



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

SEMILLAS SINTÉTICAS DE MAÍZ

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA BIOTECNÓLOGA

PRESENTA:
Valdés Blanquet Anai Yidam Natasha

Asesor: Dr. Germán Fernando Gutiérrez Hernández

México, D.F., 23 de Mayo del 2006

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	5
I. ANTECEDENTES.....	6
1.1 Generalidades del maíz (<i>Zea mays L.</i>)	6
1.1.1 Origen y domesticación.....	6
1.1.2 Morfología.....	7
1.1.3 Fisiología.....	8
1.1.4 Importancia del maíz.....	8
1.2 Importancia de las semillas.....	9
1.2.1 Semillas sintéticas.....	9
1.2.2 Tipos de semillas sintéticas.....	11
1.2.3 Importancia de las semillas sintéticas.....	12
1.3 Embriones Somáticos.....	13
1.3.1 Morfogénesis in Vitro.....	13
1.3.2 Totipotencia celular.....	14
1.3.3 Embriogénesis somática.....	14
II. JUSTIFICACIÓN.....	22
III. OBJETIVOS.....	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1 Material Vegetal.....	23
4.2 Cultivo aséptico e inducción de callo.....	23
4.3 Inducción de callo pro-embriogénico y embriogénico.....	25
4.4 Establecimiento del endospermo artificial.....	27
4.5 Elaboración de las semillas sintéticas.....	29
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
5.1 Cultivo aséptico e inducción de callo.....	32
5.2 Establecimiento del endospermo artificial.....	36
5.3 Producción de las semillas sintéticas.....	40
VI. CONCLUSIONES.....	43
VII. RECOMENDACIONES.....	43
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	44
ÁPENDICES.....	45

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Pág.
Cuadro 1. Concentraciones para la desinfección de las semillas.....	24
Cuadro 2. Diferentes concentraciones de las fitohormonas utilizadas en el medio MS.....	26
Cuadro 3. Concentraciones de fitohormonas para el endospermo artificial (benciladenina y ácido giberélico).....	28
Cuadro 4. Resultados de los tratamientos para el cultivo aséptico.....	32
Cuadro 5. Características presentes en los frascos con los STH en diferentes concentraciones de fitohormonas (auxinas), todos los frascos presentaron las mismas características en las diferentes concentraciones.....	35
Cuadro 6. Características físicas de los callos.....	39
Fig. 1 El teosintle y el maíz.....	6
Fig. 2 Semilla de maíz.....	7
Fig. 3 Semilla sintética.....	10
Fig. 4 Tipos de semillas sintéticas.....	12
Fig. 5 Estados del desarrollo embrionario.....	15
Fig. 6 Ácido 2,4 – Diclorofenoxiacético.....	17
Fig. 7 Procedimiento para obtener una semilla sintética.....	29
Fig. 8 Diagrama de la metodología para la producción de semillas sintéticas.....	30
Fig. 9 Tratamientos de desinfección.....	33
Fig. 10 Plántulas de 12 días de edad, germinadas in Vitro en el medio MS.....	34
Fig. 11 Explantes oxidados 4 semanas después de la siembra.....	35
Fig. 12 Plántulas que se obtuvieron de embriones sexuales.....	36
Fig. 13 Plántulas sin desarrollo de radículas.....	37
Fig. 14 Frasco sin fitohormonas.....	38
Fig. 15 Plántulas de 8 días de edad en diferentes concentraciones.....	38
Fig. 16 Callos obtenidos en las diferentes combinaciones de concentraciones.....	40
Fig. 17 Semillas sintéticas con embriones sexuales.....	42
Fig. 18 Semillas sintéticas deshidratadas.....	42
Fig. 19 Semillas sintéticas.....	43
Fig. 20 Semillas sintéticas contaminadas por hongos.....	44

RESUMEN

Debido a que el maíz es uno de los 3 cultivos más importantes del mundo y originario de México, representa uno de los aportes más valiosos a la seguridad alimentaria mundial. Asimismo, en el transcurso del tiempo, diversas instituciones mundiales, estatales y privadas vienen realizando estudios con el objetivo principal de incrementar los niveles de rendimiento y de producción de nuevos y mejorados híbridos para desarrollar variedades con un alto nivel productivo. En materia de biotecnología agrícola se pueden desarrollar tecnologías para la producción de cultivos de maíz, en este sentido, las semillas sintéticas representan una importante disciplina en el desarrollo de maíz, en el establecimiento de un campo de producción teniendo una calidad excepcional en términos de ingeniería genética, tamaño, forma, sustancias de reserva y reguladores de crecimiento, logrando incrementar las posibilidades de éxito en semillas no viables y el desarrollo de nuevos cultivos que superen limitaciones de adaptación climática, resistencia a enfermedades o que mejoren el valor nutricional de los subproductos agro alimenticios.

Las semillas sintéticas se desarrollaron en el laboratorio de biotecnología de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, estableciendo la embriogénesis somática para la obtención de embriones somáticos a partir de explantes que fueron segmentos de tallo con hojas STH induciendo la formación de callo en medio MS (Murashige y Skoog 1962) adicionado con 2,4-D y dicamba, así como la extracción de embriones cigóticos de semillas de maíz PROMESA, los embriones se colocaron en un endospermo artificial conteniendo BA (benciladenina) y GA₃ (Ácido Giberélico) y posteriormente se encapsularon con alginato de sodio (alginato sódico + cloruro cálcico) que es un hidrogel, fácil de fabricar y el que menos daña el material. Se concluye que en el establecimiento de la embriogénesis somática las concentraciones ocupadas de 2,4-D y Dicamba en el medio MS no indujeron la proliferación de callo y los STH se oxidaban rápidamente aún con el antioxidante empleado, además de que las características de la siembra no fueron las adecuadas. En el desarrollo de las semillas sintéticas utilizando los embriones cigóticos las concentraciones óptimas para que el endospermo artificial ayude a que el embrión se desarrolle adecuadamente fueron de 4×10^{-4} (mg/mL) de BA y GA₃. En el desarrollo de la semilla el endospermo que queda es poco lo cual no permite que el embrión se desarrolle, además de que el alginato se deshidrata y la semilla se compacta, otro problema que impidió el desarrollo de los embriones fue por el exceso de humedad, la contaminación por hongos.

I. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades del maíz (*Zea mays L.*)

1.1.1 Origen y domesticación

El maíz (*Zea mays L.*) es uno de los tres cultivos más importantes del mundo. El centro de origen y dispersión más probable es el Continente Americano, donde los indígenas domesticaron e iniciaron la selección del maíz. Este cereal era esencial en la civilización prehispánica y tuvo un importante papel en sus creencias religiosas, festividades y alimentación; contribuyendo a la formación de razas y variedades que se han conservado a través del tiempo por los agricultores y han sido estudiadas y clasificadas por los científicos para su conservación, mejoramiento y mantenimiento.

Pese a la gran diversidad de sus formas, eran cultivados ya por poblaciones autóctonas cuando se descubrió el Continente Americano. Por otro lado, los indicios recogidos mediante estudios de botánica, genética y citología apuntan a un antecesor común de todos los existentes de maíz. La mayoría de los investigadores creen que este cereal se desarrolló a partir del teosintle, (*Euchlaena mexicana*), cultivo anual que posiblemente sea el más parecido al maíz (Fig. 1), otros creen que se originó a partir de un maíz silvestre, hoy desaparecido. La tesis de la proximidad entre teosintle y el maíz se basa en que ambos tienen 10 cromosomas y son homólogos.

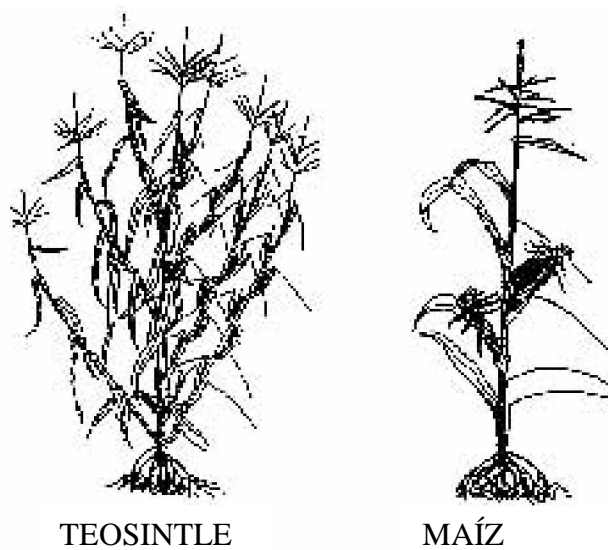


Fig. 1 El teosintle y el maíz

1.1.2 Morfología

El cultivo del maíz es de régimen anual. Su ciclo vegetativo oscila entre 80 y 200 días, desde la siembra hasta la cosecha. Los frutos quedan agrupados formando hileras alrededor de un eje grueso. Los híbridos de maíz, utilizados en forma muy generalizada, contienen unos 600 a 1000 frutos (granos) por mazorca, alineados en 16 a 20 hileras de unos 50 granos cada una.

El fruto (grano) (Fig. 2) es un cariósipide (fruto seco e indehiscente que no se abre) a cuya única semilla está adherida el pericarpio (cáscara del fruto, 6% del peso del grano), el endospermo (80%) y el embrión o semilla (11%).

El grano constituye aproximadamente el 42% del peso seco de la planta. El maíz es a menudo de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y jaspeado (Cámara Nacional del Maíz, 2002)

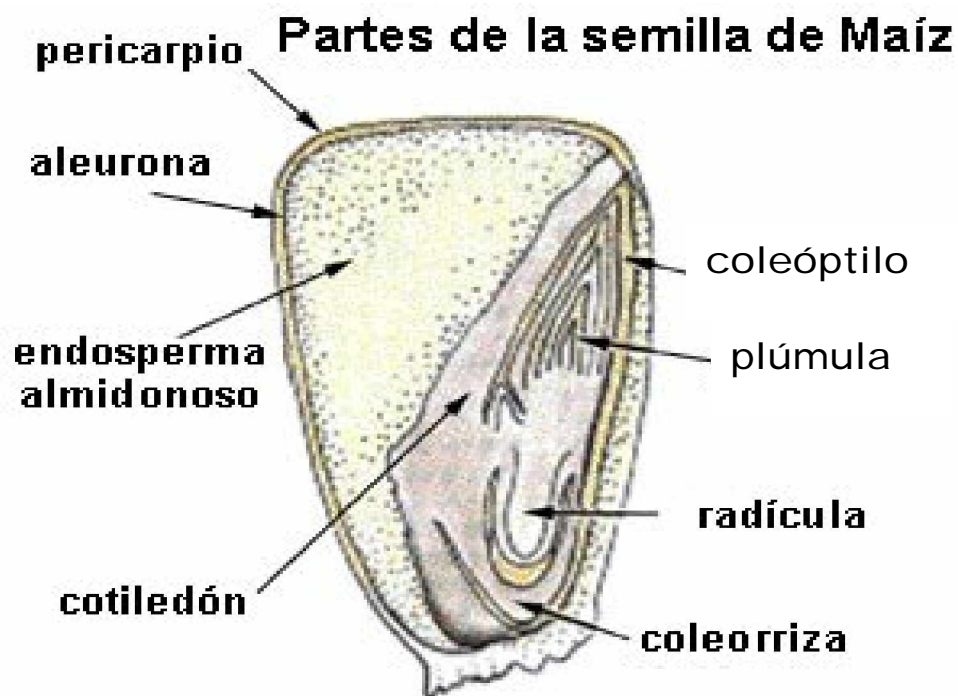


Fig. 2 Semilla de maíz

1.1.3 Fisiología

La fisiología del maíz este determinada, en gran medida por el factor genético. La forma de crecimiento y desarrollo de la planta depende de las condiciones ambientales.

Bajo condiciones apropiadas de temperatura, humedad y aireación, el maíz germina después de los 6 días de la siembra, sin necesitar luz para ello, y en general, sin presentar problemas de retardo en su desarrollo. Durante los días largos el maíz florece tardíamente. La floración es afectada por la temperatura. Cuando esta es mayor a 30°C tienden a experimentar una inflorescencia masculina más temprana que la femenina. En condiciones de temperatura menores a 20°C, la inflorescencia femenina aparece más temprano que la masculina. La diseminación del polen se efectúa por medio del viento, la gravedad y los insectos. La duración del ciclo de vida del maíz depende de las condiciones genéticas, aunque también del ambiente.

1.1.4 Importancia del maíz

Los cereales se han cultivado en muchas partes del mundo desde hace miles de años y han sido las bases del desarrollo de las diferentes civilizaciones (Reyes, 1985). En diversas regiones del mundo crecieron y se domesticaron especies y variedades como trigo y chícharo en Europa; arroz y soya en Asia; sorgo y mijo en África, y maíz y frijol en América que en la actualidad representan la base de la alimentación del planeta (Reyes, 1985).

El maíz con una superficie cultivada de 148 millones de hectáreas ocupa el tercer lugar de la superficie agrícola mundial tan solo después de trigo y arroz (Arellano, 1999); en tanto que en México es un grano básico el cual, entre los cereales cultivados ocupa el primer lugar con 73% de la superficie con cerca de 8 millones de hectáreas cultivadas en los sistemas de riego (13%) y temporal (87%). (Arellano, 1999).

El maíz suministra elementos nutritivos a los seres humanos y es una materia prima básica de la industria de transformación, procesa un gran número de productos y subproductos, como aceite, colodión, celuloide, explosivos, plásticos, jabón, glicerina, emulsiones, productos medicinales, productos farmacéuticos, almidón y proteínas.

La planta tierna, empleada como forraje, se ha utilizado con gran éxito en las industrias lácteas y cárnicas y tras la recolección del grano, las hojas secas y la parte superior, incluidas las flores se utiliza como forraje para alimentar a los rumiantes. Los tallos erectos, que en algunas variedades son resistentes, se utilizan para construir cercas y muros duraderos.

El maíz desempeña un papel importante por su amplia distribución, su bajo precio en relación a otros cereales, a los diferentes tipos de granos y a sus propiedades biológicas e industriales. El índice más alto de utilización per cápita ocurre en los países donde la mayoría del grano se usa para alimentar animales o donde el maíz es preferido como alimento, por todo lo anterior, es necesario que el cultivo de maíz se maneje en forma adecuada, para lograr una mayor producción por hectárea (Llanos, 1989; maíz, 2004).

1.2 Importancia de las semillas

Las semillas son importantes ya que su función biológica es originar la siguiente generación de su especie. Asimismo, son parte fundamental de los programas de mejoramiento de especies cultivadas, que poseen un valor económico y constituyen fuente de alimento.

1.2.1 Semillas sintéticas

Resulta difícil determinar como se originó la idea de producir semillas sintéticas o artificiales. Estas son el resultado de la aplicación en agricultura del fenómeno de embriogénesis somática, descrito por primera vez en 1958 por Jakob Reinert y F. C. Steward y colaboradores.

Sin embargo, un gran propulsor de su utilización para la propagación a gran escala de plantas fue Toshio Murashige, quien en un simposio realizado en 1977 en Ghent (Bélgica) presentó formalmente la idea de la producción de las semillas sintéticas, entendiendo como tal a un simple embrión somático encapsulado.

Esta semilla se diferencia de la semilla verdadera en que el embrión es somático (producido por el fenómeno conocido como embriogénesis somática) y no cigótico, y que si tiene endospermo y cubierta. (Fig. 3). Esta semilla, puesta en condiciones adecuadas, germina y se convierte en una planta.

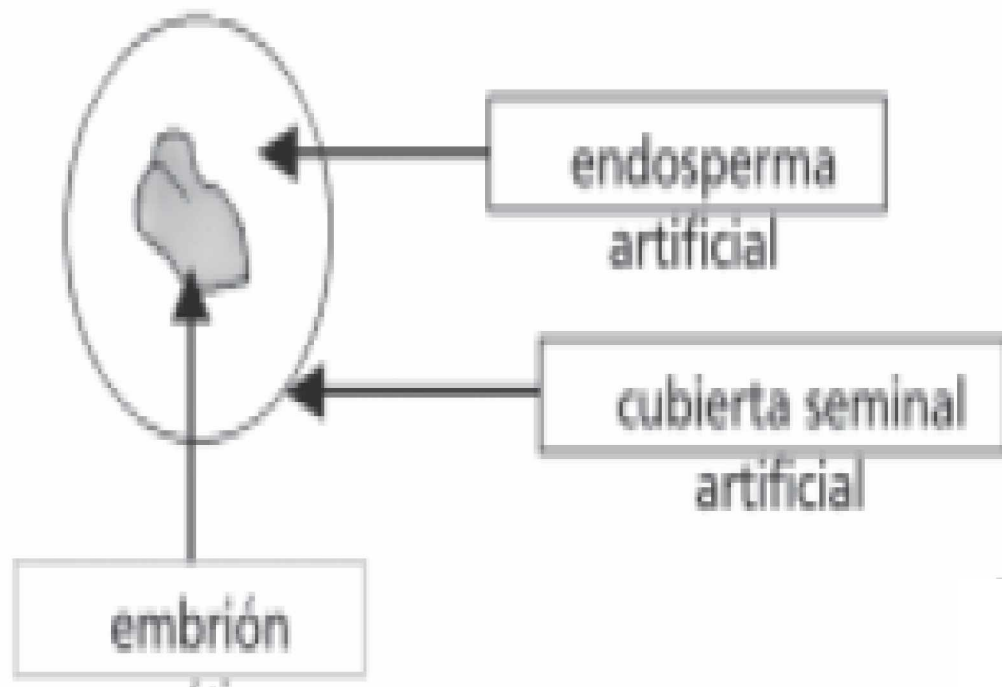


Fig. 3 semilla sintética

Muchos grupos de investigación han contribuido al desarrollo de tales semillas. Entre ellos se deben destacar el grupo liderado por Keith Walker de la Compañía Monsanto, quien a partir de mediados de la década que va de 1970 a 1980 trabajó especialmente con alfalfa. También hay que mencionar la labor de Robert Lawrence de la Union Carbide, quienes comenzaron los trabajos con especies forestales, lechuga y apio. Otros investigadores como Drew, Kitto y Janick realizaron sus trabajos con zanahoria.

El aporte del grupo liderado por Keith Redenbaugh de Plant Genetic Inc. fue muy importante, especialmente por su descubrimiento de que hidrogeles como el alginato de sodio podían utilizarse para producir semillas sintéticas que podían germinar en condiciones de invernadero.

1.2.2 Tipos de semillas sintéticas

Las semillas sintéticas pueden fabricarse de diferentes maneras (Fig. 4). Básicamente pueden utilizarse embriones hidratados, tal como resultan del proceso de embriogénesis somática, o bien pueden ser desecados.

En algunos casos estos embriones están protegidos por cubiertas protectoras. De esta manera se pueden distinguir 5 tipos básicos de semillas sintéticas:

1. **Semillas sintéticas con embriones desecados sin cubierta** los embriones son desecados hasta alcanzar porcentajes de humedad del 8 al 20% y no están provistos de ningún tipo de cubierta protectora.

2. **Semillas sintéticas con embriones somáticos desecados y provistos de cubierta protectora** Esta técnica ha sido utilizada en zanahoria y apio, donde los embriones fueron recubiertos con polyoxietileno y luego desecados.

3. **Semillas sintéticas con embriones hidratados sin cubierta** consiste en la utilización de los embriones somáticos tal como resultan del proceso de embriogénesis somática, sin ningún tipo de cubierta protectora. Este sistema ha sido desechado en la práctica por la escasa conversión de embriones en plantas.

4. **Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados suspendidos en un gel viscoso («fluid drilling»)** Inicialmente fue desarrollado en zanahoria y más recientemente en papa; consiste en la inclusión de varios embriones en una especie de tubo que contiene un gel viscoso.

5. **Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados y provistos de una cubierta protectora** es el sistema más utilizado. Tiene la ventaja de que los embriones no están sujetos a la desecación, Con esta técnica se genera una semilla sintética que consiste en un embrión somático recubierto con una cubierta seminal y provisto de un endospermo artificial

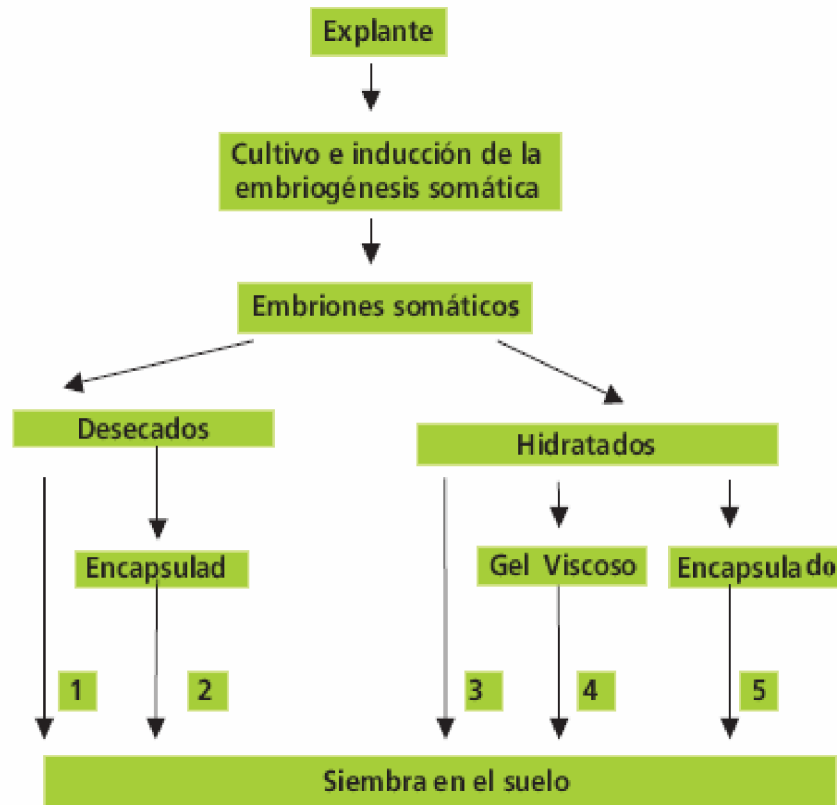


Fig. 4 Tipos de semillas sintéticas

1.2.3 Importancia de las semillas sintéticas

Las semillas sintéticas logran incrementar las posibilidades de éxito de cultivos de especies tropicales y ornamentales que no producen semillas viables (potenciar la propagación vegetativa), o de especies que producen semillas que no pueden ser deshidratadas para su conservación (semillas recalcitrantes).

Además, las semillas sintéticas permiten el desarrollo de nuevos cultivos que superen limitaciones de adaptación climática, resistencia a enfermedades o que mejoren el valor nutricional, estas semillas tienen pase directo al invernadero o campo, permiten el monocultivo a gran escala.

1.3 Embriones Somáticos

1.3.1 Morfogénesis in Vitro

La morfogénesis es el proceso de iniciación de la forma de los organismos a nivel celular entendiendo que involucra la división, el crecimiento y diferenciación celular para formar tejidos y cuerpo de la planta o morfología. La morfogénesis no solo implica cambios estructurales, sino relacionados con aspectos genéticos, fisiológicos y bioquímicos (López y Peran, 2000; Rochon *et al*; 1998; Salisbury y Ross, 1994).

La morfogénesis en el cultivo in Vitro puede seguir 2 rutas distintas:

1. La embriogénesis somática, con la formación de embriones somáticos que siguen cambios estructurales y organizaciones semejantes a los que ocurren en el cigoto
2. La organogénesis que representa la diferenciación de meristemo caulinar y radicular (Laux y Jürgens, 1997; Zimmerman, 1993).

El proceso de diferenciación celular esta inducido por diversos elementos nutricionales, hormonales y ambientales. El conocimiento de cómo inducen y controlan el proceso es muy pobre y, en general empírico. El cambio de concentraciones de hormonas en el medio es el factor más importante que se conoce como iniciador del proceso (Salisbury y Ross 1994). Sin embargo no se cuenta con información acerca de las concentraciones endógenas de estas hormonas en los tejidos ni se entiende el mecanismo por medio del cual se producen las alteraciones metabólicas que finalmente conducen a la embriogénesis y organogénesis (Jiménez y Bangerth, 2001). Esto se fundamenta sobre los hechos biológicos llamados: plasticidad y totipotencia.

1.3.2 Totipotencia celular

En 1902, Haberlandt propuso que todas las células vegetales aún las más maduras y diferenciadas pueden volver a una condición meristemática y desarrollar un nuevo punto de crecimiento teniendo la capacidad de formar plantas completas (Krikorian y Simola, 1999; López, 1990); también predijo que esa habilidad se podría demostrar en cultivos de células. Esta teoría fue tiempo después confirmada en 1958 por Stewart y Reinert al inducir embriones somáticos y regenerar plantas in Vitro a partir de callos derivados de ápices radiculares de zanahoria (Salisbury y Ross 1994).

Para que una célula exprese su totipotencia, primeramente sufre una desdiferenciación (reversión hacia el estado meristemático y formación de callo), seguida de una rediferenciación (habilidad de los componentes celulares de formar órganos o plantas completas); capacidad que se mantiene mientras las células dispongan de un sistema membranal intacto y un núcleo viable. El hecho de que algunas células sean totipotentes no demuestra, que todas las células tengan esta propiedad en cualquier cultivo tisular ya que hay muchas células que no llegan a ser embriones (Morre, 2001; Salisbury y Ross 1994). Todos estos cambios que implica la formación de nuevas estructuras vegetativas se pueden producir gracias a la información genética que se halla en cada célula vegetal

La totipotencia celular se puede definir como la capacidad de una célula vegetal de desarrollar una planta completa. Las células totipotentes son células somáticas que han retenido su capacidad de dividirse y diferenciarse en una planta madura si se coloca en el medio adecuado gracias a mecanismos que regulan caracteres morfológicos, fisiológicos y ecológicos como respuesta a la heterogeneidad ambiental.

1.3.3 Embriogénesis Somática

La embriogénesis somática (asexual o adventicia); consiste en el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión gamética o, en otras palabras, es un proceso mediante el cual se produce una estructura bipolar (embrión) a partir de una célula somática (FAO/PNUMA, 1996).

Esta ocurre en dos etapas: 1) Células competentes aisladas en medios ricos forman grupos de células embriogénicas (centros embriogénicos) y 2) Una vez multiplicados los centros embriogénicos, éstos proliferan en forma lenta e indiferenciada (George, 1993; López y Peran, 2000).

Luego se producen una serie de rápidas y sucesivas divisiones celulares en distintas zonas del centro embriogénico y se conforman embriones globulares, que al crecer pasan por el estado globular, corazón y torpedo, los cuales tras una fase de maduración y germinación darán lugar a plantas completas (Fig.5) (Armstrong y Green, 1985; Goldbert *et al*; 1994; Medero *et al*; 2000). Este proceso constituye un ejemplo de totipotencia.

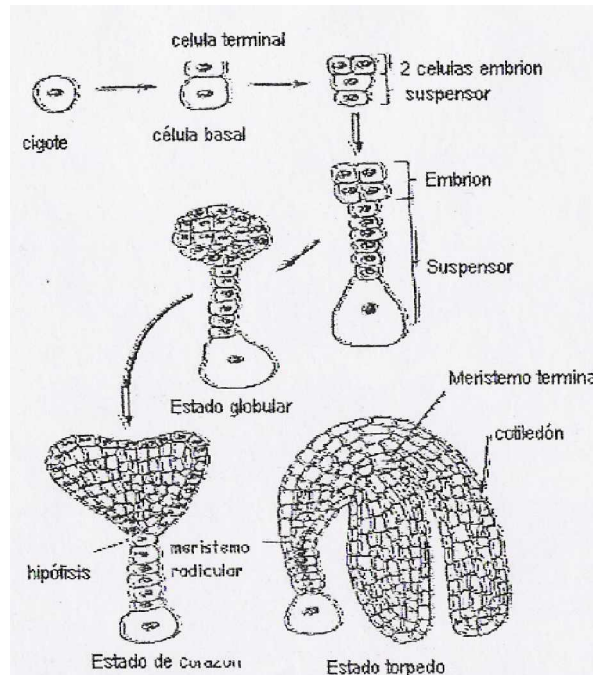


Fig. 5 Estados del desarrollo embrionario

De esta manera un embrión somático se puede definir como una estructura bipolar producida de manera asexual sin conexión vascular con el tejido madre. Los embriones así formados son también denominados singámicos puesto que son estructuralmente y bioquímicamente semejantes a los embriones cigóticos (Villavicencio, 2002).

Se pueden obtener embriones somáticos de muy diversas partes de la planta, así es factible utilizar como explantes: ápices radiculares y caulinares, hojas jóvenes, órganos con características embrionarias o meristemáticas reproductivas (Bejoy y Hariharan, 1992).

Existen 2 tipos de embriogénesis somática *in Vitro*:

- **Directa** las células del explante se desarrollan una vez que las condiciones micro ambientales son favorables para formar embriones sin la formación de callo
- **Indirecta** implica la necesidad de una inducción para que las células sigan la vía embriogénica tras pasar por una fase prolífera (callo) y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis

En ambos patrones, el ambiente *in Vitro* permite inducir el desarrollo embrionario. En células preembrionarias determinadas sólo se requiere el ambiente propicio para iniciar su división sin la participación necesaria de fitohormonas, en células embriogénicamente determinadas, las fitohormonas aseguran la formación de callo (Krikorian y Simola, 1999).

A pesar de los avances verificados, la embriogénesis está limitada o comprendida por dos estímulos o condiciones necesarias para la inducción y control de este proceso. Una posibilidad de manipulación de este sistema experimental depende de un dominio en los principios de desenvolvimiento fisiológico. De esta manera la morfogénesis es concebida como la integración entre los procesos de división y diferenciación celular.

El proceso de la embriogénesis somática es sumamente complejo, difícil de caracterizar y se le ha descrito como de tipo plástico en su desarrollo. Esta plasticidad es el resultado de cambios en la extensión de las etapas de la diferenciación y el desarrollo de los embriones somáticos. En comparación con la secuencia normal a dichas etapas, algunos cambios pueden ser prematuros o sufrir retrasos. (Laux y Jürgens, 1997; Zimmerman, 1998).

1.3.3.1 El papel de las fitohormonas en la embriogénesis

Las sustancias de crecimiento vegetal u hormonas son compuestos orgánicos que se sintetizan dentro de los tejidos vegetales en una parte específica de la planta y que generalmente se transfiere a otra, en donde producen respuestas bioquímicas relativas al crecimiento y diferenciación de los tejidos y órganos con los que se pone en contacto y son activados a bajas concentraciones (del orden de 10^{-6} M o menos).

En la actualidad existen sustancias sintetizadas por el hombre, que al ser aplicadas a las plantas o tejidos vegetales provocan respuestas similares a las hormonas y son denominados reguladores de crecimiento vegetal. Se conocen cinco tipos de fitoreguladores, los cuales han sido clasificados según su naturaleza química y por sus efectos fisiológicos en los que están involucrados. Estos fitoreguladores son los siguientes: giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico y auxinas.

1.3.3.1.1 Auxinas

Las auxinas son las fitohormonas más empleadas para la inducción de embriogénesis como son el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, la cual es responsable de la respuesta transcripcional y de traducción durante el cultivo primario (Fig. 6),

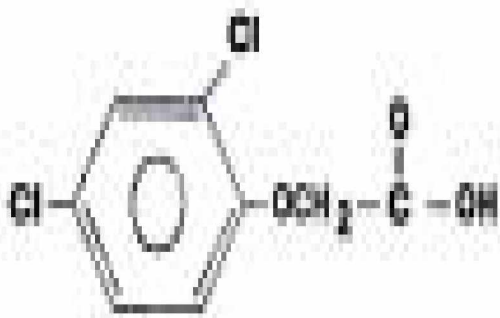


Fig. 6 Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

1.3.3.1.2 Citocininas

Las Citocininas se utilizan para estimular el crecimiento y el desarrollo, siendo la más común la kin (Cinetina), BA (Benciladenina) y 2iP (2-isopenteniladenina); sirven para estimular la división celular. En concentraciones elevadas inducen la formación de brotes adventicios e inhiben la formación de raíces y retardan el envejecimiento (CIAT, 1991; Salisbury y Ross, 1994).

Skoog (citado por CIAT, 1991) encontró que si mantiene una relación alta de citocininas y baja de auxinas, se producen células meristemáticas en el callo, pero si se reduce la relación se favorece la formación de raíces.

1.3.3.1.3 Giberelinas

Se conocen varias Giberelinas, la de mayor uso es el ácido Giberélico (GA_3). Comparado con las auxinas y las citocininas, las giberelinas se utilizan raramente. La mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas. Cuando se aportan giberelinas al medio de cultivo, su función principal es el alargamiento de las regiones subapicales.

Sus acciones en la planta son incrementar el crecimiento en los tallos, interrumpen el periodo de latencia de las semillas, haciéndolas germinar y movilizar las reservas en azúcares, promueven el desarrollo de los frutos y estimulan la síntesis de RNAm (Salisbury y Ross, 1994).

1.3.3.1.4 Ácido abscísico (ABA)

Sus efectos han estado implicados en el control de muchos efectos durante la embriogénesis incluyendo la morfogénesis, síntesis y reserva de proteínas. Es un importante factor en la maduración de embrión y en la inhibición de la germinación precoz, cuando se aplica en raíz usualmente inhibe la elongación de está (Zeevart y Creelman, 1988).

1.3.3.1.5 Etileno

La influencia del etileno en las células de las plantas, cultivo de órganos y tejidos de muchas especies intervienen en el crecimiento, diferenciación, rizogénesis y embriogénesis somática. Se dice que la regeneración de plantas de maíz puede depender del etileno (Vain et al., 1989).

1.3.3.2 Factores que regulan la respuesta embriogénica

1.3.3.2.1 Genotipo

La iniciación y el mantenimiento de cultivos de células y tejidos de maíz y la exitosa regeneración de las plantas depende del genotipo usado, de la elección de los tejidos, del estado de desarrollo de las plantas, del medio de cultivo y del ambiente de cada etapa del proceso de cultivo (Armstrong *et al*; 1994).

1.3.3.2.2 Fisiología del explante

El tejido del explante deriva de una parte de la planta que tenga *per se*, un crecimiento rápido o que está en un estadio temprano de su desarrollo. Si los explantes se extraen de regiones progresivamente más viejas, puede observarse un gradiente de descenso de la capacidad de producir callos in Vitro.

1.3.3.2.3 Edad del explante

La edad fisiológica del explante determina el tipo y velocidad de morfogénesis, obviamente en relación con el tipo de medio de cultivo en que se siembre, pues generalmente los tejidos jóvenes tienen mayor capacidad de diferenciación que los maduros (Emmons y Kieft, 1991; Pastelin, 1999).

Gran parte del éxito de cultivo de tejidos, está en la edad del explante que va a ser utilizado. La edad de la planta y el grado de diferenciación del tejido, muchas veces están interrelacionados y pueden producir efectos interactivos cuando se cultivan in Vitro (Armstrong *et al.* 1994).

1.3.3.2.4 Medio de cultivo

Los componentes del medio de cultivo son: Agua, sales inorgánicas, fuentes de carbono, aminoácidos, fitohormonas, estado sólido o líquido del medio, presión osmótica y otros (Bidwell, 1993)

La embriogénesis se desarrolla tanto en medio líquido como sólido; sin embargo, los embriones obtenidos en medio líquido tienden a presentar anomalías comparados con los obtenidos en medio gelificado (Emmons, 1993).

1.3.3.2.5 Compuestos inorgánicos

Los compuestos inorgánicos (como nitrógeno N, fósforo P, potasio iónico K, calcio Ca, magnesio Mg y hierro Fe) son importantes para el crecimiento de las plantas. Si se escasean estos elementos, aparecen los síntomas característicos correspondientes a la deficiencia de cada elemento (Salisbury y Ross, 1994).

1.3.3.2.6 Fuente de carbono

La fuente de carbohidratos (naturaleza química del azúcar anexado al medio) es crítica en la modulación de las reacciones morfogénicas como regulador osmótico y como fuente de carbono, existen otras fuentes como la maltosa, fructosa y glucosa.

1.3.3.2.7 Micronutrientes

Los micronutrientes son compuestos que la planta requiere en menor cantidad (mML^{-1}), pero no por ello son menos importantes. Estos son el manganeso, cobre, molibdeno y boro. Los 5 ayudan a la síntesis de clorofila y al funcionamiento de cloroplastos (CIAT 1991; López, 1990)

1.3.3.2.8 Vitaminas

La mayor parte de las plantas sintetizan casi todas las vitaminas esenciales, pero aparentemente lo hacen en cantidades infraóptimas. Para lograr un buen crecimiento es necesario suplementar al medio con una o más vitaminas.

Las vitaminas más empleadas en el cultivo in Vitro son la Tiamina (vitamina B1), piridoxina (vitamina B6), ácido nicotínico (vitamina B3), inositol (mio-inositol), ácido fólico (vitamina B9), riboflavina (vitamina B2), las cuales son necesarias para llevar a cabo reacciones catalíticas en el metabolismo (Cassarrubias y Delgado, 1998; CIAT, 1991).

1.3.3.2.9 PH

Cuando se prepara un medio de cultivo, después de añadir todos sus componentes se procede a ajustar el pH final al valor deseado, añadiendo NaOH al 0.1 N o HCL al 0.1 N al medio. Una vez ajustado el pH se esteriliza el medio.

El pH final del medio es de suma importancia ya que por diversas razones los valores bajos de pH (inferiores a 3.5) impiden la solidificación de los agentes gelificantes, puede afectar la solubilidad de algunos componentes, afecta a la absorción de determinados nutrientes por parte del explante, puede afectar el pH del citoplasma y como consecuencia a la actividad de muchas enzimas.

1.3.3.2.10 Luz

Tanto la duración diurna como nocturna, como la calidad (longitud de onda e intensidad) son importantes, ya que influyen en la síntesis y la acumulación de almidón y en las hormonas endógenas, entre otras sustancias (León de la Sierralta, 1997).

El desarrollo y crecimiento de la planta depende en gran medida de la radiación, calidad y duración (ciclo) de la oscuridad y luz. Esta última no solo es importante para la fotosíntesis, sino que además es un dispensador y modulador de las respuestas morfogénicas (Torne y Moyseet, 1996).

1.3.3.2.11 Temperatura

Para mayoría de las especies vegetales, la temperatura de incubación fluctúa entre 24 y 28°C. La variación en los regímenes de temperatura ha resultado ventajosa únicamente en un número reducido de especies (Eggers, 2000). En algunas ocasiones es importante considerar la procedencia de la especie, si es de clima cálido o frío.

1.3.3.2.12 Otros factores

El material con que se sella el frasco puede influir en el intercambio gaseoso (aluminio, plástico, parafilm, etc.) así como el tipo de flama (de gas o alcohol). Los gases que participan más en este proceso son el oxígeno, el bióxido de carbono y el etileno, que pueden o no favorecer el desarrollo de los tallos o brotes, según la especie (CIAT, 1991; Morre, 2001)

II. JUSTIFICACIÓN

En materia de biotecnología agrícola, existe un marcado interés en desarrollar tecnologías tendientes a superar limitantes a la producción de los cultivos. En este sentido, las semillas sintéticas representan una promisoriosa disciplina, en virtud de que constituyen el insumo principal para el establecimiento de un campo de producción, más aún si poseen una calidad excepcional en términos de identidad genética, tamaño, forma, sustancias de reserva y contenido de reguladores de crecimiento y fertilizantes.

III. OBJETIVOS

GENERALES

- Formar semillas sintéticas de maíz a partir de embriogénesis somática indirecta.
- Formar semillas sintéticas de maíz utilizando embriones sexuales maduros

ESPECÍFICOS

- Establecer las condiciones para la embriogénesis somática indirecta, modificando la concentración y la fuente de auxinas
- Establecer la metodología para obtener semillas sintéticas a partir de embriones sexuales maduros de maíz
- Evaluar la carragenina y el alginato de sodio como materiales para recubrir las semillas sintéticas

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el laboratorio de biotecnología de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.

4.1 Material Vegetal

Se utilizaron semillas PROMESA para ser evaluadas en cuanto a su respuesta embriogénica in Vitro.

4.2 Cultivo aséptico e inducción de callo

4.2.1 Establecimiento del cultivo aséptico

Los agentes desinfectantes en las semillas han sido utilizados ampliamente en los procesos de esterilización superficial, así como del material desarrollado in vivo. La concentración de dichos desinfectantes y el tiempo de exposición están en función de la resistencia del material vegetal a los diversos compuestos.

En esta etapa se determinó el tratamiento más eficiente para la desinfestación de las semillas requerida para la germinación y obtención de plántulas donadoras de explantes.

Del material vegetal (PROMESA) se seleccionaron semillas de tamaño uniforme, sin daños por insectos, se colocaron en vasos de precipitados y se sometieron a un proceso de pre-desinfestación mediante un lavado con detergente Roma[®] durante 15 minutos y al final un lavado con agua corriente.

Luego se establecieron diferentes concentraciones para un mejor tratamiento de desinfección utilizando el fungicida Fytolate[®] (Tabla 1), dichas concentraciones se aplicaron a las semilla durante 20 minutos, luego se enjuagaron con agua destilada estéril y se colocaron en una solución de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) 1% v/v, durante 18 horas (h), con el objetivo de iniciar también la imbibición.

Las semillas así tratadas se pasaron a una solución de Fytolate (Cuadro 1) durante 30 minutos y después se enjuagaron con agua destilada estéril y se pasaron a una solución que contenía el bactericida Microdyn® 1.5%, e hipoclorito de sodio comercial, Cloralex® 30% por cada 100 ml de solución, por 10 minutos; luego se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar el exceso de desinfectante. Todo este proceso se llevó a cabo en condiciones asépticas.

Cuadro 1. Concentraciones para la desinfección de las semillas

Tratamiento	Concentraciones FYTOLATE (gL ⁻¹)	Tiempo (min)
1	2	20
	4	30
2	4	20
	6	30
3	3	20
	5	30

4.2.2 Siembra de las semillas

Para la germinación, las semillas se sembraron en el medio básico de Murashige y Skoog (1962) (apéndice 1), sin sumergirlas en el medio. Con las plántulas obtenidas se tomaron los segmentos de tallo con hoja (STH) como explantes.

4.2.3 Medio de cultivo

El medio básico de Murashige y Skoog (MS, 1962) (apéndice I) se adicionó con 30 gL⁻¹ de sacarosa, con pH a 5.7 ± 0.1 ajustado con NaOH 1N y HCL 1N, en un potenciómetro (Orión Research Digital pH/milivolti meter 611), y se agregó agar (Merck) en una concentración de 0.6% (p/v), que se disolvió por calentamiento, posteriormente se vaciaron 10ml del medio en tubos de ensaye de 30 cm. de largo x 2.5 cm. de ancho.

La esterilización del medio se hizo en autoclave a 121°C y 1.5 Kg cm⁻² durante 15 minutos.

4.2.4 Condiciones ambientales de cultivo para las semillas

Las semillas se incubaron en fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa de 30%.

4.2.5 Variables cuantificables

Las variables de respuesta que se evaluaron fueron: a) cantidad de contaminación de semillas por hongos; b) cantidad de contaminación de semillas por bacterias; c) cantidad de germinación. Se sembraron 20 semillas por cada tratamiento y 2 repeticiones.

4.3 Inducción de callo pro-embriogénico y embriogénico

En esta etapa se estableció que para la inducción de callo el medio MS es el más utilizado para la obtención de embriones somáticos. Y se estableció el tipo de explante a utilizar.

4.3.1 Evaluación del tipo de explante

Para la inducción in Vitro de callos en las semillas Promesa se evaluó un solo tipo de explante los segmentos de tallo con hoja (STH).

4.3.2 Obtención de los segmentos de tallo con hoja (STH)

A las plántulas de 12 días de germinación y tamaño representativo (12 a 15 cm. de altura) fueron seleccionadas para cortar discos transversales de 1mm de tallo junto con la hoja. Se tomaron de 8 a 10 discos por plántula.

4.3.3 Efecto de las diferentes concentraciones de fitohormonas para la producción de callo

Los explantes de las semillas germinadas en condiciones estériles, se sembraron en los medios MS (Murashige y Skoog, 1962) con concentraciones de 2 a 5 mgL⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) y Dicamba (2-metoxi-3,6-ácido diclorobenzoico), como se indica en la (Cuadro 2). Todos los medios se complementaron con 30 gL⁻¹ de sacarosa, 1mg L⁻¹ de suplemento vitamínico (una combinación de vitaminas y aminoácidos), (Apéndice 2) y 0.6% (p/v) del agente solidificante agar (Merck)

El Medio se preparó a partir de soluciones stock para eliminar variaciones (Apéndice 1). Una vez aforado el medio se ajustó el pH a 5.7, el medio se vació en frascos de vidrio de 250 mL en los que se sirvieron 20 mL, la esterilización se hizo en autoclave a 121°C durante 15 min.

El proceso de disección de los explantes se hizo en la campana de flujo laminar (ESCO). Los frascos se colocaron en el cuarto de incubación en fotoperiodo de 16/8 h; la temperatura en todos los casos fue de 26°C

Cuadro 2. Diferentes concentraciones de las fitohormonas utilizadas en el medio MS.

Tratamiento	Medio	Fitohormonas (mg/L)	
		2,4-D	DICAMBA
1	MS	2	2
2	MS	3	3
3	MS	4	4
4	MS	5	5

En los siguientes días después de que se sembró el explante se hicieron evaluaciones de tipo cualitativo (visual). A) Se observó la cantidad de contaminación por hongos, B) cantidad de contaminación por bacterias, C) Obtención de callo, y D) oxidación de los explantes.

4.4 Establecimiento del endospermo artificial

4.4.1 Extracción de embriones sexuales de las semillas Promesa

Los embriones sexuales se extrajeron de las semillas Promesa, tomando las semillas por un extremo y con el bisturí se cortó la parte del cotiledón (parte blanda) y se extrae al embrión

4.4.2 Desinfección de los Embriones sexuales

Los embriones se lavaron con una solución de hipoclorito al 5% más 2 gotas de Tween 80 por 20 min. Posteriormente se enjuagaron y decantaron con agua destilada estéril 5 veces

4.4.3 Evaluación de las concentraciones de fitohormonas para la germinación de los embriones sexuales

En este punto las concentraciones de fitohormonas se propusieron de acuerdo con el protocolo de investigación del CIMMYT para el establecimiento de embriones somáticos, desarrollando una matriz de concentraciones con las fitohormonas benciladenina y ácido giberélico (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentraciones de fitohormonas para el endospermo artificial (benciladenina y ácido giberélico).

	BA (mg/ml)	0		2×10^{-4}		4×10^{-4}		8×10^{-4}		1.2×10^{-3}	
GA ₃ (mg/ml)											
0		0	0	0	2×10^{-4}	0	4×10^{-4}	0	8×10^{-4}	0	1.2×10^{-3}
1×10^{-4}		1×10^{-4}	0	1×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-4}	4×10^{-4}	1×10^{-4}	8×10^{-4}	1×10^{-4}	1.2×10^{-3}
2×10^{-4}		2×10^{-4}	0	2×10^{-4}	2×10^{-4}	2×10^{-4}	4×10^{-4}	2×10^{-4}	8×10^{-4}	2×10^{-4}	1.2×10^{-3}
4×10^{-4}		4×10^{-4}	0	4×10^{-4}	2×10^{-4}	4×10^{-4}	4×10^{-4}	4×10^{-4}	8×10^{-4}	4×10^{-4}	1.2×10^{-3}
6×10^{-4}		6×10^{-4}	0	6×10^{-4}	2×10^{-4}	6×10^{-4}	4×10^{-4}	6×10^{-4}	8×10^{-4}	6×10^{-4}	1.2×10^{-3}

4.4.4 Medio de cultivo para el endospermo artificial

El medio básico Murashige y Skoog adicionado con 30 gL^{-1} de sacarosa con pH a 5.7 ± 0.1 ; ajustado con NaOH 1N y HCL 1N, en un potenciómetro, y se agregó agar (Merck) en una concentración de 0.6% (p/v), que se disolvió por calentamiento, después se vació en frascos de 250 mL y cada frasco bien etiquetado se complementó con benciladenina y ácido Giberélico a las diferentes concentraciones (Tabla 3), posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C y 1.5 Kg cm^{-2} durante 15 min.

4.4.5 Siembra de los embriones sexuales en el endospermo artificial

Los embriones se sembraron en condiciones estériles, en una campana de flujo laminar. El embrión se colocó 2mm dentro del medio de cultivo, se incubaron en fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 26°C y humedad relativa de 30%, Las plántulas obtenidas se midieron, (radículas y plúmulas), para poder determinar cuales eran las concentraciones óptimas para la germinación de los embriones.

4.4.6 Medio de maduración de callo obtenido de embriones sexuales

Los callos obtenidos en las plántulas formadas de embriones sexuales se transplantaron a un medio de maduración de callos el cual es el medio básico Murashige y Skoog adicionado con concentraciones de 2 mgL^{-1} de 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) y se complementaron con 30 gL^{-1} de sacarosa, 1 mg L^{-1} de suplemento vitamínico (una combinación de vitaminas y aminoácidos), (Apéndice 2) y 0.6% (p/v) del agente solidificante agar (Merck).

4.5 Elaboración de las semillas sintéticas

4.5.1 Encapsulamiento de embriones sexuales sin endospermo artificial

Para el encapsulamiento se probaron dos hidrogeles, la carragenina y el alginato de sodio a una concentración del 2 % en ambos hidrogeles, la técnica se llevó a cabo por goteo (Fig.7) con micropipetas a las cuales previamente se les cortaron las puntas, el embrión se tomaba con la pipeta y se goteaba en la solución endurecedora (cloruro de calcio CaCl_2 2%). Este procedimiento no se llevó a cabo en condiciones estériles

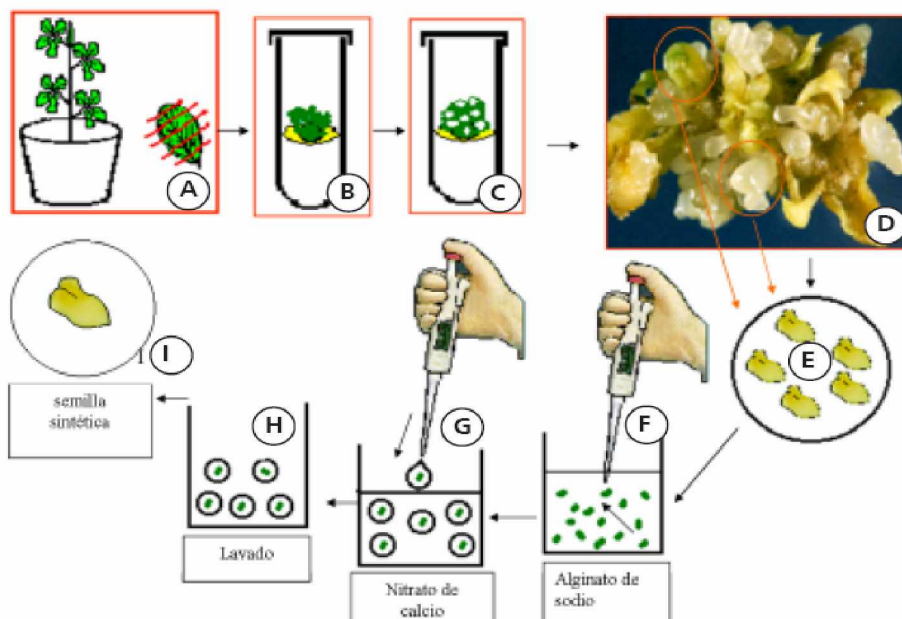


Fig. 7 procedimiento para obtener una semilla sintética A-D) Inducción de la embriogénesis somática, E) selección de embriones somáticos, F) inmersión de los embriones en alginato de sodio, G) endurecimiento con nitrato de calcio, H) lavado, I) semilla sintética

4.5.2 Encapsulamiento de embriones sexuales con el endospermo artificial

En este paso se realizaron dos métodos distintos para la obtención de semillas sintéticas: 1) Las cajas de ELISA se forraron previamente con papel aluminio (para poder obtener el endospermo artificial fácilmente), se colocó el endospermo en cada uno de los pozos de la caja de ELISA, se dejó polimerizar y posteriormente se sembraron los embriones, se extrajo el endospermo junto con el embrión y se sumergieron en el alginato de sodio al 2%, se pasaron a una solución endurecedora (cloruro de calcio al 2%). 2) En el segundo procedimiento no se utilizaron cajas de ELISA, se utilizaron cajas petri en el cual los embriones se sembraron totalmente sumergidos en el endospermo, se extrajeron los embriones con gran cantidad de endospermo y se sumergieron en el alginato, posteriormente se dejaron caer en la solución endurecedora.

Todos estos procedimientos se realizaron en condiciones asépticas, en la campana de flujo laminar que se encuentra en el laboratorio de biotecnología.

4.5.3 Siembra de las semillas.

Las semillas se sembraron de cuatro diferentes formas: a) en cajas petri con agua, b) en cajas petri con papel filtro húmedo, c) se sembraron en el almaciguero 8 x 16 unidades con agrolita, d) sumergidas en agua, todas las siembras se revisaron constantemente para que no les faltara agua.

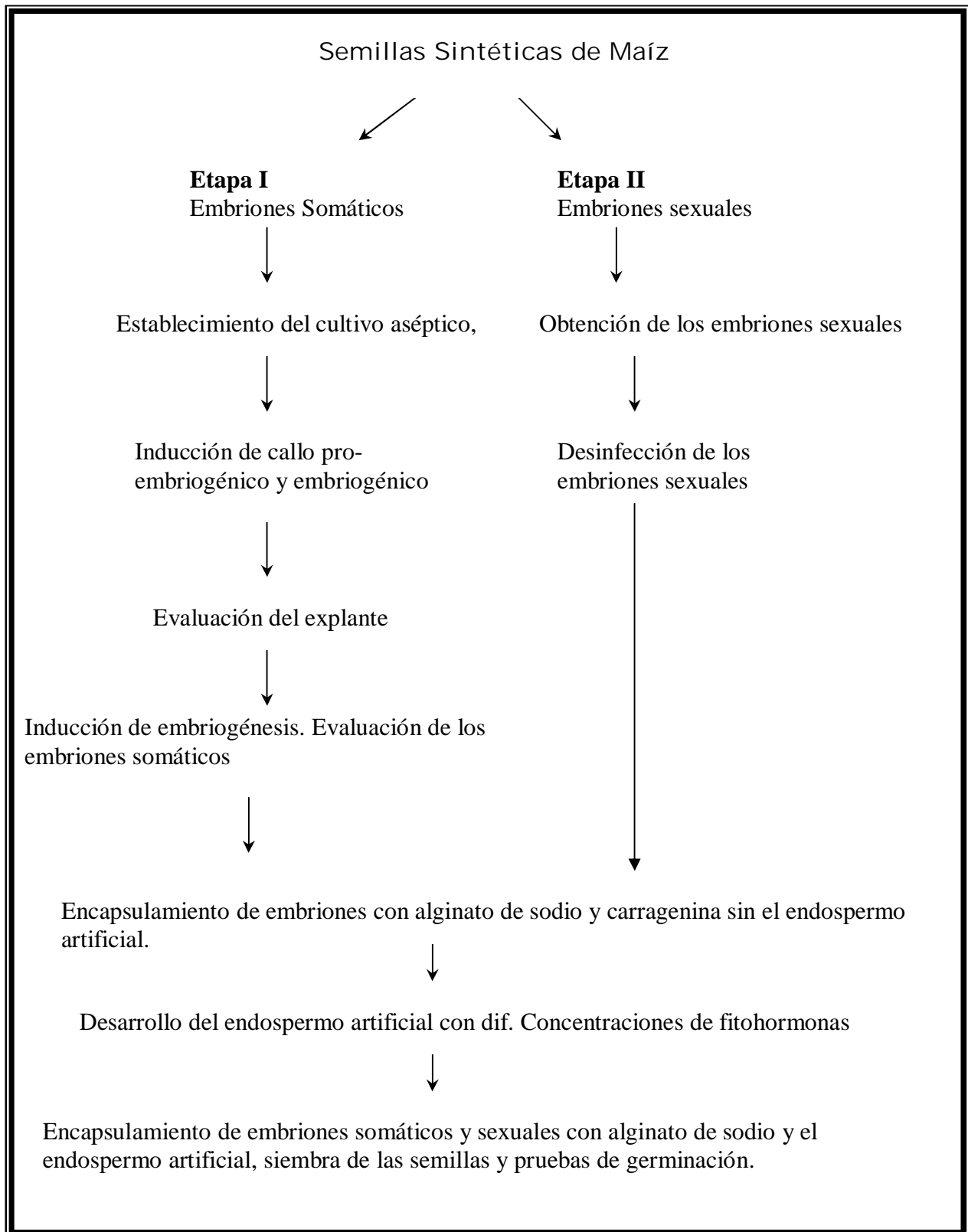


Fig. 8 Diagrama de la metodología para la producción de semillas sintéticas

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cultivo aséptico e inducción de callo

5.1.1 Establecimiento del cultivo aséptico

Uno de los principales problemas que afectan la técnica de cultivo in Vitro de tejidos vegetales es la contaminación, debido a que las condiciones físicas del medio conforman un ambiente adecuado para la proliferación de microorganismos como hongos y bacterias.

Los microorganismos contaminantes pueden provenir del ambiente de trabajo (aire, agua, superficies) o bien de la misma planta. La contaminación da lugar a la pérdida del material, por lo tanto a la pérdida del explante.

La contaminación se evaluó a los 12 días de germinadas las semillas, para los tres tratamientos. El tratamiento 3 resultó ser el más eficaz ya que se tuvo el mayor número de plántulas viables (Fig. 9 y Cuadro 4)

Cuadro 4. Resultados de los tratamientos para el cultivo aséptico

Tratamiento	Contaminadas (semillas)	Germinadas (semillas)	No germinadas (semillas)	Viables (semillas)
1	15	20	0	5
2	1	5	15	4
3	5	15	2	10

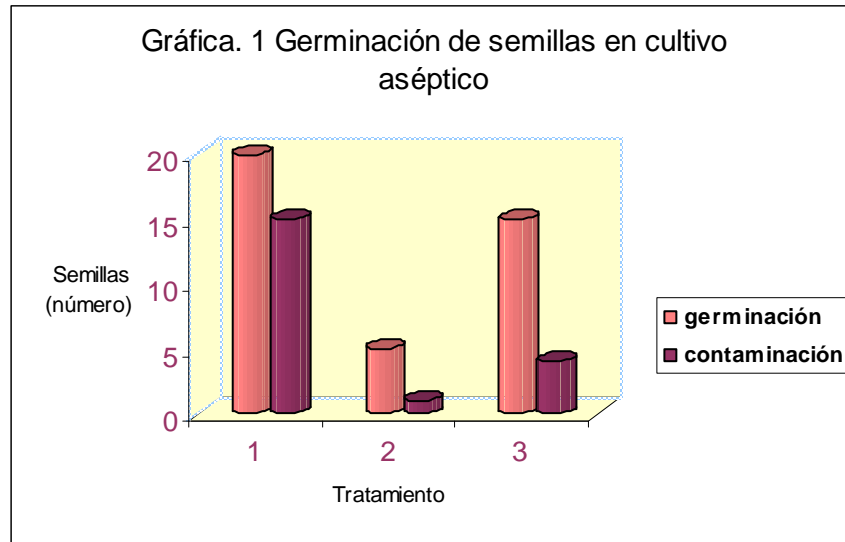


Fig. 9 Se observa que el mejor tratamiento es el 3 ya que tiene más semillas viables que el 2 y el 1

Se realizaron pruebas cualitativas (visuales) en todas las plántulas observando el tamaño, color, forma del tallo y no se detectaron diferencias cualitativas entre las plántulas expuestas al agroquímico (Fig. 10)

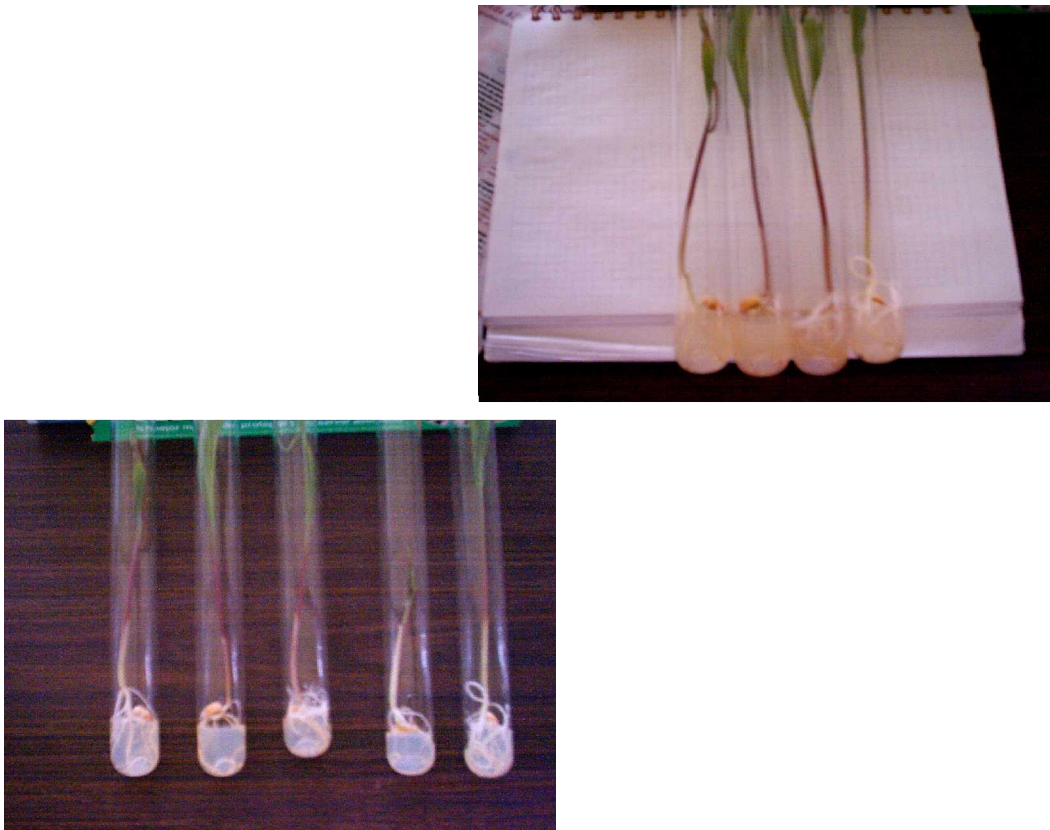


Fig. 10 Plántulas de 12 días de edad, germinadas in Vitro en el medio MS

5.1.2 Inducción de callo pro-embriogénico y embriogénico

5.1.2.1 Evaluación del tipo de explante

En gramíneas los explantes capaces de formar callo son los embriones inmaduros, maduros, segmentos de inflorescencias y hojas jóvenes (Armstrong y Green, 1985), por lo que es posible que los segmentos de tallo con hoja de maíz puedan ser una fuente para formar callo. Sin embargo estos segmentos de tallo con hoja aquí evaluados no tuvieron capacidad embriogénica en ninguna de las concentraciones de fitohormonas probadas, porque la oxidación inhibió el desarrollo de la masa de callo.

Inicialmente los explantes se sembraron en el medio Murashige y Skoog con diferentes concentraciones de fitohormonas (Cuadro 5) en todos los frascos los explantes se presentaron oxidados 2 semanas después de la siembra y sin la presencia de contaminación. En el segundo experimento se utilizaron antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico), los cuales lograron retardar el tiempo de oxidación, ya que los explantes se oxidaban 4 semanas después de la siembra; a diferencia de los experimentos anteriores, lo cual nos permite inferir que si probamos con concentraciones más altas, los explantes tengan más tiempo de vida o puedan no llegar a oxidarse durante el tiempo que los tengamos en dicho medio. En este ensayo tampoco se tuvo presencia de contaminación (Fig. 11). Estos resultados fueron reproducibles en todos los ensayos realizados.

Otros factores que pudieron haber impedido el desarrollo del callo embriogénico son el pH, temperatura, humedad y la edad del explante. Sin embargo el tener las condiciones ambientales necesarias no asegura la obtención de callo ya que los mecanismos mediante los cuales se da la desdiferenciación no son aún bien conocidos, lo que dificulta el modificarlos para obtener los resultados buscados (en este caso la obtención de callo), es decir, el conocimiento de estos mecanismos aún es muy empírico.

Cuadro. 5 Características presentes en los frascos con los STH en diferentes concentraciones de fitohormonas (auxinas), todos los frascos presentaron las mismas características en las diferentes concentraciones

Tratamiento (10 frascos)	Medio	Fitohormonas (mg/L)		Explantes (oxidados)	Formación de callo	contaminación
		2,4-D	Dicamba			
		2	2	+	-	-
1	MS	2	2	+	-	-
2	MS	3	3	+	-	-
3	MS	4	4	+	-	-
4	MS	5	5	+	-	-



Fig. 11 Explantes oxidados 4 semanas después de la siembra utilizando antioxidante

5.2 Establecimiento del endospermo artificial

5.2.1 Evaluación de las concentraciones de fitohormonas para la germinación de los embriones sexuales.

En este ensayo para la obtención de concentraciones óptimas, para la germinación de embriones con un desarrollo adecuado se realizó una matriz de concentraciones utilizando Citocininas (BA, benciladenina) y Giberelinas (GA_3 , ácido giberélico), en el cual de las 25 combinaciones ensayadas se encontró que la concentración más adecuada fue de 4×10^{-4} de benciladenina y 4×10^{-4} de ácido giberélico. Ya que las plántulas que se obtuvieron estaban normales con radícula y plúmula bien desarrolladas. (Fig. 12, a) plántulas completas, b) radículas, c) plúmulas)



Fig. 12 Plántulas que se obtuvieron de embriones sexuales con concentraciones de 4×10^{-4} BA/ 4×10^{-4} GA_3 en el endospermo artificial. a) Plántulas completas, b) radículas, c) plúmulas

En las concentraciones más altas (1.2×10^{-3} de BA / 6×10^{-4} GA₃) utilizadas en este ensayo las plántulas no se desarrollaron adecuadamente ya que las radículas eran muy pequeñas o no se desarrollaron (Fig. 13)

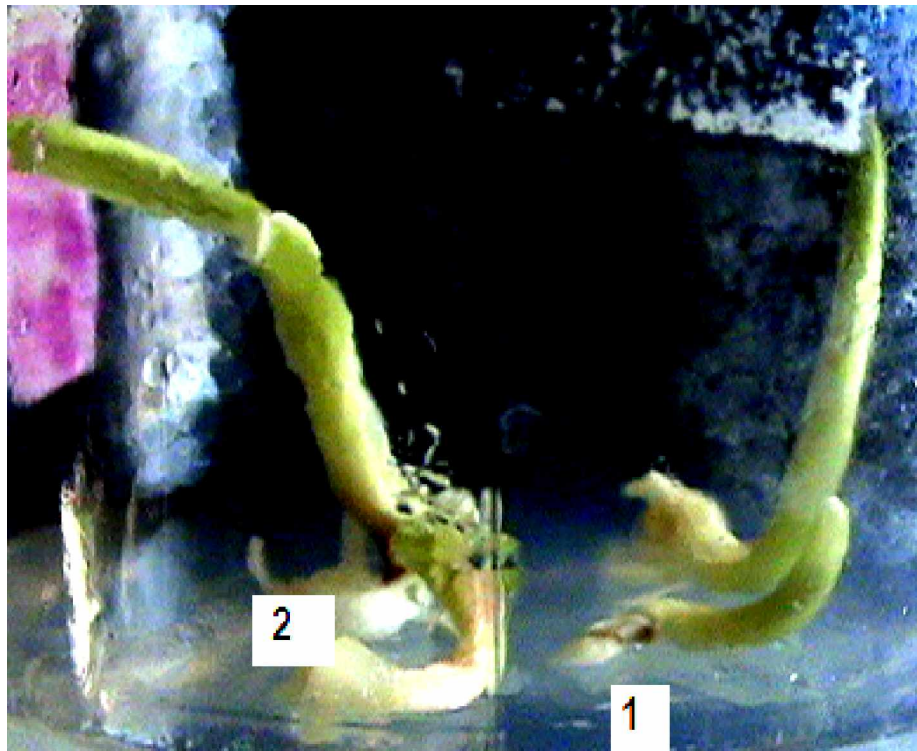


Fig. 13 Frasco con concentraciones 1.2×10^{-3} de BA / 6×10^{-4} GA₃. 1) Se observa una plántula sin el desarrollo de radícula, 2) la radícula que se observa es demasiado pequeña.

El bajo crecimiento en las radículas se debe a que las citocininas en altas concentraciones inhiben la formación de raíces y retardan el envejecimiento. Y las giberelinas incrementan el crecimiento en los tallos y el alargamiento de las regiones subapicales. (CIAT, 1991; Salisbury y Ross, 1994)

En el frasco sin fitohormonas (0 BA/ 0 GA₃) no se presentó germinación de los embriones. (Fig. 14)

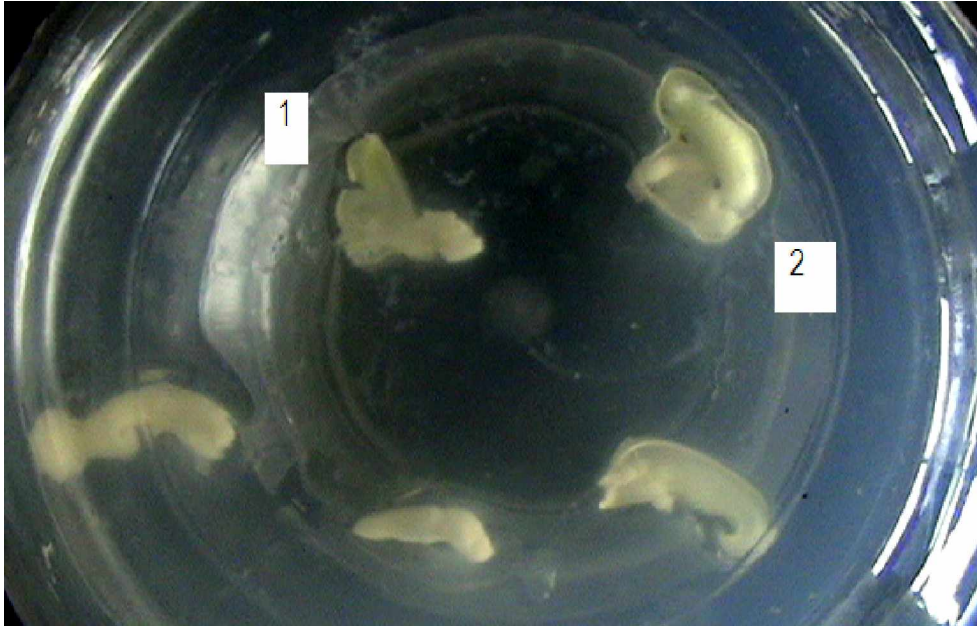


Fig. 14 Frasco sin fitohormonas no hubo formación de plántulas, 1 y 2) los embriones no presentaron germinación pero si hubo un cambio de forma

El las otras combinaciones de concentraciones de fitohormonas hubo formación de plántulas en donde las plántulas variaban los tamaños de las radículas y las plúmulas. (Fig.15)



Fig. 15 Plántulas de 8 días de edad en diferentes concentraciones

En este ensayo todos los frascos presentaron formación de callo, en algunas concentraciones se obtuvo más callo que en otros (cuadro 6), (a excepción del frasco sin fitohormonas) esto se debe a que las citocininas sirven para estimular la división celular. (CIAT, 1991; Salisbury y Ross, 1994).

Cuadro 6 Características físicas de los callos en las diferentes concentraciones

GA ₃ (mg/ml)	BA (mg/ml)	Formación de callo	Observaciones
0	0	No	Los embriones no se desarrollaron y no hay presencia de callo
0	8x10 ⁻⁴	Si	Se presenta poco callo con un color amarillo
0	1.2x10 ⁻³	Si	Solo hay presencia de callo en 2 embriones y es de color blanco
1x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁴	Si	Todos los embriones presentan callo de color verde y de gran tamaño (Fig. 16 b)
1x10 ⁻⁴	8x10 ⁻⁴	Si	Los callos presentan un color verde, son de gran tamaño pero la forma es diferente (Fig. 16 a)
2x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁴	Si	Los callos están presentes en toda la radícula, tienen un color verde (Fig. 16 c)
4x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁴	Si	Los callos son de tamaño pequeño y de color blanco se presentan en la radícula
4x10 ⁻⁴	8x10 ⁻⁴	Si	Los callos son muy grandes presentes en la radícula y tienen un color verde con blanco (Fig. 16 d)
4x10 ⁻⁴	1.2x10 ⁻³	Si	Los callos presentes son muy pequeños y de color blanco (Fig. 16 e)
6x10 ⁻⁴	8x10 ⁻⁴	Si	Hay presencia de callo de color amarillo presente en las radículas (Fig. 16 f)
En las demás concentraciones los callos eran muy pequeños y por lo tanto difíciles de transplantar, algunos callos eran muy pequeños y estaban unidos a las radículas.			

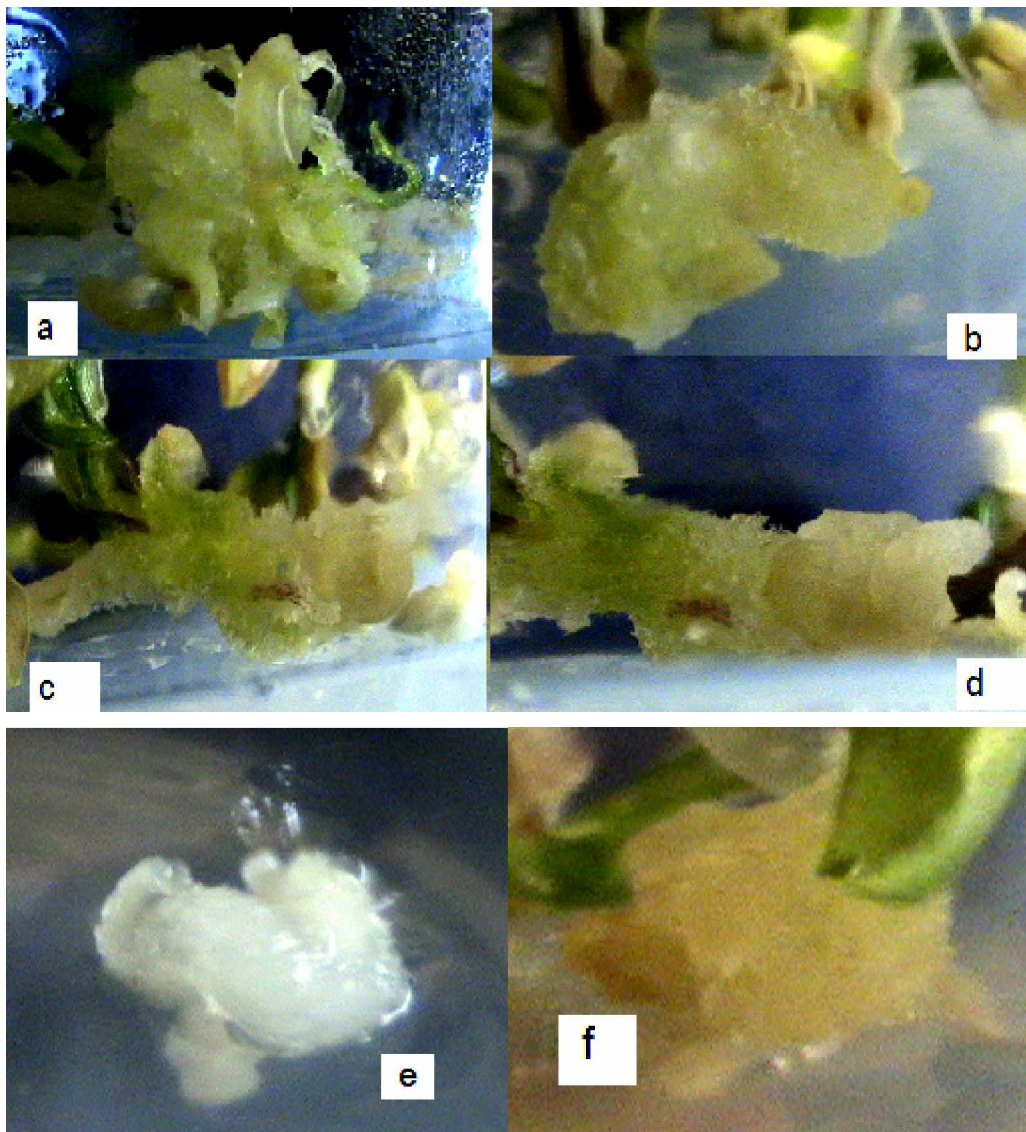


Fig. 16 Callos obtenidos en las diferentes combinaciones de concentraciones

Por lo que se puede concluir que las mejores concentraciones de citocininas y giberelinas para la inducción de callo son 1×10^{-4} de GA_3 y 4×10^{-4} de BA y 1×10^{-4} de GA_3 y 8×10^{-4} de BA ya que en estas concentraciones se obtuvieron los callos más grandes.

5.2.2 Recuperación de callos

Los callos que se obtuvieron (Fig. 16) se transplantaron en un medio de maduración el cual es el medio básico Murashige y Skoog (MS, 1962) se adicionó 30 gL^{-1} de sacarosa con pH a 5.7 ± 0.1 ajustado con NaOH 1N y HCL 1N, en un potenciómetro (Orión Research Digital pH/milivolti meter 611), y se agregó agar (Merck) en una concentración de 0.6% (p/v), que se disolvió por calentamiento, posteriormente se le adicionó suplemento vitamínico, 2,4-D y albúmina. A los 6 días de que se transplantaron los callos se observó una coloración café en algunos callos, a los 15 días los callos presentaron necrosis y presencia de contaminación por lo que se tuvieron que desechar, en este experimento no se probaron las diferentes concentraciones de auxinas por lo que se puede concluir que la concentración de auxina utilizada no fue la más óptima para la inducción de embriones somáticos.

5.3 Producción de las semillas sintéticas.

5.3.1 Encapsulamiento de embriones sexuales sin el endospermo artificial.

En este ensayo se probaron dos tipos de hidrogeles, el alginato de sodio y la carragenina, El alginato de sodio fue el más adecuado ya que este no se desbarató y era más duro, además el manejo de este es mas sencillo ya que no polimeriza tan rápido y endurece inmediatamente después de que se pasa a la solución endurecedora, los embriones en el alginato de sodio quedaron bien protegidos, la cápsula de alginato de sodio no se deshidrato. En cambio la carragenina se desbarataba, no endurecía completamente y el embrión estaba totalmente desprotegido, este hidrogel se seco poco tiempo después de que se saco de la solución endurecedora.

5.3.2 Encapsulamiento de embriones sexuales con el endospermo artificial

El primer método se realizó en cajas de ELISA forradas con papel aluminio, (el papel aluminio se utilizó para obtener el endospermo fácilmente), en cada pozo se colocó endospermo junto con el embrión y se dejaba caer en la solución de alginato de sodio al 2% y posteriormente se goteaba en la solución endurecedora, el punto crítico en este procedimiento fue la obtención del endospermo ya que en algunas ocasiones se rompía el embrión; otro punto crítico era el mantener el material estéril ya que a veces era necesario tomar el papel aluminio con las manos. Sin embargo con este método se lograron tener semillas sintéticas con un tamaño adecuado y con una forma redonda la cual era fácilmente manipulable con las manos. (Fig. 17); Estas semillas posteriormente se sembraron en cajas petri pero el agua no fue suficiente y las semillas se secaron. (Fig. 18)



Fig. 17 Semillas Sintéticas con embriones sexuales obtenidos se semillas PROMESA



Fig. 18 semillas sintéticas deshidratadas

En el segundo ensayo (Fig.19) con el mismo método, las semillas sintéticas se sembraron de tres diferentes formas, a) 15 semillas en cajas petri con papel filtro para retener más agua, b) 15 semillas sumergidas totalmente en agua, y c) 10 en el almaciguero con agrolita totalmente húmeda. Estas semillas estuvieron en constante observación para evitar la deshidratación. Ninguna semilla se deshidrato, sin embargo los embriones no se desarrollaron, esto se atribuyo a que el endospermo era muy poco por lo tanto el embrión no logro su desarrollo.



Fig. 19 Semillas Sintéticas

En el tercer ensayo, utilizando el segundo método reportado en la metodología. La realización de las semillas fue más fácil ya que solo recuperaba el embrión con bastante endospermo, se dejaba caer en el alginato de sodio y posteriormente a la solución endurecedora. Estas semillas quedaron considerablemente más grandes ya que llevaban bastante endospermo y tenían una forma cuadrada, con esta metodología las semillas pueden tener cualquier forma lo cual es innovador ya que se desarrollarían semillas de formas variadas.

Estas semillas se sembraron únicamente en cajas petri con papel filtro (el agua cubría totalmente a la semilla), y se tuvieron en observación para evitar la deshidratación, en la primera semana las semillas presentaron contaminación por hongos por lo que se tuvieron que desechar. (Fig. 20)



Fig. 20 Semillas Sintéticas contaminadas por hongos

En el cuarto ensayo, utilizando el método anterior las semillas se realizaron con más cuidado para evitar la contaminación, se sembraron en cajas petri con papel filtro sin demasiada agua, pero no se pudo tener un control con el agua y alas semillas se deshidrataron.

Esta metodología es más conveniente ya que la elaboración de las semillas es más rápida y las semillas se les pueden dar diversas formas lo cual es innovador.

VI. CONCLUSIONES

Con base en los objetivos planteados, así como en los resultados obtenidos en la presente investigación, las conclusiones fueron las siguientes:

- Se formaron semillas sintéticas utilizando embriones sexuales maduros y se elaboró un endospermo artificial óptimo para que los embriones se desarrollen adecuadamente y formen plántulas normales.
- Se desarrollaron 2 metodologías para la elaboración de semillas sintéticas, éstas metodologías permiten desarrollar semillas sintéticas se diversas formas y tamaños.
- El alginato de sodio resultó ser el más adecuado para el encapsulamiento de las semillas ya que es más resistente, duro y protege al embrión, la carragenina se desbarata fácilmente y es más difícil de manipular.
- Se establecieron diferentes concentraciones y fuentes de auxinas para obtener embriones somáticos, con éstas concentraciones y con las diferentes auxinas (2,4-D y Dicamba) no se logró establecer la embriogénesis somática indirecta

VII. RECOMENDACIONES

Con la finalidad de pulimentar la metodología para la producción de semillas sintéticas de maíz, se sugiere emplear la embriogénesis somática indirecta partiendo de embriones inmaduros de maíz, de modo que se obtengan los embriones y se encapsulen como ya se ha indicado.

Además, es conveniente evaluar el desempeño fisiológico de las semillas construidas, proporcionándoles las condiciones óptimas de humedad, temperatura, aireación y fotoperiodo, utilizando para esto una cámara de incubación.

VIII. BLIOGRAFÍA

- 1.- Moghinski, L. A.; Rey, H.; Olmos, S.; González, V. 1995. Semillas artificiales para la propagación de plantas. *Paradigmas* 1: 5-9.
- 2.- Mckersie, B.D.; Brown D.C.W. 1996. Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. *Seed Science Research* 6: 109-126.
- 3.- Ibaraki, Y. K., K. 2001. Automation of somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65: 179-199.
- 4.- Gray, D. J. P., A. 1991. «Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology.» *Critical Reviews in Plant Sciences* 10: 33-61.
- 5.- Onishi, N; Sakamoto, Y. and Hirose, T. (1994). Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39, 137-145
- 6.- Redenbaugh, K. 1990. Application of Artificial Seed to Tropical Crops. *HortScience* 25 (3): 251-255
- 7.- Tesis. Embriogénesis Somática de Maíz (*Zea mays L.*), Janeth Tellez Roman, Colegio de Postgraduados.
- 8.- Redenbaugh, M.K., Slade, D., Viss, P. and Fujii, J.A. (1987). Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *HortScience*, 22, 803-809.
- 9.- Laboratory Protocols. CIMMYT Applied Genetic Engineering Laboratory
- 10.- Takayama, S. y M. Akita. 1994. The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39 : 147-156
- 11.- Gray, D.J. 1987. Quiescence in monocotyledonous and dicotyledonous somatic embryos induced by deshydration. *HortScience* 22 : 810-814.

APÉNDICE

1. Composición química de las formulaciones del medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) utilizadas en la germinación y aclimatación de plántulas obtenidas por embriogénesis *in Vitro* de maíz

MACRONUTRIENTES	PM	mgL ⁻¹	mML ⁻¹
KNO ₃	101.08	1900	18.792
NH ₄ NO ₃	80.04	1650	20.615
CaCl ₂ .H ₂ O	147.02	440	2.993
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.48	370	1.501
KH ₂ PO ₄	136.09	170	1.249
MICRONUTRIENTES			
MnSO ₄ .H ₂ O	205.1	15.6	0.109
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	8.6	0.03
H ₃ BO ₃	61.86	6.2	0.1
KI	166.01	0.8	0.005
CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	0.025	
NaMO ₄ .2H ₂ O	241.95	0.25	
CoCl ₂ .6H ₂ O	237.95	0.025	
FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	27.8	0.1
NaEDTA.2H ₂ O	372.3	37.3	0.369

2. Suplemento Vitamínico empleado como complemento nutricional en la inducción de embriogénesis *in Vitro* de maíz

Nombre	formula	P.M	mgL ⁻¹	mML ⁻¹
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₃	75.07	20	30.635
Ácido aspártico	C ₄ H ₇ NO ₄	131.1	7.5	5.635
L. asparagina	C ₄ H ₈ N ₂ O.3H ₂ O	150.1	10	6.662
L. arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.2	10	5.741
L. glutamina	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.1	60	41.068
UREA	CON ₂ H ₄	60	45	74.925
Tiamina	C ₁₂ H ₁₇ CIN ₄ O ₅ HCL	337.3	2	0.009
Ac. nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	2	0.121
Piridoxina	C ₈ H ₁₁ NO ₃ HCL	205.6	1	0.073
Ac. fólico	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.4	1	0.023
Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244.3	1	0.041
Riboflavina	C ₁₇ H ₂₀ N ₆ O ₃	376.4	0.1	0.027
Ac. glutámico	C ₅ H ₉ NO ₄	147.1	7.5	5.099
Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	145	80.484

