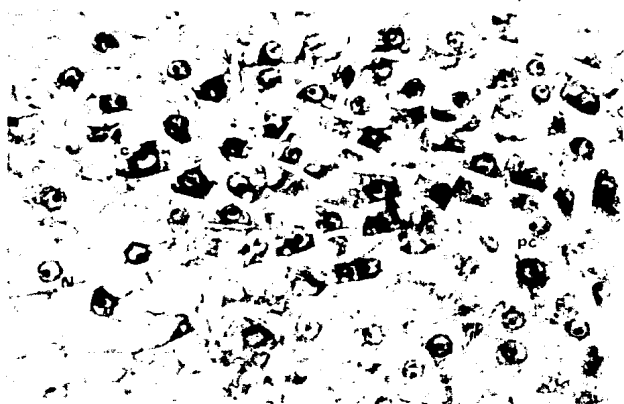




Microfotografía 11.- Células con características meristemáticas, las cuales constituyen a los embriones somáticos obtenidos, el aumento (160 X) permite distinguir: pc=pared celular, c=citoplasma, N=núcleo, n=nucleolo

Microfotografía 12.- Células especializadas formando el tejido vascular, gracias al corte y al aumento se muestra: cx= células del xilema, Lm= lamina media, f= floema, cp= células parenquimatosas, (40 x).

11

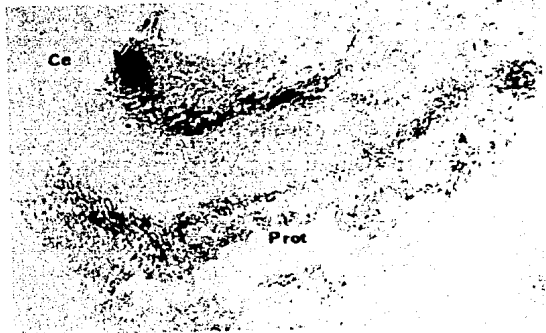


12



Microfotografía 13.—Corte longitudinal de una raíz en el que se puede apreciar claramente cada una de sus partes :co = cofia, ca = caliptra, za= zona meristemática, pd=protodermis, za= zona de alargamiento celular.





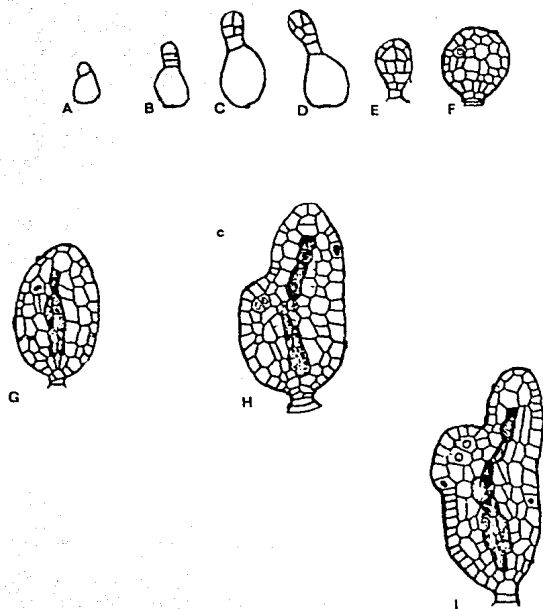


Figura 5. Desarrollo de un embrión cigótico (monocotiledonea)



Globular



Acorazonada



Torpedo

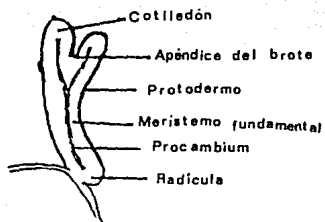


Figura 6. Desarrollo de un embrión somático (dicotiledonea)

A P E N D I C E

variedad	Medio de cultivo	Formación de callo		Formación de raíz		Formación de plántula	
		SI	NO	SI	NO	SI	NO
Chalqueño	R. #	753	192	105	840	347	598
	%	80.0	20.0	11.0	89.0	37.0	63.0
	N6. #	792	138	26	904	252	678
	%	85.0	15.0	3.0	97.0	27.0	73.0
VS-22	R. #	726	235	365	596	572	389
	%	76.0	24.0	38.0	62.0	60.0	40.0
	N6. #	645	321	267	699	380	586
	%	67.0	33.0	28.0	72.0	39.0	61.0
H-135	R. #	767	204	599	372	629	342
	%	79.0	21.0	62.0	38.0	65.0	35.0
	N6. #	698	289	134	853	537	450
	%	71.0	29.3	14.0	86.0	54.0	46.0

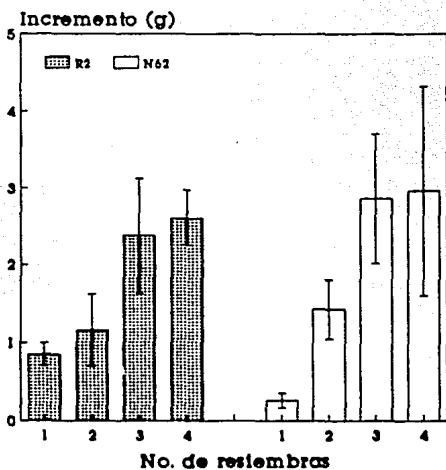
Cuadro / . : Indica los valores de apreciación para la inducción de callo, desarrollo de raíz y de plántula en cada variedad.

Variedad	Chalqueño		VS-22		H-135	
	R*	N6*	R*	N6*	R*	N6*
Medio de cultivo						
Total de embriones	971	940	982	977	983	1002
% de contaminación	2.7	1.1	2.4	1.1	1.2	1.5
# de embriones sanos	945	930	961	966	971	987
Tot. de Callo primario(gr)	0.12	0.08	0.06	0.08	0.09	0.6

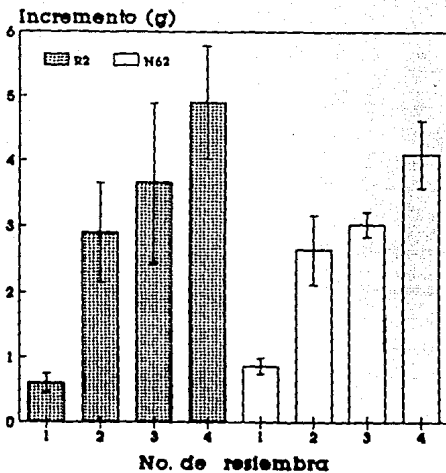
Cuadro 8 . Indica el rendimiento de cada una de las variedades en ambos medios de cultivo. El total de embriones sembrados fue de 5700.

Medio de cultivo	Parámetro	Primera resiembra	Segunda resiembra	Tercera resiembra	Cuarta resiembra
Variedad Chalqueño					
Rz	peso (g)	4.26	8.16	11.92	13.02
	\bar{X}	0.85	1.16	2.38	2.6
	% de incremento	---	91.54	179.8	205.6
	D S	---	0.4592	0.7485	0.3470
N6z	peso (g)	3.93	21.49	42.88	44.51
	\bar{X}	0.26	1.43	2.86	2.96
	% de incremento	---	446.8	991.0	1032.5
	D S	---	0.3787	0.8434	1.3590
Variedad VS-22					
Rz	peso (g)	11.96	41.75	73.08	98.1
	\bar{X}	0.60	2.9	3.66	4.9
	% de incremento	---	249.1	511.0	719.8
	D S	---	0.7520	1.2254	0.8786
N6z	peso (g)	13.02	38.42	45.45	61.3
	\bar{X}	0.87	2.65	3.03	4.1
	% de incremento	---	194.9	249.1	370.8
	D S	---	0.5213	0.1870	0.5212
Variedad H-135					
Rz	peso (g)	15.73	21.39	34.16	43.31
	\bar{X}	0.58	0.79	1.27	1.6
	% de incremento	---	36.0	117.2	175.3
	D S	---	0.2755	0.3856	0.3476
N6z	peso (g)	18.38	49.76	73.95	77.53
	\bar{X}	0.88	2.37	3.5	3.7
	% de incremento	---	170.7	302.3	321.8
	D S	---	0.4900	0.4920	0.2167

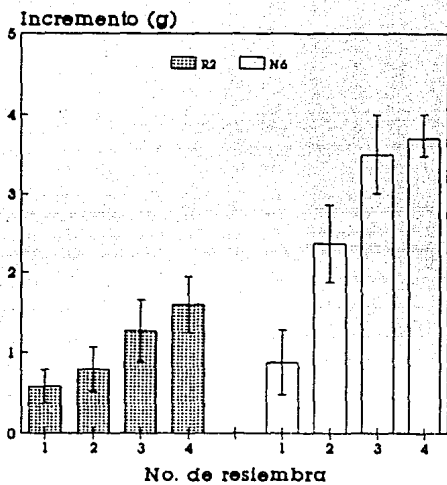
Cuadro 9 . Muestra el incremento en el crecimiento del callo de las tres variedades de maíz, durante cuatro resiembras tanto en medio Rz como en N6z .



GRAFICA I. CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE LA VARIEDAD CHALQUENO



GRAFICA 2. CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE LA VARIEDAD VS-22



GRAFICA 3. CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE LA VARIEDAD H-135

Medio de cultivo	Ro. s	Ro. s	Ro. s	N6o. s	N6o. s
Variedad	CH	VS-22	H-135	VS-22	H-135
# de callos	64	219	173	119	199
Regiones embriogénicas	# 12	112	43	67	98
	% 19	51.0	25.0	56.0	49.0
Raíces	# 3	62	42	27	48
	% 5	28.0	25.0	23.0	24.0
Necrosis	# 5	4	28	0	24
	% 2	2	17	0	12.0
Formas blanquecinas	# 21	102	2	24	39
	% 33.0	47.0	1	20.0	20.0

Cuadro 10. Evaluación del material biológico que se encuentra en la atapa IV, ya que al final de éstase espera la presencia de regiones embriogénicas.

Medio Ro. s					
tot. de callos	Tot. de Proembriones	Proembriones			Necrosis
		tipo 1	tipo 2	tipo 3	
475	240	29	189	22	9
%	100	12.0	79.0	9.0	3.0

Medio N6o. s					
Tot. de callos	Tot. de proembriones	Proembriones			Necrosis
		tipo 1	tipo 2	tipo 3	
533	644	249	324	81	19
%	100	39.0	50.0	13.0	2.9

Cuadro 11 . Evaluación de la cantidad total de proembriones en cada medio de cultivo.

tipo 1: consistencia viscosa y muy hidratado

tipo 2: consistencia friable pero no hidratada

tipo 3: consistencia compacta

Inducción de vascularización							
Sin ABA				Con ABA			
Callos p/caja	Callos c/vasc.	Callos p/caja	Callos c/vasc.	Callos p/caja	Callos c/vasc.	Callos p/caja	Callos c/vasc.
21	10	28	18	44	28	53	37
42	17	20	13	23	9	25	8
13	3	13	6	26	13	43	13
14	10	24	14	10	10	17	9
20	16	23	17	17	8	12	8
20	9	20	14	14	11	19	10
26	10	22	17	17	15	36	19
10	5	38	22	24	11	8	4
27	10	29	15	9	6	27	12
12	11	36	18	21	13	21	10
39	18	18	12	54	26	51	35
28	16	15	14	18	11	11	7
		32	11	23	21	13	9
		22	13	15	8	11	9
		18	9	9	6	27	18
		24	11			20	8
s/ABA y s/GAs		s/ABA y c/GAs		c/ABA y c/GAs		c/ABA y s/GAs	
Tot.							
273	135	382	284	324	196	394	216
%							
100	50.0	100	74.0	100	61.0	100	55.0

Cuadro 12. Evaluación de los callos con vascularización en cajas petri, las cuales contienen medio adicionado de 0.5 mg/l de AGs. Estos callos fueron tratados previamente con ABA (0.1 M).

Tipo de callo	Con ácido giberélico		Sin ácido giberélico	
	total	%	total	%
Bofo	289	37.0	229	38.0
Parcialmente bofo	215	28.0	138	23.0
Compacto	272	35.0	230	39.0
Necrosis	88	11.0	43	7.0
Total de callos	776	100	597	100

Cuadro 13 . Evaluación visual de la apariencia del callo, la cual se realizó tomando en cuenta básicamente la consistencia.

COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO "R" Y "N6"

Compuesto	Constituyentes inorgánicos	
	(mg/l)	
	"R"	"N6"
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440*	166
NH ₄ NO ₃	825*	---
(NH ₄) ₂ SO ₄	---	463*
KNO ₃	950*	2830
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0.025	---
KI	0.83	0.008
KH ₂ PO ₄	170	400
H ₃ PO ₄	6.2	1.6
Na ₂ MoO ₄	0.25	---
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370	185
MnSO ₄ · H ₂ O	22.3	3.3
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8.6	1.5
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.025	---
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27.8	27.8
EDTA · Na ₂	37.2	37.2
Hidrolizado de caseína	200*	---
	Constituyentes orgánicos	
myo-inositol	100	---
Ac. nicotínico	0.5	0.5
Piridoxina-HCl	0.5	0.5
Flamina-HCl	1.0	0.1
Glicina	2.0	2.0

COMPOSICION DEL MEDIO MS

Compuesto	Constituyentes inorganicos (mg/l)
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KI	0.83
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0.025
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6.2
Na ₂ MoO ₄	0.25
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	22.3
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8.6
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27.8
EDTA · Na ₂	37.3
	Constituyentes orgánicos
myo- Inositol	100
Ac. nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	0.1
Glicina	2.0

(MS) Medio basal Murashige-Skoog (1962).

12.-BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1.- Aoyagi, K.(1986). Appearance and accumulation of C-4 carbon pathway enzymes in developing maize leaves and differentiating maize A-188 callus. Plant Physiol 80 (2): 322-333.
- 2.- Apelbaum A., Goldlust A. and Icekson I.(1985). Control by ethylene of arginina decarboxylase activity in Pea seedlings and Its implication for hormonal regulation of plant growth. Plant Physiol 79:635-640.
- 3.- Armstrong, C.L. and Green , E. C. (1985). Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of proline. Planta 164: 207-214
- 4.- Aloni, R.(1987).Differentiation of vascular tissues. Ann. Rev. Plant Physiol. 38:179-204
- 5.- Ammirato, V.P.(1989). Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter,International Association for Plant Tissue Culture. 57(b):2-16
- 6.- Balza , A.M. and Sánchez de J.E. (1989). Effect of the auxin 2-(2-methyl 1 - 4 - clorophenoxy) propionic acid on cell cycle regulation in maize embryonic tissues. Physiol Plant 75:261-266

- 7.- Beckert, M. and Qing, M. C. (1984). Results of a diallel trial and breeding experiment for in vitro aptitude in maize. Theor. Appl. Genet. 68: 247-251
- 8.- Conger, V. B.; Novak, J. F. and Erdosky, K. (1987). Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of Zea mays. Plant Cell Report 6: 345-347
- 9.- Cure, W. W. and Mott, L. R. (1978). A comparative anatomical study of organogenesis in cultured tissues of maize wheat and oats. Physiol Plant. 42: 91-96
- 10.- Close, K. R. and Gallagher, L. (1987). Structure-activity relationships of auxin like plant growth regulators and genetic influences on the culture induction response in maize (Zea mays L.). Plant. Sci. 61: 245-252
- 11.-Carman, G.J. (1990). Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. In Vitro Cell Dev. Biol. 26:746-753
- 12.-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
- 13.-Duncan, R. D.; Williams, M.E.; Zehr, B.E. and Widholm, J.M. (1985). The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous Zea mays

genotypes. *Planta* 165:322-331

- 14.-Duncan, R. D. and Widholm, M. J. (1987). Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerable maize callus. *Plant Physiol.* 83: 703-708
- 15.-Duncan, R. D. and Widholm, J. M. (1988). Improved plant regeneration from maize callus cultures using 6-benzylaminopurine. *Plant Cell Rep.* 7:452-455
- 16.-Duncan, R. D. and Widholm, J. M. (1989). Differential response to potassium permanganate of regenerable tissue cell walls from maize callus cultures. *Plant Sci.* 61 (1):91-103
- 17.-Dahlgren, R.M.T.; Clifford, H.T. and Yeo, P.F. (1985). The families of the monocotyledons *Springer-Verlag*. New York. pp 520
- 18.-Esau, K. (1972). *Anatomía vegetal*. Segunda edición. Ed. Omega, S.A. Barcelona España. pp.779 ISBN B.49871-1971
- 19.-Everett, N.P.; Wach, M.J. and Ashworth, D.J. (1985). Biochemical markers of embryogenesis in tissue cultures of the maize inbred B73. *Plant Sci.* 41: 133-140
- 20.-Edelsten, L. (1982). A molecular switching mechanism in differentiation induction of polarity in cambial cells. *Differentiation* 23:1-9

- 21.-Felker, C.F.;Miernik, A.J. and Crawford, G.C. (1989). Characterization of maize endosperm-derived suspension cells throughout the culture cycle and enhancement on tissue friability. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 18:153-165
- 22.-Fujita, y. and Tabata, M. (1987). Secondary metabolites from plant cells, pharmaceutical applications and progress in commercial production. *Proc. of the VI th Int. Cong. on Plant Tissue and Cell Culture*. Univ. Minnesota. Green, E.C.; Somers, D.A.; Hackt, W.P. and Biesboer, D.D. (eds) pp 169-185
- 23.-Green, E.C.; Phillips, L.R. and Kleese, A.R. (1974). Tissue culture of maize (Zea mays L.), initiation, maintenance and organic growth factors. *Crop Sci.* 14: 54-58
- 24.-Green, E. C. and Phillips, L. R. (1975). Plant regeneration from tissue culture of maize . *Crop. Sci.* 15:417-421
- 25.-Green, E.C.;Phillips, L.R. and Wang, S.A. (1977). Cytological analysis of plant regenerated from maize tissue cultures. *Maize Genet. Croop. News Lett.* 51:53-54
- 26.-Green, E.C. (1982). Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of Zea mays L.. in Fujiwara A. (ed.). *Plant Tissue Culture 1982. Proc. 5th Intl. Cong.. Plant Tissue & Cell Culture*. IAPTC Tokyo. pp 107-108
- 27.-Gresshoff, M.P. and Doy, H.C. (1973). Zea mays : Methods for

doploid callus culture and the subsequent differentiation of various plant structures. Aust. J. Biol. Sci. 26:505-508

- 28.-Gautheret, R.J. (1982). Plant tissue culture: The history. In: Fujiwara, A. (ed.). Plant Tissue Culture 1982. Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. IAPTC. Tokyo. pp 7-12
- 29.-Gautheret, R.J. (1985). History of plant tissue and cell culture: A personal account. In: Vasil, K.I. (ed.). Cell Culture and Somatic Cell Genetics of plants. Vol. 2 Academic Press, New York. pp 1-59
- 30.-Goldberg, B.R.; Barker, J.S. and Grau, P.L. (1989). Regulation of gene expression during plant embryogenesis. Cell. 56:149-160
- 31.-Gordon, J.W.; Spencer, T.M.; Mangano, L.M.; Adams, R.T.; Daines, J.R.; Start, O.W.; O'Brien, V.J.; Chambers, A.S.; Adams, R.W. Willetts, G.N.; Rice, B.T.; Mackey, J.C.; Krueger, W.R.; Kaush, P.A. and Lemaux, G.P.. (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. The Plant Cell. 2:603-618
- 32.-Hendre, R.R. and Mascarenhas, F.A.; Patha, K.M.; Rao, S.B. and Yagannathan, V. (1970). Studies on tissue cultures of maize, wheat, rice and sorghum. (summary). Procc. Biochem. Soc. 27
- 33.-Hatfield, R. and Nevis, D. (1988). Plant cell wall proteins: partial characterization of maize wall proteins with putative

roles in auxin-induced growth. Plant Cell Physiol
29(4):713-720

- 34.-Hernandez, 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. 149 p
- 35.-Johnson, W.J. and Holden, J.D.(1974) Ultrastructure of callus tissue of Zea mays . Can. J. Bot. 52:251-254
- 36.-Kamo, K.K.;Chang,K.L.; Lynn,M.E. and Hodges,T.K. (1987). Embryogenic callus formation from maize protoplast. Planta 72:245-251
- 37.-Kato, Y.T.A. and Mc Clintock, B.(1981). Constitución cromosómica de las razas de maíz en Norte y Centroamérica. In: Mc Clintock, B.; Kato, I.T.A. and Blumenschein A. (eds.) Constitución cromosómica de las razas de maíz. C.P. Chapingo. México pp 9- 110
- 38.-Kamo, K.K.; Bekwar,M.R. and Hodges, T.K.(1985). Regeneration of Zea mays from embryogenic callus. Bot. Gaz. 146:327-334
- 39.-Komamine,A.; Matsumoto,M.; Arihito,F.;Kawahara,R.;Ito,M.;Smit, J.;Nomura,K. and Fujimura, f.(1990). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures physiology, biochemistry and molecularbiology. Nijkamp, H.J.J.;Van, H.W. (eds.) Progress in Plant Cellular and Molecular Biology - Kluwer Academic

- 40.-Lu, C.; Vasil, K.I. and Ozias-Akins, P. (1982). Somatic embryogenesis in Zea mays L.. Theor. Appl. Genet. 62:109-112
- 41.-Lu, C.; Vasil, V. and Vasil, I.K. (1983). Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (Zea mays L.). Theor. Appl. Genet. 66:285-289
- 42.-Lowe, K.S.; Taylor, D.B.; Ryan, P.L. and Peterson, K.P. (1985). Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B73. Plant Sci. 41:125-132
- 43.-La Rue, C. (1947). Growth and regeneration of the endosperm of maize in culture. Amer. J. Bot. 34:585
- 44.-Lee, M; Geadelmann, L.J. and Phillips, L.P. (1988). A genomic evaluation of inbred lines derived from tissue cultures of maize. Theor. Appl. Genet. 75:841-849
- 45.-Miao, S. ; Duncan, R.D. and Widholm, M.J. (1988). Selection of regenerable maize callus cultures resistant to S-methyl- DL tryptophan, 5-2-aminoethyl-L-cysteine and high levels of L-lysine plus L-threonine. Plant Cell. Tissue and Organ Cult. 14:3-14
- 46.-Moustafa, K.R.A.; Duncan, R.D. and Widholm, M.J. (1989). The effect of gamma radiation and N-ethyl-N-nitrosourea on cultured maize callus growth and plant regeneration. Plant Cell. Tissue and

- 47.-Minuth,W.W. (1987). The state of differentiation in cultured cells. Differentiation 36:1
- 48.-Murashige, T. and Skoog, F.(1962). A revised medium from rapid growthand bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- 49.-Martineau,B.(1986) Cell-specific photosynthetic gene-expression in maize determined using cell-separation techniques and hybridization in situ . Plant Physiol 82(2):613-618
- 50.-Mascarenhas,A.F.; Sayaganer,B.M. and Jagannathan,V.(1965). Studies on the growth of callus culture of Zea mays in tissue culture. (C.V. Ramakrishan, ed.) Dr.W. Jonk. The Hague pp 283-292
- 51.-Nadel,L.H.; Altman,A and Ziv,M.(1989). Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 18:181-189
- 52.-Novak,F.J.; Dasralov,S.; Brunner,H.; Nesticky,M.; Afza, R.; Dolezelova,M.; Lucretti,S.; Herichova,A and Hermelin,t. (1988). Somatic embryogenesis in maize and comparison of genetic variability induced by gamma radiation and tissue culture techniques. Plant Breeding 101:66-79

- 53.-Oswald, H.T.; Nicholson, L.R. and Bauman, F.L. (1977). Cell suspension and callus cultura from somatic tissue of maize. *Physiol Plant* 41:45-50
- 54.-Prioli, M.L. and Sondahl, R.M. (1989). Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (Zea mays L.). *Bio/technology* 7:589-594
- 55.-Prioli, M.L. and Sondahl, R.M. (1984). Tissue culture and plant regeneration in diploid perennial teosinte. *Plant Physiol.* 117:185-190
- 56.-Rachl, L.M. and Manzochi, A.L. (1988). Anthocyanin and proteins as biochemical markers in maize endosperm cultures. *Plant Cell.Rep.* 7:78-81
- 57.-Razo, L.A. (1989). Clasificación de las razas de maíz y teocintle anual de México, según información de nudos cromosómicos. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM, México. 68 p
- 58.-Roustan, J.P.; Latche, A. and Fallot, J. (1989). Stimulation of Daucus carota somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and niquel. *Plant Cell. Report.* 8:182-185
- 59.-Ralph, H.W. and Pier, J.P. (1987). Experimental induction of vascular tissues in callus of Angiosperms. *American J. Bot.* 50:418-430

- 60.-Reinert, J. (1977). Plant Cell Tissue and Organ Cultured. Ed. Springer-Verlag. New York. pp 380-399
- 61.-Reinert, J. and Yeoman, M.M. (1982). Plant Cell and Tissue Culture. A laboratory manual. Ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York pp 56-58 ISBN 3-540-07677-8
- 62.-Raymond, D. (1989). Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize. Bio/Technology 7:589-594
- 63.-Radojevic, L. (1985). Tissue culture of maize Zea mays "Cudu"
1. Somatic embryogenesis in the callus tissue. J. Plant Physiol 119:435-441
- 64.-Rodriguez, R.A. (1972). Descripción de la variación morfológica de los maíces de las partes Oriental del Estado de México y la Central del Estado de Puebla. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM, 89 p
- 65.-Rhodes, C.A.; Lowe, K.S. and Roby, K.L. (1988). Plant regeneration from protoplast isolated from embryogenic maize cell cultures. Bio/Technology 6:56-60
- 66.-Shannon, J.C. and Batey, J.W. (1973). Inbred and hybrid effects on establishment on in vitro cultures of Zea mays L. endosperm. Crop. Sci. 13:491-493
- 67.-Sheridan, W.F. (1975). Tissue culture of maize 1. callus

- induction and growth. *Plant Physiol.* 33:151-156
- 68.-Sheridan, W.F. (1977). Tissue Culture of maize: II. Effect of the glutamate, aspartate and aromatic amino acid families on callus growth of several strains. *Physiol Plant* 41:172-174
- 69.-Schek,U.R. and Hildebrandt,C.A. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneus and dicotyledoneus plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204
- 70.-Singletary,W.G. and Below,E.F. (1989). Growth and composition of maize kernels cultured in vitro with varyng supplies of carbon and nitroge. *Plant Physiol* 89:341-346
- 71.-Shininger, L.T. (1979). The control of vascular development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30:313-337
- 72.-Sánchez, J.E. and Albores,M.(1979). Auxinas sintéticas en la inducción de callos de maíz (Zea mays L.).*Agrociencia* 37: 151-160
- 73.-Sánchez, J.E.; Albores,M. and Loyola,V.V.M.(1981). Effect of 2,4-D analoges on the indiction and maintenance of callus in maize tissue culture. *Ann. Appl. Biol.* 98:347-353
- 74.-Sánchez, J.E. ; Yañez,L. and Vargas,M. (1983). Establecimiento de una línea celular de maíz (Zea mays) en cultivos in vitro. Capacidad de rediferenciación. *Agrociencia.* 52:101-113

- 75.-Sánchez, J.E.; Vargas, M.; Aguilar, R. and Jiménez, E. (1988). Age-dependent responsiveness to cell differentiation stimulus in maize callus culture. *Plant Physiol Biochem* 26(6):723-732
- 76.-S.E.P. (1990). Maíz. Manuales para educación agropecuaria. Ed. Trillas. 50 p
- 77.-Sánchez, S.O. (1974). La flora del valle de México. Segunda edición. pp 31-37
- 78.-Street, E.H. (1973). Plant Tissue and Cell Culture. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford Edinburg Melbourne. pp 308-335 ISBN 0 6320 9010 3
- 79.-Songstad, D.D.; Duncan, R.D. and Widholm, M.J. (1988). Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate and norbornadiene in plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Rep.* 7:262-265
- 80.-Straus, J. (1960). Maize endosperm tissue growth in vitro. III Development of a synthetic medium. *Amer. J. Bot.* 47:641-647
- 81.-Swedlund, B. and Lucy, D.R. (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in two-year-old cultures of Zea diploperennis. *Plant Cell Rep.* 7:144-147
- 82.-Smith, L.D.; Krikorian, D.A. (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):1832-1843

83.-Shillito, R.D. (1989). Regeneration of plants from protoplasts of elite inbred maize. Bio/Technol 7(6) :581-587

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

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

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

87.-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

88.-Tamaoki, T. and Ullstrup, J.A. (1958). Cultivation in vitro of excised endosperm and meristem tissues of corn. Boll. Torr. Bot. Club 85(4):260-272

- 89.-Vain, P.;Yean, H.;Flament,P.(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
- 90.-Vasil, I.K.(1982). Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. Plant Tissue Culture Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture I.A.P.T.C. Tokyo. pp 101-104
- 91.-Vasil,V.;Lu,C. Y and Vasil, I.K. (1983). Proliferation and plant regeneration from the nodal region of Zea mays L. (maize gramineae) embryos. Amer. J. Bot. 70(6):951-954
- 92.-Vasil, V.; Vasil,I.K. and Lu, C.Y.(1984) Somatic embryogenesis in long term callus cultures of Zea mays L. (gramineae). Amer. J. Bot. 71:158-161
- 93.-Vasil, V. and Vasil, K.I.(1986). Plant regeneration from friable embryogenesis callus and cell suspension cultures of Zea mays L.
- 94.-Vasil, K.I.(1987). Developing cell and tissue culture system of the improvement of cereal and grass crops. J. Plant Physiol 128:193-218
- 95.-Vasil, K.I. (1988). Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. Bio/Tech. 6:397-402

- 96.-Weier, E.T. (1980). Botánica. Quinta edición. Ed. Limusa
Mexico. 743 p
- 97.-Wang, S.A. (1987). Callus induction and plant regeneration
from maize mature embryos. Plant Cell Rep. 6:360-362
- 98.-Wareing, F.P. and Graham, C.F. (1976). The developmental Biology
of plants and animals. Ed. Saunders. Philadelphia Toronto.
pp 73-91
- 99.-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 ISBN 3-540-07677-8