Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata. Tomo 68. Año 1992 : 15 - 25

La regeneración de plantas de maíz (*Zea mays ssp mays*) a partir del cultivo de tejidos y su aplicación en el mejoramiento genético (*)

M Dina García [1], María del C Molina [2], OH Caso [3]

* Trabajo realizado en el Instituto Fitotécnico de Santa Catalina, Garibaldi 3400, CC 4, 1836 Llavallol, Buenos Aires, Argentina, (FCAF, UNLP).
1 Facultad de Ing. y Cs Agrarias, UNLZ, Becaria del CONICET.
2 Facultad de Cs Agrarias y Forestales, UNLP, Investigadora Adjunta del CONICET.
3 Investigador Principal del CONICET.

Recibido 18 de Mayo de 1992, aceptado 28 de Septiembre de 1992.

RESUMEN

En el cultivo *in vitro* de maíz se ha observado que el genotipo, el medio nutritivo y el explanto determinan la capacidad de regeneración de los tejidos y que las plantas obtenidas presentan distintos grados de anormalidades. En este trabajo se evalúan la capacidad de regeneración de dos cultivares de maíz y las alteraciones fenotípicas y cromosómicas de las plantas regeneradas.

Los cultivos se iniciaron a partir de embriones de 1 mm y de 0,15-0,25 mm de longitud, de los cultivares Colorado Klein y Ever Green, respectivamente. Los primeros se sembraron en el medio N6, con 150 mg/L^{-1} de L-asparagina, 0,5 mg/L^{-1} de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), 12% de sacarosa y 8% de agar y los segundos en un medio compuesto por las sales inorgánicas N6, las vitaminas de Haagen-Smit, 0,25 mg/L^{-1} $MoO_4Na\ 2H_2O$, 0,025 mg/L^{-1} de $Cl_2Co\ 6H_2O$, 0,025 mg/L^{-1} de $SO_4Cu\ 5H_2O$, 1500 mg/L^{-1} de L-asparagina, 5% de sacarosa, 0,8% de agar y tres concentraciones de 2,4-D: 0,05; 0,1 y 0,2 mg/L^{-1}, en combinación o no con 0,05 mg/L^{-1} de Cinetina. El 10% de los embriones del cultivar Colorado Klein originó callos organogénicos que se han mantenido por 5 años con capacidad de regenerar plantas. En el cultivar Ever Green se observó la formación de callos embriogénicos con una frecuencia que varió entre un 37% y un 57%, según el medio utilizado. Estos callos conservaron su capacidad de regeneración por no más de 2 meses. Las anormalidades fenotípicas y cromosómicas aumentaron de un 30% a un 92%, comparando plantas regeneradas a los 12 y 36 meses, respectivamente. El análisis citogenético mostró un cariotipo normal 2n=20 cromosomas en el 30% de las plantas y un cromosoma extra 2n=21 cromosomas en el 70% restante. El 95% de las plantas tenía pequeñas deficiencias o duplicaciones cromosómicas intercalares o terminales.

Palabras claves: *Zea mays*, cultivo de tejidos, organogénesis, embriogénesis somática, alteraciones cromosómicas.

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-05-29 18:40 GMT / http://hdl.handle.net/2027/txu.059172136617550
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

Corn (*Zea mays* ssp *mays*) plant regeneration from tissue culture and its application in genetic improvement.

SUMMARY

It has often been reported that genotype, culture medium and explant determine regeneration capacity of maize tissues in culture and that regenerated plants show different degrees of abnormalities. This research aims at evaluating in vitro regeneration capacity of two maize cultivars, as well as the frequency and kind of phenotypic and chromosomal aberrations of regenerated plants.

Cultures were initiated from 1 mm and 0.15-0.25 mm long embryos of the maize cultivars Colorado Klein and Ever Green, respectively. The former were plated on N6 medium supplemented with 150 mg/L^{-1} L-asparagine, 0.5 mg/L^{-1} 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), 12% sucrose and 8% agar. The latter were plated on N6 medium inorganic salts, Haagen-Smit medium vitamins, 0.25 mg/L^{-1} $NaMoO_4$ $2H_2O$, 0.025 mg/L^{-1} $CoCl_2$ $6H_2O$, 0.025 mg/L^{-1} $CuSo_4$ $5H_2O$, 1.500 mg/L^{-1} L-asparagine, 5% sucrose, 0.8% agar and three 2,4-D concentrations: 0.05; 0.1 and 0.2 mg/L^{-1}, with or without 0.05 mg/L^{-1} kinetin.

Plant regeneration occurred by organogenesis in Colorado Klein corn and by somatic embryogenesis in Ever Green. Frequency of organogenic callus was 10%. Regenerating cultures have been maintained over 5 years. Frequency of embryogenic callus was from 37% to 57% according to the media. These calli regenerated plants in no longer than 2 months. Phenotypic and chromosomal abnormalities increased from 30% to 92% comparing plants regenerated after 12 and 36 months, respectively. Cytogenetic analysis showed normal cariotype 2n=20 chromosomes in 30% of plants and 2n=21 chromosomes in the remainder 70%. Little intercalary or terminal chromosomal deficiencies or duplications were observed in 95% of the plants.

Key words: *Zea mays*, tissue culture, organogenesis, somatic embryogenesis, chromosomal alterations.

INTRODUCCION

Las aplicaciones del cultivo de tejidos y células son numerosas, entre ellas podemos destacar la micropropagación, la selección de resistencia a nivel de callo, la obtención de haploides, la obtención de híbridos interespecíficos e intergenéricos y la recuperación de plantas completas a partir de células o protoplastos transformados genéticamente. La regeneración de plantas de estos cultivos es fundamental para el uso eficiente de esta tecnología.

La regeneración de plantas de maíz (*Zea mays* ssp *mays*) a partir del cultivo de tejidos fue descripta por primera vez por Green y Phillips en 1975. En 1979, Springer *et al* demostraron que la regeneración había ocurrido por organogénesis y en 1982, Lu *et al* y Green encontraron que también podía ocurrir por embriogénesis somática. Sin embargo, la respuesta del cultivo de tejidos del maíz está muy influída por el genotipo (Tomes y *Smith*, 1985) ya que la mayor parte de los resultados se han obtenido con ciertas *líneas*, fundamentalmente la línea comercial "A188" (Freeling *et al*, 1976, Kamo *et al*, 1985, Lu *et al*, 1982). En cambio, otras líneas comerciales de importancia, por ejemplo la "B-73" y la "A-632" han dado una respuesta baja o nula en lo que se refiere a la regeneración de plantas (Fransz y Schel, 1987, Duncan *et al*, 1985).

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-05-29 18:40 GMT / http://hdl.handle.net/2027/uva.0591721306617550
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

Los otros factores a tener en cuenta en la iniciación de los cultivos organogénicos o embriogénicos son el explanto, su estado fisiológico y el medio de cultivo.

Un hecho importante a tener en consideración es la inestabilidad cromosómica producida en las plantas por el cultivo de tejidos, lo cual está ampliamente documentado. El medio de cultivo utilizado, el explanto, el genotipo y la edad de los cultivos influyen en la ocurrencia de aberrraciones cromosómicas (D'Amato, 1978, Mc Coy y Phillips, 1982). Los tipos de alteraciones que se han detectado más frecuentemente son cambios en el número cromosómico (euploides y aneuploides) y, con menor frecuencia, han ocurrido cambios estructurales. Murata y Orton (1983) en el estudio del cariotipo de 40 células obtenidas de una suspensión celular, detectaron que 24 de ellas tenían cambios en el número cromosómico y el 100% cambios estructurales en sus cromosomas.

En el análisis de la meiosis de las plantas de maíz obtenidas a partir del cultivo de tejidos, Green *et al*, (1977) y Mc Coy y Phillips (1982) encontraron una frecuencia de anormalidades de 2 en 43 y 5 en 124, respectivamente. Benzion (1984) observó anormalidades de 36 en 370, dependiendo del genotipo analizado. En contraste con estos resultados, Rhodes *et al* (1986) hallaron una frecuencia de anormalidades de 119 en 257 en plantas de maíz obtenidas del cultivo de tejidos.

Lee y Phillips (1987) observaron que las plantas regeneradas a partir de cultivo de tejidos de 3 ó 4 meses de edad no presentaban anormalidades cromosómicas, mientras que las logradas de cultivos de 8 ó 9 meses las tenían con una frecuencia de 91 en 189. El 96% de las plantas con aberraciones tenía cambios en la estructura cromosómica, el 42% intercambios cromosómicos, el 42% deficiencias y el 19% apareamiento heteromórfico, con la particularidad que en el 51% de los intercambios estaba involucrado el cromosoma 6 (nucleolar).

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Evaluar la capacidad de regeneración por organogénesis y embriogénesis somática de los cultivares de maíz Ever Green y Colorado Klein. 2) Analizar la frecuencia y tipo de alteraciones cromosómicas observadas en las plantas regeneradas.

MATERIALES Y METODOS

Organogénesis

- Material vegetal. Embriones inmaduros de aproximadamente 1 mm de longitud (11 días después de la polinización) de *Z. mays* ssp *mays* cv Colorado Klein.
- Medios de cultivo:

* Iniciación. Sales minerales y vitaminas del medio N6 (Chu, 1978), 150 mg/L^{-1} de L-asparagina, 0,5 mg/L^{-1} de 2,4-D, 12% de sacarosa, 0,8 % de agar, pH 5,8.
* Mantenimiento. Igual composición que el medio de iniciación, pero con 2% de sacarosa y 1 mg/L^{-1} de 2,4-D.
* Regeneración y enraizamiento. Igual composición que el medio de iniciación, pero con 5% de sacarosa, sin 2,4-D y con 0,1 mg/L^{-1} de Picloram.

- Iniciación del cultivo. Los embriones con el escutelo intacto se sembraron con el eje embrionario en contacto con el medio de cultivo y se incubaron en la oscuridad a 30-32° C durante 15 días.
- Mantenimiento. Los cultivos se mantuvieron con un fotoperíodo de 16 h (I=2500Lx) con períodos de cultivo de 30 días. En cada subcultivo se eliminó todo el material que asemejara hojas o raíces.
- Regeneración y enraizamiento. Luego de 7 meses de la iniciación del cultivo, una parte de

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-05-29 18:40 GMT / http://hdl.handle.net/2027/uiu.059172136017550
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

los callos se transfirió al medio de regeneración y enraizamiento, y se incubó con iguales condiciones de temperatura y fotoperíodo. Los callos que no regeneraron plantas se descartaron.

- Conducción de las plantas hasta la madurez. Las plantas ya enraizadas in vitro se transfirieron a macetas con una mezcla de tierra y arena (2:1) esterilizadas en autoclave (1 h a 0,1 MPa) y se pulverizaron con una solución de Benomyl (1 g/L). Las macetas se llevaron a un invernadero y se mantuvieron bajo cubiertas individuales de polietileno durante una semana. Luego de 15 días se trasplantaron al suelo dentro del invernadero.

Embriogénesis somática

- Material vegetal. Embriones inmaduros de *Z. mays* ssp *mays* cv. Ever Green de 0,15 a 0,25 mm de longitud (sin contar el suspensor) aislados del cariopsis entre los 7 y 9 días después de la polinización.

- Medio de cultivo: Sales minerales del medio N6 (Chu, 1978), 0,25 mg/L^{-1} de $MoO_4Na\,2H_2O$, 0,025 mg/L^{-1} de $SO_4Cu\,5H_2O$, 0,025 mg/L^{-1} de $Cl_2Co\,6H_2O$, las vitaminas del medio de Haagen-Smit (1945), 1500 mg/L^{-1} de L-Asparagina, 5% de sacarosa, 0,8% de agar y diferentes combinaciones de 2,4-D y Cinetina (Tabla 1).

Tabla 1: Reguladores del crecimiento vegetal agregados al medio de cultivo para la siembra de los embriones de 0,15-0,25 mm de longitud de *Z. mays* ssp *mays* cv Ever Green.

Culture media plant growth regulators used for plating 0.15-0.25 mm long embryos of *Z mays* ssp *mays* cv Ever Green.

Reguladores de crecimiento (mg/L)	Cinetina 0,05	Sin Cinetina
2,4-D 0,05	A	D
2,4-D 0,1	B	E
2,4-D 0,2	C	F

- Iniciación del cultivo. Los embriones se sembraron con el escutelo y el suspensor intactos y se incubaron desde el principio con un fotoperíodo de 16, a 28-30 ºC. Se calculó la frecuencia de embriogénesis somática (FE) mediante la fórmula:

$$FE = \frac{\text{Nº de embriones que originó emb. somáticos}}{\text{Total de embriones sembrados en cada medio}} \times 100$$

Citogenética

Para el estudio de la meiosis se fijaron panojas jóvenes en ácido acético-alcohol absoluto (1:3). Las preparaciones se hicieron por aplastamiento de las anteras en hematoxilina acética al 2%.

RESULTADOS

Organogénesis

Los embriones colocados con el escutelo hacia arriba germinaron dentro de los 3 días posteriores a la siembra, pero no continuaron su desarrollo normal. Aproximadamente 5 días después se formó un callo blanco o amarillo pálido a partir del escutelo.

Los callos se tornaron parcialmente verdes cuando se los transfirió al medio de mantenimiento con un fotoperíodo de 16 h. A partir de las zonas verdes se observó la formación de meristemas caulinares que originaron vástagos o estructuras similares a hojas enruladas, las cuales proliferaron en mayor medida cerca del período de transferencia a medio fresco (Fig. 1a). También se originaron raíces adventicias, en algunos casos éstas se formaron en la base de los vástagos.

Los meristemas caulinares o vástagos obtenidos en el medio de mantenimiento dieron origen a plantas cuando se los transfirió al medio de regeneración y enraizamiento.

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-05-29 18:40 GMT / http://hdl.handle.net/2027/txu.059172186617550
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

El 10% de los embriones sembrados dió origen a callos a partir de los cuales se formaron plantas. Solamente uno de estos embriones dió callos que aún conservan su capacidad de regeneración luego de 50 meses en cultivo. De este embrión se obutvieron hasta el presente aproximadamente 200 plantas por organogénesis.

Embriogénesis somática

La obtención de plantas mediante la germinación normal de los embriones fue nula. En algunos de ellos se observó solamente el crecimiento de la raíz y, en otros, la formación de un callo translúcido y blando (originado a partir de la raíz) del cual sólo se originaron raíces o murió luego de un tiempo. El número de embriones que no mostró crecimiento de ningún tipo fue reducido (Tabla 2).

Tabla 2: Porcentaje de embriones de *Z. mays* ssp *mays* cv Ever Green que no regeneraron plantas, en los diferentes medios de iniciacion.

Percent of non regenerating *Z. mays* ssp *mays* cv Ever Green embryos, on different initiation media.

Medio	% de embriones que no crecieron	% de embriones que originó raíces o callos radicales
A	0	41,20
B	21,05	21,06
C	6,25	43,75
D	6,66	40,00
E	13,33	33,33
F	14,28	66,66

En el resto de los embriones se produjo un crecimiento del escutelo, compacto y de color blanco. Al principio se observó una superficie lisa, entre los 4 y 7 días de cultivo fue tomando apariencia de crestas. También se observó la formación de un callo blando, derivado de la radícula embebida en el medio. A partir de los 7 días después de la siembra comenzaron a notarse unas estructuras también blancas (en muy pocos casos verdes) similares al escutelo de los embriones cigóticos (Fig. 1b). De estas estructuras emergieron los coleóptilos, de color verde.

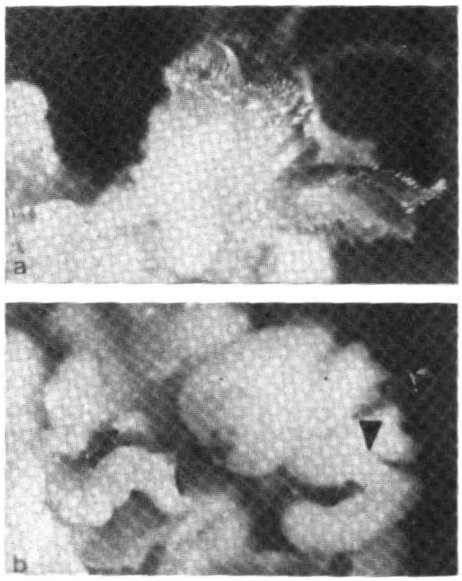

Figura 1 : Cultivo de tejidos de *Z. mays* ssp *mays* con capacidad de regenerar plantas. **a**- Callo organogénico de 32 meses de edad originado de un embrión de 1 mm de longitud del cultivar Colorado Klein en un medio con 0,5 mg/L^{-1} de 2,4-D y mantenido en un medio con 1 mg/L^{-1} de 2,4-D. Se observa el comienzo del desarrollo de un vástago. **b**- Callo embriogénico obtenido a partir del escutelo de un embrión de 0,25 mm de longitud del cultivar Ever Green, luego de 1 mes de la siembra en un medio con 0,1 mg/L^{-1} de 2,4-D. La flecha señala un embrión somático.

Regenerating *Z. mays* ssp *mays* tissue culture. **a**- Early shoot development on 32 months old organogenic callus arised from 1 mm long Colorado Klein cultivar embryo on medium with 0,5 mg/L^{-1} 2,4-D and maintained on medium with 1 mg/L^{-1} 2,4-D. **b**- Scutellum/embryogenic callus one month after 0,25 mm long Ever Green cultivar embryo was plated on medium with 0,1 mg/L^{-1} 2,4-D. Arrow designates one somatic embryo.

El mayor porcentaje de embriogénesis somática se obtuvo en el medio que contenía 0,05 mg/L^{-1} de 2,4-D + 0,05 mg/L^{-1} de Cinetina,

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-05-29 18:40 GMT / http://hdl.handle.net/2027/uiu.059172126617550
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

pero frecuencias similares se observaron con 0,1 mg/L^{-1} de 2,4-D, en combinación o no con 0,05 mg/L^{-1} de Cinetina (Fig. 2).

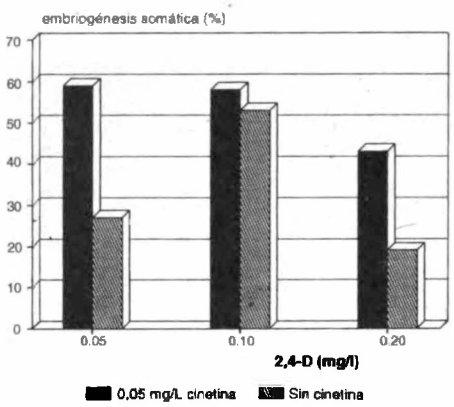

Figura 2: Frecuencia de embriogénesis somática obtenida a partir de embriones de *Z. mays* ssp *mays* cv Ever Green de 0,15-0,25 mm de longitud, sembrados en medios con diferentes concentraciones de 2,4-D y Cinetina.

Frequency of somatic embryogenesis obtained from *Z. mays* ssp *mays* cv Ever Green 0,15-0,25 mm long embryos cultured on media with different 2,4-D and Kinetin concentrations.

Estudio genético

En el análisis citogenético de las plantas obtenidas por organogénesis, luego de 17 meses de iniciado el cultivo a partir de un embrión de maíz Colorado Klein, se encontró que un 70% tenía fenotipo y cariotipo normal 2n=20, un 10% un cromosoma extra 2n=21, un 10% tres cromosomas extras 2n=23 y un 10% de plantas con 2n=40.

Las 38 plantas regeneradas luego de 32 meses de la iniciación del cultivo, mostraron los siguientes fenotipos:

a- Plantas normales, variando con respecto al testigo solamente en la altura de inserción de la espiga (Fig. 3a).

b- Plantas de aproximadamente 1 m de altura con tallos ramificados y abundantes hojas, con tres o cuatro espigas insertas en diferentes partes del tallo y en su mayoría estériles (Fig. 3b).

c- Plantas de 35 a 40 cm, entrenudos muy cortos, elevadísimo número de hojas, macolladoras, espigas pequeñas e insertas a 20 ó 30 cm al igual que la panoja. Las características fenotípicas de estas plantas son similares a las producidas por el gen mutante Shrunken (Fig. 3c).

d- Plantas de 15 a 30 cm, con tallos muy pequeños o sin ellos, las hojas delgadas, enruladas desde el suelo, las espigas muy pequeñas como las panojas y estériles. Las características fenotípicas de estas plantas son similares a las producidas por el gen mutante dwarf 1 (Fig. 3d).

Del análisis de estos resultados (Fig. 4) se puede inferir que sólo un 8% de las plantas tuvo fenotipo normal y un 92% anormalidades fenotípicas con aparición de nuevos caracteres que no se observan en sus progenitores.

En el estudio citológico de estas plantas se halló un 30% con cariotipo normal 2n=20 cromosomas (Fig. 5a). El 70% restante tenía un cromosoma extra, o sea 2n=21 (Fig. 5b), pero no pudo determinarse que cromosoma es ni tampoco su origen, ya que durante la meiosis nunca se lo observó apareado en forma total ni parcial con ninguno de los otros 10 pares cromosómicos (Fig. 5 c).

En el estudio meiótico, el 95% de las plantas mostró pequeñas deficiencias o duplicaciones intercalares o terminales (Fig. 5d).

Las alteraciones cromosómicas observadas no se correlacionaron con la variabilidad de las anormalidades halladas en las plantas, ni con la aparición de nuevos caracteres que no tenían sus progenitores, como por ej. Dwarf 1 y Shrunken, alta susceptibilidad a carbón (*Helmintosporium maydis*), tallo ramificado,

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-05-29 18:40 GMT / http://hdl.handle.net/2027/uiu.059172126017550
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

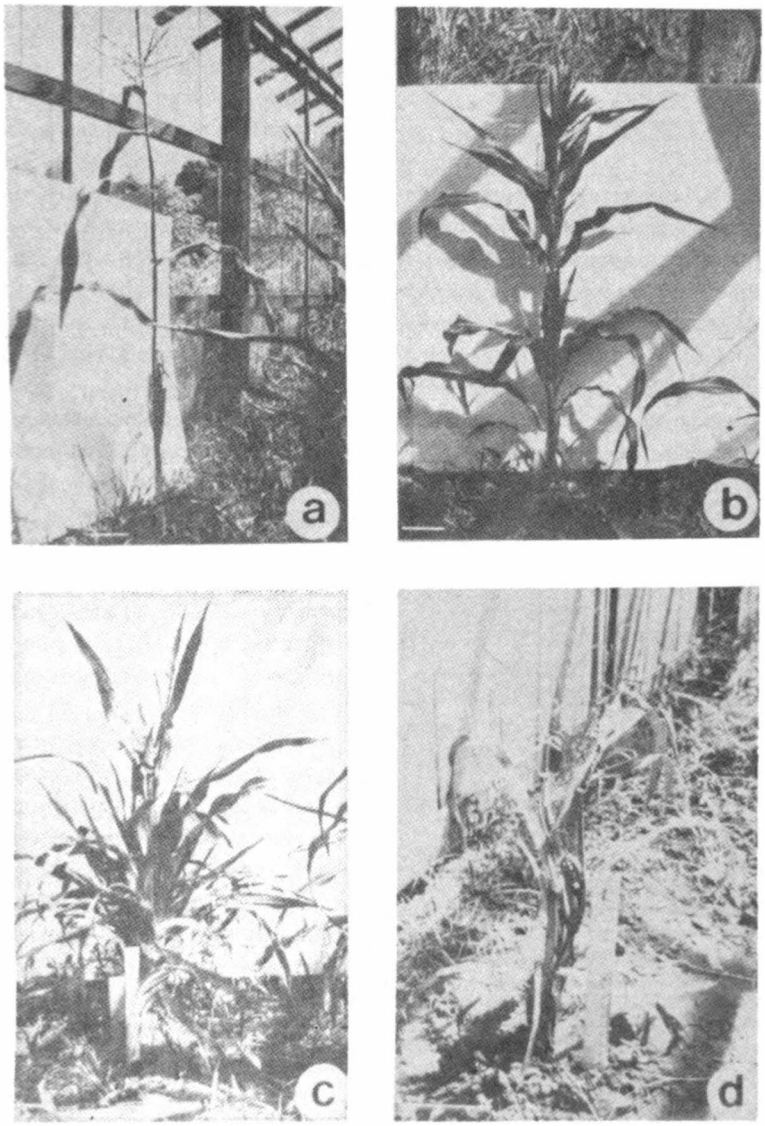

Figura 3: Plantas regeneradas de callos organogénicos de 32 meses de edad, originados de un embrión de 1 mm de longitud de *Z. mays* ssp *mays* cv Colorado Klein en un medio con 0,5 mg/L^{-1} de 2,4-D y mantenidos en medios con 1 mg/L^{-1} de 2,4-D. a- Planta normal. b- Planta de 1 m de altura con abundantes hojas y 3 espigas. c- Planta de 35 a 40 cm de altura, con entrenudos muy cortos, varios macollos y espigas pequeñas. d- Planta de 20 cm de altura, con hojas delgadas y enruladas, espigas muy pequeñas. Barra = 10 cm.

Plants regenerated from 32 months old organogenic calli arised from 1 mm long *Z. mays* ssp *mays* cv Colorado Klein embryo on medium with 0,5 mg/L^{-1} 2,4-D and maintained on media with 1 mg/L^{-1} 2,4-D. a- Normal plant. b- Plant of 1 m height supporting many leaves and 3 ears. c- Plant of 0.35-0.40 m height with very short internodes, many tillers and small ears. d- Plant of 0.20 m height with narrow and wrinkled leaves and very small ears. Bar = 10 cm.

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-05-29 18:40 GMT / http://hdl.handle.net/2027/uiu.059172126617550
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

plantas macolladoras, espigas múltiples, precocidad, espigas en la panoja, etc.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el maíz se han realizado varios estudios sobre las condiciones necesarias para el establecimiento de suspensiones celulares, el aislamiento de protoplastos y la formación de callos. El objetivo fundamental de estas investigaciones ha sido la regeneración de plantas, con la posibilidad de aplicar técnicas tales como la microinyección, transformación e hibridación somática (Potrykus *et al*, 1977; Chourey y Zurawsky, 1981; Swanson *et al*, 1985; Imbrie-Milligan y Hodges, 1986; Birnberg *et al*, 1988; Van Lammeren, 1988). Sin embargo, la aplicación de estas técnicas en el maíz se ha visto limitada por la dificultad de ciertos genotipos para regenerar plantas in vitro (Tomes y Smith, 1985, Franz y Schel, 1987, Duncan *et al*, 1985). Recién en el año 1988 se obtuvieron plantas a partir de protoplastos de maíz (Rhodes *et al*, 1988 a) y también se logró la primera planta de maíz transgénica, derivada de protoplastos aislados de una suspensión celular embriogénica de la línea "A188" (Rhodes *et al*, 1988 b).

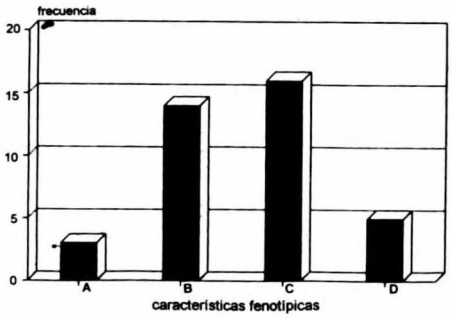

Figura 4: Frecuencia fenotípica de las plantas regeneradas de callos organogénicos de 32 meses de edad iniciados a partir de un embrión de 1mm de longitud de *Z. mays* ssp *mays* cv Colorado Klein y mantenidos en medios con 1 mg/L^{-1} de 2,4-D. **a-** Plantas relativamente normales. **b-** Plantas de 1 m de altura con tallos ramificados, abundantes hojas y 3 ó 4 espigas. **c-** Plantas de 35-40 cm de altura, entrenudos muy cortos, varios macollos y espigas pequeñas. **d-** Plantas de 15-30 cm de altura, con hojas finas y arrugadas y espigas muy pequeñas.

Phenotypic frequency of plants regenerated from 32 months old organogenic callus originated from *Z. mays* ssp *mays* cv Colorado Klein 1 mm long embryos on medium with 0.5 mg/L^{-1} 2,4-D and maintained on media with 1 mg/L^{-1} 2,4-D. **a-** Normal plants. **b-** Plants of 1 m height, with branched stalks supporting many leaves and 3-4 ears. **c-** Plants of 0.35-0.40 m height, very short internodes, many tillers and small ears. **d-** Plants of 0.15-0.30 m height, narrow and wrinkled leaves and very small ears.

Por los motivos expuestos, es evidente la necesidad de conseguir un modelo para la obtención de cultivos con una alta frecuencia de regeneración de plantas, a partir de un mayor número de genotipos de maíz. Estos cultivos serían de gran utilidad como la base de partida para obtener suspensiones celulares embriogénicas, de las cuales sería factible aislar protoplastos con capacidad de regeneración de plantas.

La forma de regeneración observada en este trabajo, a partir del cultivo de embriones inmaduros de *Zea mays* ssp *mays* cv Colorado Klein, concuerda con la descripción de la organogénesis a partir del cultivo de embriones inmaduros de las líneas "Black Mexican Sweet" y " A188" (Van Lammeren, 1988). La frecuencia de inducción del cv. Colorado Klein fue baja (10%). Sin embargo, se lograron callos que aún conservan su capacidad de regeneración luego de 4 años de sucesivos subcultivos, lo cual permite obtener un número elevado de plantas por explanto sembrado.

En el caso de *Z. mays* ssp. *mays* cv. Ever Green no se había logrado regeneración cuando se sembraron los embriones de 1 a 2 mm de longitud en un medio nutritivo con una concentración de 0,5 a 1 mg/L^{-1} de 2,4-D. Por este motivo en este experimento se utilizaron embriones de menor tamaño (0,15 a 0,25 mm

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-05-29 18:40 GMT / http://hdl.handle.net/2027/txu.059172136617550
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

de longitud) y concentraciones de 2,4-D también menores (0,05 a 0,2 mg/L^{-1}) en combinación o no con 0,05 mg/L^{-1} de Cinetina. EL desarrollo mostrado por estos cultivos concuerda con las observaciones de varios autores sobre la embriogénesis somática en la línea " A188" (Vasil *et al*, 1985; Fransz y Schel, 1987, Van Lammeren, 1988).

Los resultados obtenidos (Fig. 2) indican que éste podría ser un método adecuado para iniciar cultivos embriogénicos a partir de los genotipos de maíz que presentan las mayores dificultades en cuanto a la regeneración de plantas in vitro.

Citogenética

Las plantas regeneradas a partir de cultivos organogénicos originados de embriones inmaduros de maíz sembrados en medios nutritivos con 2,4-D, sufrieron un incremento en las anormalidades fenotípicas y cromosómicas de un 30% a un 92%, comparando plantas obtenidas de cultivos de 12 meses y de 3 años, respectivamente. Observaciones semejantes realizaron Green y Phillips (1975); Green *et al* (1977); Edallo *et al* (1981) y Lee y Phillips (1987).

Las alteraciones cromosómicas más frecuentemente observadas en este trabajo fueron pequeñas deficiencias intercalares o terminales (Fig. 5d) y un cromosoma extra o posible cromosoma B (Fig. 5b).

Según otros autores (Benzion, 1984; Green *et al*, 1977; Mc Coy y Phillips, 1982) el cultivo de tejidos induce rupturas cromosómicas e intercambios con otros cromosomas, como consecuencia de las cuales se producen translocaciones simples o recíprocas e inversiones.

Todas estas alteraciones cromosómicas, ya sea deficiencias, duplicaciones, inversiones, translocaciones, fragmentos cromosómicos y aun la presencia de cromosomas extras o cromosomas B, podrían producirse en la zona de replicación tardía de la heterocromatina de las células cultivadas in vitro. Esto provocaría rupturas en distintas partes del cromosoma, con pérdida o reordenamiento del mismo (Rhoades y Dempsey, 1972).

Benzion (1984) al estudiar intercambios independientes entre los cromosomas 7 y 8, observó que en todos los casos la ruptura cromosómica estaba localizada entre la heterocromatina del knob y el centrómero, ambas zonas de replicación tardía. Pryor *et al* (1980) demostraron que la replicación tardía del DNA durante el período de síntesis de la

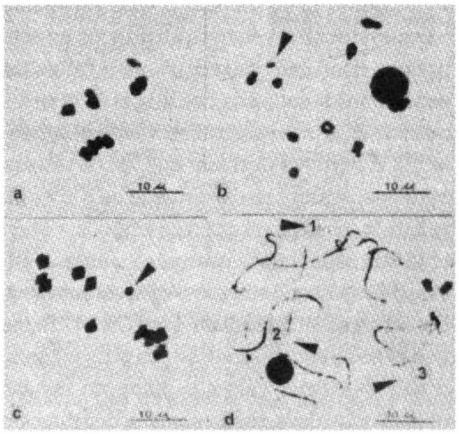

Figura 5: Cromosomas meióticos en plantas regeneradas de callos organogénicos de 32 meses de edad, originados a partir de un embrión de 1 mm de longitud de *Z. mays* ssp *mays* cv Colorado Klein en un medio con 0,5 mg/L^{-1} de 2,4-D y mantenidos en medios con 1 mg/L^{-1} de 2,4-D. **a**- Célula con 10 bivalentes. **b**- Diacinesis con un cromosoma extra (flecha). **c**- Metafase con un cromosoma extra (flecha). **d**- Paquinema con un cromosoma extra (1) y deficiencias (2-3). Todas con igual aumento.

Meiotic chromosomes in plants regenerated from 32 months old organogenic callus arised from *Z. mays* ssp *mays* cv Colorado Klein 1 mm long embryos on medium with 0.5 mg/L^{-1} 2,4-D and maintained on media with 1 mg/L^{-1} 2,4-D. **a**- Cell with 10 bivalents. **b**- Diakinesis with one extra chromosome (arrow). **c**- Methaphase with one extra chromosome. **d**- Pachynema with one extra chromosome (1) and deficiencies (2-3).

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS

célula es lo que da origen a los cromosomas B. Posiblemente este pueda ser el origen del cromosma extra que se observa en el 70% de las células y por este motivo nunca se lo observó apareado.

Lee (1984) realizó el estudio de una progenie de plantas de maíz con el mismo "pool" genético, regeneradas in vitro y encontró una gran segregación fenotípica. El número de variantes por planta regenerada se incrementaba de 0,5 en cultivos de 3-4 meses a 1,3 en cultivos de 8-9 meses. También se observó una alta frecuencia de ruptura cromosómica y un incremento en la aparición de genes recesivos.

Como ya se mencionó, algo semejante ha ocurrido con los cultivos analizados en este trabajo, donde se observó un aumento en las variaciones fenotípicas del 30% al 92% en los cultivos de 9 meses y 3 años, respectivamente. Es importante destacar que, de 38 plantas obtenidas a partir de callos luego de 3 años en cultivo, originados de un único embrión, se han obtenido 38 fenotipos diferentes, con la aparición de un elevado número de genes recesivos, por ejemplo el Shrunken y el Dwarf. Estos genes no se encontraban en sus progenitores, o sea que cada célula o grupo de células originó una nueva planta con una constitución genética diferente.

Lee y Phillips (1987) suponen que la alta frecuencia de rupturas cromosómicas y la aparición de un elevado número de genes recesivos podrían deberse a la acción de elementos transponibles, que serían los responsables de la elevada variabilidad genética producida en las plantas regeneradas. Según este mismo autor, el estrés que se produce en el genoma al cultivarlo in vitro activa elementos que en estado normal se comportan como genes silenciosos.

McClintock (1950), Mazoti (comunicación personal), Newffer (1966) y Doerschug (1973) observaron que en aquellas plantas de maíz que tienen elementos transposables se producen rupturas cromosómicas y, como consecuencia, mutaciones somáticas. Este es un mecanismo natural en algunos genotipos excepcionales de maíz.

Cualesquiera sean los mecanismos que producen la variaciones genéticas dentro del callo cultivado in vitro, es importante destacar que por este medio se puede obtener una fuente de variabilidad, tanto en especies que la poseen naturalmente, por ejemplo maíz o trigo, como en especies tales como la avena o la cebada que prácticamente no la poseen.

BIBLIOGRAFIA

Benzion G (1984) Genetic and cytogenetic analysis of maize cultures: a cell line pedigree analysis. Ph. Dissertation University of Minnesota.

Birnberg PR, DA Somers and ML Brenner (1988) Characterization of conditioning factors that increase colony formation from "Black Mexican Sweet" corn protoplasts. J Plant Physiol 132: 316-321.

Chourey PS and DB Zurawski (1981) Callus formation from proto plasts of a maize cell culture. Theor Appl Genet 59: 334-349.

Chu CC (1978) The N6 medium and its application to another culture of cereal crops. En " Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture". Science Press. Peking 43-50.

D'Amato F (1978) Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plant. En "Frontiers of Plant Tissue". Proceedings of the 4 th International Congress of Plant Cell and Tissue. Canada 287-295.

Doerschug EB (1973) Studies of dotted a regulatory element in maize. I. Induction of dotted by chromosome breaks II. Phase variation of dotted. Theor Appl Genet 43:187-189.

Duncan DR, ME Williams, BE Zehr and JM Widholm

Digitized by Google

Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS

Generated on 2017-05-29 18:40 GMT / http://hdl.handle.net/2027/uiu.059172136617550
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

(1985) The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. Planta 165:322-332.

Edallo S, C Zucchinali, M Perenzin and F Salamini (1981) Chromosomal variation and frequency of spontaneous mutation associated with in vitro culture and plantregeneration in maize. Maydica XXVI: 39-56.

Fransz PF, and JH Schel (1987) An ultrastructural study on early callus development from immature embryos of the maize strains " A188" , " A632". Acta Bot Neerl 36 (3-4) : 247-259.

Freeling M, JC Woodman and DSK Cheng (1976) Developmental potentials of maize tissue cultures. Maydica 21: 97-112.

Green CE and RL Phillips (1975) Plant regeneration from tissue culture of maize. Crop Science 15: 417-421.

Green CE, RL Phillips and AS Wang (1977) Cytological analysis of plants regenerated from maize tissue culture. Maize Genetic Coop Newsletter 51: 53-54.

Green CE (1982) Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays* ssp *mays*. Proc 5th Intl Cong Plant Tissue and Cell Culture 107-108.

Haagen-Smit AJ, R Siu and C Wilson (1945) A method for the culturing of excised immature corn embryos in vitro. Science 101:243.

Imbrie-Milligan CW and Hodges TK (1986) Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. Planta 168: 395-401.

Kamo KK, MR Becwar and TK Hodges (1985) Regeneration of *Zea mays* L. from embryogenic callus. Bot Gaz 146 (3): 327-334.

Lee M (1984) Cytogenetic analysis and progeny evaluation of maize (*Zea mays* L.) plants regenerated from organogenic callus cultures. M S thesis, University of Minnesota.

Lee M and RL Phillips (1987) Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. Genome 29: 122-128

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

Mc Clintock B (1950) The origin of mutable loci in maize. Proc Natl Acad Sci USA 36: 344-355.

Mc Coy TL and RL Phillips (1982) Chromosome stability in maize (*Zea mays* L.) tissue culture and sectoring in some regenerated plants. Can J Genetic Cytol 24: 559-565.

Murata M and TJ Orton (1983) Chromosomal structural changes in cultured celery cells. In Vitro 19: 83-89.

Newffer MG (1966) Stability of the suppressor element in two mutator systems of the A-locus in maize. Genetics 53: 541-549.

Potrykus I, CT Harms, H Lorz and E Thomas (1977) Callus formation from stem protoplasts of corn (*Zea mays* L.). Molec Gen Genet 156: 347-350.

Pryor A, M Faulker, M Rhoades and W Peacock (1980) Asynchronous replication of heterochromatin in maize. Proc Natl Acad Sci USA 77: 6705-6709.

Rhoades M and E Dempsey (1972) On the mechanism of chromatin loss induced by the B chromosome of maize. Genetics 71: 73-96.

Rhodes CA, RL Phillips and Green CE (1986) Cytogenetic stability of aneuploid maize tissue culture. Canad J Genet Cytol 28: 374-384.

Rhodes CA, K Lowe and K Ruby (1988a) Biol Technology 6: 56.

Rhodes CA, DA Pierce, IJ Mettler, D Mascarenhas and JJ Detmer (1988b) Genetically transformed maize plants from protoplasts. Science 240: 204-207.

Springer WD, CE Green and KA Kohn (1979) An histological examination of tissue culture initiation from immature embryos of maize. Protoplasma 101: 269-281.

Swanson EB, RSC Wong and RJ Kemble (1985) A novel method for the isolation and purification of protoplasts from friable, embryogenic corn (*Zea mays* L.) callus. Plant Science 40: 137-144.

Tomes DT and OS Smith (1985) The effect of parental genotype on initiation of embryonic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. Theor Appl Genet 70: 505-509.

Van Lammeren AAM (1988) Observations on the structural development on immature maize embryos (*Zea mays* L.) during in vitro culture in the presence or absence of 2,4-D. Acta Bot Neerl 37 (1): 49-61.

Vasil V, C Lu and IK Vasil (1985) Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). Protoplasma 127: 1-8.

Digitized by Google

Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS

Generated on 2017-05-29 18:40 GMT / http://hdl.handle.net/2027/txu.059172136617550
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0