

GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO *IN VITRO* DE EMBRIONES INMADUROS DE MAÍZ (*ZEAMAYS* L.).

Amelia Capote, Lianne Fernández, Odalys Pérez y Gloria Acuña.
Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT).
e-mail: acapote@inifat.co.cu

RESUMEN

Se estudió el efecto de diferentes reguladores del crecimiento (2,4 D, BAP y KIN) en la germinación y crecimiento de las plántulas provenientes de embriones inmaduros de maíz. Los embriones de maíz cv. P 315 fueron extraídos de granos procedentes de mazorcas en estado lechoso. Como medio basal se empleó las sales minerales de MS suplementado en todos los casos con 1 mg.L⁻¹ de los reguladores empleados y un control sin suplemento hormonal. A los 30 días se evaluó el porcentaje de embriones que desarrollaron plántulas y la altura de las mismas. Para corroborar los resultados obtenidos el medio de mejor respuesta (MS sin suplemento) se utilizó para evaluar el comportamiento de otros genotipos. En todos los casos los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA de clasificación simple y las diferencias determinadas mediante la prueba de Neuman-Keuls al 5%. No se detectaron diferencias en la respuesta varietal por lo que se propone una metodología para la obtención de plantas de maíz a partir del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros.

ABSTRACT

The effect of different growth regulators (2,4-D, BAP and KIN) on germination and plant growth from maize immature embryos (heart step) were studied. The embryos were obtained from kernels of ears cv. P 315. MS medium supplement with 1 mg.L⁻¹ of growth regulators and one control (without hormonal supplement) was used. The percentage of plants formation and height of them were evaluated to 30 days. To confirm the results were evaluated others genotypes. The results were analysed by ANOVA simple classification and the difference detected by Neuman-Keuls test. A methodology to obtain maize plants from *in vitro* culture of immature embryos was established.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) conjuntamente con el arroz y el trigo, es uno de los cereales más importantes en la alimentación humana y animal. En este cultivo, los métodos tradicionales de fitomejoramiento, tales como el uso de introducciones, hibridación y selección han sido exitosos en el desarrollo de nuevas variedades de maíz. Sin embargo; a mediados de los años ochenta se incentivó el uso del cultivo de tejidos en los programas de investigación del maíz, los cuales han contribuido sustancialmente al mejoramiento y liberación temprana de nuevas variedades (Lentini, 2000).

Dentro de las técnicas *in vitro*, el cultivo de embriones se ha utilizado para diferentes propósitos, como estudiar los requerimientos nutricionales de embriones en desarrollo, rescatar embriones híbridos, producir monoploides y superar la latencia de las semillas (Litz, 1991).

En el caso específico del maíz, el cultivo de embriones inmaduros se ha empleado en la obtención de callos embriogénicos (Duncan *et al.*, 1985), la transformación genética (Murry *et al.*, 1989; Ishida *et al.*, 1996) y el rescate de embriones con el objetivo de incrementar la frecuencia de hibridación (Lentini, 2000).

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la germinación y el desarrollo de embriones inmaduros de maíz, con vistas a su utilización en diferentes estudios *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Los granos inmaduros procedentes de mazorcas del cv P 315 cosechadas en condiciones de campo en la Finca "Amalia" ubicada en el Municipio Boyeros, se esterilizaron superficialmente con alcohol (70%) y se sumergieron en una solución de lejía comercial al 2% durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril por tres veces.

En condiciones asépticas se aislaron los embriones inmaduros (estado de corazón) y se sembraron en un medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado en todos los casos con 1 mg.L^{-1} de los siguientes reguladores del crecimiento, ácido 2,4 di-clorofenoxiacético (2,4-D), 6- bencil amino purina (BAP) y 6- furfuril amino purina (KIN) y un control sin suplemento hormonal (Tabla 1).

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para la germinación *in vitro* de embriones inmaduros de maíz.

Tratamientos	Medios de cultivo
I	MS (sin suplemento hormonal)
II	MS + 1 mg.L^{-1} 2,4- dicloro fenoxi acético (2,4-D)
III	MS + 1 mg.L^{-1} 6- bencil amino purina (BAP)
IV	MS + 1 mg.L^{-1} 6- furfuril amino Purina (KIN)

El pH de los medios se ajustó en todos los casos a 5,7 previo a la adición de agar (7 g.L^{-1}) y los mismos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

El cultivo se realizó en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 14 horas luz y una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A los 30 días de cultivo se evaluó el porcentaje de callos formados, el porcentaje de embriones germinados y la altura de las plántulas obtenidas.

Tabla 2. Genotipos utilizados en los estudios de germinación *in vitro* de embriones inmaduros de maíz.

Número	Genotipos
1	P 315
2	P 677
3	P 433
4	P 530
5	P 208
6	P 216

Para corroborar los resultados obtenidos, el medio de mejor respuesta (MS sin suplemento) se utilizó para evaluar el comportamiento de otros genotipos. Para ello se estudiaron diferentes genotipos (Tabla 2) y se evaluaron las variantes antes señaladas.

En todos los casos los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA de clasificación simple y las diferencias significativas determinadas mediante una prueba de Neuman-Keuls 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestra los porcentajes de formación de callos y desarrollo de plántulas en los medios de cultivos estudiados. Se observó que en los medios suplementados con reguladores del crecimiento se obtuvieron altos porcentajes de formación de callos, siendo mayor la respuesta en el medio suplementado con 2,4-D (25%); sin embargo en el medio sin suplemento (control) no se observó la proliferación de callos y el 100% de los embriones cultivados desarrollaron plántulas.

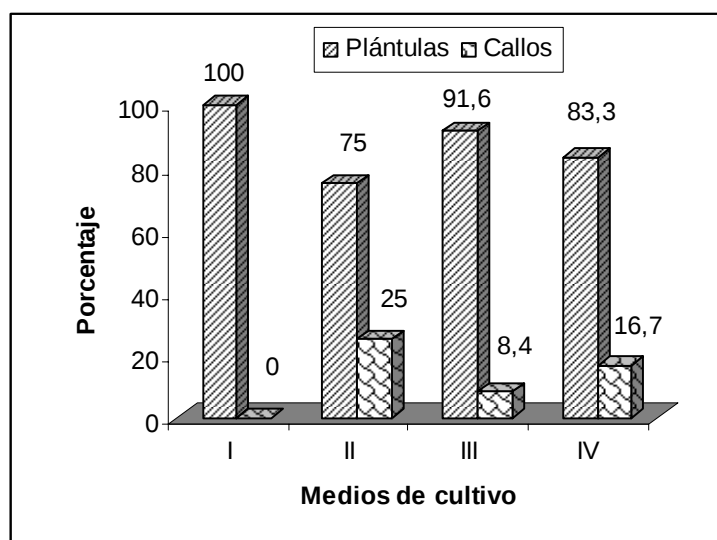


Figura 1. Porcentajes de formación de callos y crecimiento de plántulas a partir de embriones inmaduros de maíz en los medios de cultivo empleados.

Similares resultados fueron obtenidos por Mroginsky *et al.* (1998) al cultivar embriones inmaduros de yerba mate (*Ilex paraguensis* St. Hill) donde se demostró que el empleo de las auxinas disminuyó los porcentajes de germinación produciendo un marcado aumento del número de embriones que produjeron callos.

Para la inducción de callos a partir de un explante dado es necesario, generalmente, incorporar una auxina al medio de cultivo. La más comúnmente empleada para iniciar un cultivo de callos es el 2,4-D en una concentración entre 4,5 – 13,6 μM (1 a 3 mg. L^{-1}). Sin embargo, la presencia de las citoquininas, en el caso de las monocotiledoneas, no es necesaria para la inducción de los callos (George, 1993).

En el caso específico del cultivo del maíz, el 2,4-D (1 mg. L^{-1}) es utilizado como rutina en los medios de iniciación de callos a partir de embriones zigóticos inmaduros en los protocolos para la transformación genética mediante el bombardeo de partículas (<http://www.agro.agri.umn.edu/plant-tc/maize-tc/zembomb.htm>).

En cuanto a la variable altura de las plántulas obtenidas se observan diferencias significativas entre los medios de cultivo empleados (Figura 2). La máxima altura de las plántulas se obtuvo en el medio control (19,2 cm) el cual difiere significativamente del resto de los medios.

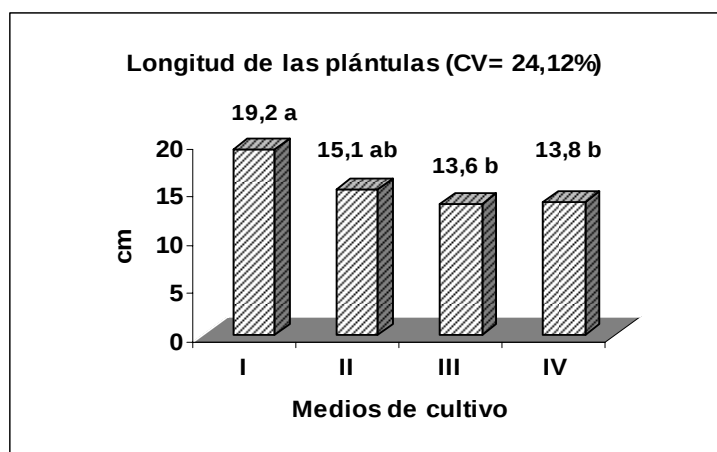


Figura 2. Comportamiento de la variable altura de las plántulas en los diferentes medios de cultivos estudiados.

Al estudiar el efecto de diferentes genotipos en el comportamiento de las variables porcentaje de desarrollo de plántulas en el medio seleccionado (tratamiento I) se observó que el 100% de los embriones cultivados desarrollaron plantas independientemente del genotipo estudiado y la variable altura de las plántulas no mostró diferencias significativas entre ellos (Figura 3)

Los resultados obtenidos permiten concluir que no se detectaron diferencias en la respuesta varietal por lo que se propone una metodología para la obtención de plantas de maíz a partir del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros.

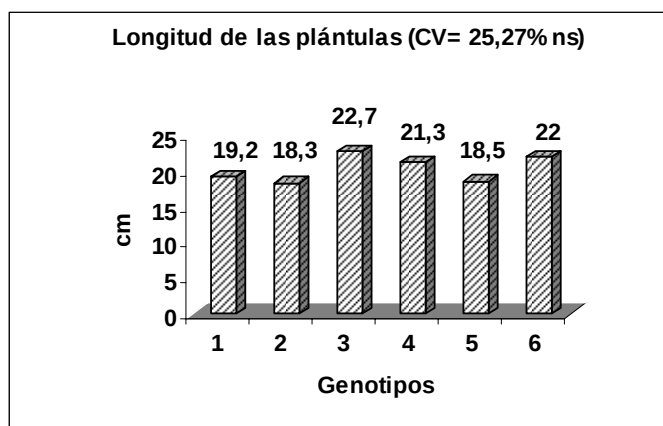


Figura 3. Comportamiento de la variable altura de las plántulas en los diferentes genotipos estudiados.

REFERENCIAS.

- Biolistics particle gun bombardment of maize zygotic embryos.**
<http://www.agro.agri.umn.edu/plant-tc/maize-tc/zembomb.htm>. [Consultado Abril, 1999.]
- Duncan DR, Williams ME, Zehr BE y Widholm JM (1985):** The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *zea mays* genotypes. *Planta*, 165: 322-332.
- George EF (1993):** Capítulo 11. Plant Growth Regulators. En: *Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology*, 2nd Edition. England, 420-479.
- Ishida Y, Saito H, Otha S, Hei Y, Kmari T y Kumashiro T (1996):** High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*, 14 (6): 745- 750.
- Lentini Z (2000):** Mejoramiento genético y biotecnología. Biotecnología en el fitomejoramiento del maíz. En: *El maíz en Venezuela*. Fundación Polar. ISBN 980-379-004-8.
- Litz RE (1991):** Cultivo de embriones y óvulos. En: *Cultivos de tejidos en la Agricultura: Fundamentos Aplicaciones* (WM Roca y LA Mroginski, eds). CIAT, 295 - 312.
- Mroginski LA, Sanberro PA, Rey HY y Collavino MM (1998):** Auxinas y citocininas en la germinación *in vitro* de embriones inmaduros de yerba mate. *Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal*, 1-5 Junio, La Habana, pág. 78.

- Murashige T and Skoog F (1962):** A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473- 497.
- Murray LE, Johnson J y Nichols S (1989):** Transient expression of β -glucoronidase in electrotransformed corn embryos. *Am. J. Bot.*, 77: 151 a.