

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA**



**Estudio Citogenético en Dos Poblaciones de Maíz (*Zea mays* L.)  
Poliembrónico**

**Por:**

**JUANA SÁNCHEZ LAUREANO**

**TESIS**

**Presentada como Requisito Parcial para  
Obtener el Título de:**

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México  
Noviembre del 2000.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

**Estudio Citogenético en Dos Poblaciones de Maíz (*Zea mays* L.)  
Poliembriónico**

POR:

JUANA SÁNCHEZ LAUREANO

Tesis que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador como Requisito  
Parcial para Obtener el Título de Ingeniero Agrónomo en Producción

**A P R O B A D A**

PRESIDENTE DEL JURADO

---

Dr. José Espinoza Velázquez

---

Biol. M.C. Francisca Ramírez Godina.    Ing. M.C. Ma. Cristina Vega Sánchez

---

Biol. M.C. Edith Villavicencio Gutiérrez.

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

---

Ing.M.C. Reynaldo Alonso Velasco

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO  
NOVIEMBRE DEL 2000

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi ALMA MATER por haberme permitido ser una más de sus profesionistas para llevar siempre en alto su nombre.

Al Dr. José Espinoza Velázquez, por todo el apoyo que me brindó, por la paciencia, por la amistad, por que es una persona excelente a quien admiro y respeto tanto que aunque no sé expresar la manera exacta para mostrarle mi agradecimiento sé que sabe cuan grande es.

A la M. C. Francisca Ramírez Godina por todo el apoyo y orientación en la realización de este trabajo sin el cual no hubiera sido posible culminarlo, muchas gracias por sus enseñanzas, sugerencias y su tiempo.

A la M. C. Cristina Vega, por su amabilidad y su valiosa colaboración en la revisión de este trabajo.

A la M. C. Edith Villavicencio Gutiérrez , un ángel más en mi vida, infinitamente gracias por toda su ayuda desinteresada y grandísima, por sus enseñanzas y cariño brindado, la quiero mucho que Dios me la bendiga siempre junto con sus niños Toñito e Iván.

Al M. C. Antonio Cano, por el apoyo y la amistad brindada.

A Bety, Úrsula y Lety, por la gran ayuda desinteresada que me dieron, muchísimas gracias ya que sin ustedes no hubiera sido posible realización de este trabajo, además gracias por su amistad que es tan valiosa para mí.



A las maestras: Ma. Elena, Clarissa y Felipa, por sus consejos, orientación y la sincera amistad brindada.

A los ingenieros: Alfredo F. G., Luis Angel M. R., Armando R. G., Manuel P. V., Antonio R. y Joel L., por su amistad y apoyo, por las vivencias compartidas y sus enseñanzas muy importantes en mi formación profesional.

## DEDICATORIA

A Dios:

Por que siempre está conmigo, por haberme dado a mi preciosa familia y por poner gente tan buena en mi camino, infinitamente gracias Dios mío.

A mis Padres:

María Laureano López

Jesús Sánchez Vázquez

Por que para mí son los mejores padres del mundo, sin errores ni defectos, solo dos personas excelentes que nos dieron a mis hermanos y a mí lo mejor que tenían, por su apoyo incondicional y su paciencia, por todos sus sacrificios y por que los amo, que Dios me los bendiga y los cuide siempre.

A mis Hermanos:

Rocío y Fabiel

Por su cariño y motivación, con el cual he contado hasta hoy, y por que sin su compañía mi vida no hubiera sido completa, mil gracias por su comprensión.

A mi cuñado:

Miguel Castro Romano

Por que desde su llegada a mi familia se convirtió en un hermano más, gracias por cuidar de Chío y de nuestra familia.

A mi novio Roberto:

Gracias Robert, por todo lo que has hecho en mi vida, por todo el cariño y apoyo brindado y porque te amo.

A mis Tíos (as):

Soledad, Josefina, Anita, Gloria, Hortencia, Santa, Leova, Lupita, Andrés, Sergio, Pablo, Jacinto, Gonzalo †, y Enrique.

Por el apoyo incondicional que me dieron, el cual me ayudó a seguir siempre adelante.

A mis Primos:

Francisco, Laura, Petrita, Conchita, Lily, Victoria, Fermina, Gaudencio, Idalia, Érica, Chalo, Eru, Cesar.

Por que todos han sido parte esencial en mi vida, por su cariño brindado y el aprecio que les tengo.

A mis abuelitos:

María, Petrita †, Francisco †.

Por que los adoro y aunque dos de ellos no estén, desde el cielo sienten el amor que les tengo, y a mi abuelita María por ser para mí una persona admirable a quien tanto quiero, que Dios me la conserve por mucho tiempo.

A mis amigos:

Esme, Amelia, David, Chicho, Gume, Gil, Manuel M., Motas, Tobías, Magda, Horacio, Manuel L., Rigo, Elios, Elizabeth, Lidia, Quique, Orlando, Bladis, Pedro.

Por que siempre en la buenas y en las malas han estado conmigo, porque cada uno ha sido una parte esencial en mi vida, por compartir con ellos tantos momentos increíbles, porque me eligieron como su amiga. Especialmente a ti Esme que más que amiga sabes que eres mi hermana, te quiero mucho.

A mis compañeros y amigos de la especialidad de Producción generación 88:

Jorge G., Sergio, Cervando, José Ma., Santiago, David, Rusbel, José S., Demetrio, Tavo M.O., Tavo M.S., Oscar, Cesar †, Alejandro, Martín, Layo, Jorge R., Jorge C., Balta, Misael, Martha, Angel, Plutarco, Robin, Hector, Porfirio, Raul.

Por que en los 5 años que pasamos juntos me brindaron lo mejor de sí, por ayudarme y cuidarme cuando lo necesité, y porque cada uno de ustedes ocupa un lugar especial en mi corazón y mi mente.

A mis Compañeras de Vivienda:

Nancy, Erica, Inés, Gloria R., San Juana, Rosi, Lupita, Licha, Ale, Miriam, Araceli, Gloria, Isabel, Pulina, y Angel C.

Por la paciencia y los momentos alegres compartidos.

A la Sra. Margarita Hernández Urbano, por que ha sido un ángel en mi camino, que estoy segura Dios la puso para que durante mi estancia fuera de mi hogar, me cuidara y ayudara a seguir adelante, le agradezco muchísimo lo que ha hecho por mí lo mismo que a su preciosa familia que me brindó cariño aún sin conocerme.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVO.....	3
HIPÓTESIS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Importancia del Maíz.....	4
Poliembrionía en Vegetales.....	5
Generalidades.....	5
Poliembrionía en maíz.....	7
Trabajos Publicados Sobre Poliembrionía en el Instituto	
Mexicano del Maíz.....	9
Valor Nutritivo del Grano de Maíz.....	11
Estudios Citogenéticos.....	13
Técnicas para elaborar preparaciones.....	13
Cariotipo e idiograma.....	14
Poliploidía.....	15
Mutación.....	15
Origen de los poliploides.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Características generales del lugar de trabajo.....	18
Materiales.....	18
Material biológico.....	18
Reactivos.....	19

<b>Otros materiales y equipo.....</b>	<b>20</b>
<b>Métodos.....</b>	<b>20</b>
<b>Pruebas preliminares.....</b>	<b>20</b>
<b>Procedimiento efectivo.....</b>	<b>21</b>
<b>Preparaciones citológicas.....</b>	<b>23</b>
<b>Cariotipo.....</b>	<b>24</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>Conteo Cromosómico.....</b>	<b>25</b>
<b>Análisis de Cariotipo.....</b>	<b>30</b>
<b>Modificaciones a la Técnica para Estudios Cromosómicos     en Ápices Radicales de Maiz.....</b>	<b>35</b>
<b>Características Generales de Poliembrionía y Germinación     de los Grupos NAP y BAP Utilizados en este Trabajo.....</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>42</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
4.1 Longitud del complemento cromosómico en ápices radicales de maíz poliembriónico.....	31
4.2 Descripción del complemento cromosómico de maíz poliembriónico ( <i>Zea mays</i> L.) $2n = 2X = 20$ .....	32
4.1 Valores porcentuales promedio de variables de interés en plántulas de maíz poliembriónico, observadas al noveno día postsiembra en tacos de germinación.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>4.1</b>	<b>Cromosomas en Célula Diploide, Metafase Mitótica de la familia NAP-89.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Cromosomas en Célula Diploide, Metafase Mitótica de la Familia NAP-132.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3</b>	<b>Cromosomas en Célula Diploide, Metafase Mitótica de la Familia BAP-137.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4</b>	<b>Cromosomas en Célula Diploide en Metafase Mitótica de la Familia BAP-168.....</b>	<b>27</b>
<b>4.5</b>	<b>Contenido Cromosómico en Célula Triploide en Metafase Mitótica de la Familia BAP-200.....</b>	<b>28</b>
<b>4.6</b>	<b>Contenido Cromosómico en Célula Triploide en Metafase Mitótica de la Familia BAP-200.....</b>	<b>28</b>
<b>4.7</b>	<b>Idiograma de Cromosomas Somáticos de Maíz Poliembriónico <math>2n = 2X = 20</math>, Cromosomas Ordenados por Tamaño Decreciente, y Posición del Centrómero. El Cromosoma 6 con Organizador Nucleolar y Satélite.....</b>	<b>34</b>

<b>4.8</b>	<b>Fotografía de los Diez Pares de Cromosomas Homólogos en 100 X , Cromosoma Seis Satelado.....</b>	<b>34</b>
<b>4.9</b>	<b>Plántula de Nueve Días de Desarrollo, Tamaño que se Utilizó para el Análisis Citológico en Ápice de Raíz.....</b>	<b>36</b>

## INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales de mayor demanda en el mercado de los granos que se utilizan con fines industriales. La tasa de crecimiento en la producción mundial del maíz en años recientes es del orden de 5% (Sánchez *et al.*, 1998).

Las cualidades principales de este cultivo son: capacidad de rendimiento por unidad de superficie; cualidades del grano en contenido de nutrimentos y facilidad de manejo; y bajos precios por tonelada. En la medida en que el maíz se siga produciendo en abundancia, su precio será bajo, y de esta forma redituable para utilizarse en productos industriales, tales como: almidones, aceites y pigmentos, a partir de los cuales se elaboran cientos y hasta miles de productos, principalmente en la industria alimentaria.

La versatilidad en el aprovechamiento del grano, y otras partes de la planta, ha propiciado el surgimiento de una agricultura de maíz de aplicaciones especiales, donde el objetivo es producir maíces cuyo grano o planta completa poseen cualidades particulares de las cuales se derivan productos específicos que son demandados por grupos crecientes de consumidores, en el mercado mundial de productos.

Una de las características especiales en maíz es el fenómeno denominado poliembrionía (PE), que consiste en la formación de varios embriones por semilla, los cuales se desarrollan en plantas completas. Previsiblemente, la PE tiene potencial como carácter de aprovechamiento productivo por la cantidad y calidad de proteína de origen embrionario, además de la posibilidad de aumentar el contenido de aceites en el grano, ya que éstos

residen mayormente en el embrión. El desarrollo de variedades de alta productividad que incluyan la característica PE tienen el potencial de maíces especiales, aplicables en la industria aceitera y de alimentos balanceados de aplicación pecuaria.

El Instituto Mexicano de Maíz de la UAAAN ha hecho un manejo del fenómeno de poliembrionía en maíz, desde su aparición en el compuesto 301-SSE con una frecuencia de 2% (Castro, 1973), hasta constituir a la fecha poblaciones de porte normal o braquíticas (enanas) cuya frecuencia PE es superior al 60% (Espinoza, 1998).

Las características favorables de estos maíces son la gran competitividad, ya que una semilla genera dos, tres o más plantas plenamente desarrolladas y con frutos, lo cual muestra los beneficios del uso de estos materiales al proporcionar mayor cantidad de grano y material vegetativo.

Existen también características desfavorables asociadas a la PE, como son: germinación en charolas de invernadero con buen porcentaje pero la presencia de plántulas defectuosas o deformes (5 a 10%), plantas raquíticas; mala germinación en campo (50 a 60%); tamaño de grano reducido, tal vez la influencia de dos o más embriones reduce el espacio y desarrollo del endospermo.

La presencia de la poliembrionía y sus fallas de germinación pudieran estar asociadas a errores o mutaciones a nivel cromosómico: aberraciones, aneuploidia, monoploidía y otros niveles de ploidía. O a mutación puntual, como el gen *ig*, (*indeterminate gametophyte*) que promueve la presencia de monoploides y PE en maíz.

## **Objetivo**

Realizar estudios citogenéticos en mitosis de tejido apical de plántulas, provenientes de muestras aleatorias de familias de medio hermanos pertenecientes a grupos de alta poliembrionía.

**Hipótesis:** La PE en maíz está asociada a cambios en estructura o número cromosómico.

## REVISION DE LITERATURA

### Importancia del Maíz.

El maíz es, entre los cereales cultivados, el más versátil de todos dada la gran variedad de productos que se pueden elaborar a partir de su grano y otras partes de la planta; y es uno de los recursos renovables más importantes del mundo ya que la mayoría de los países dedican en promedio 1.5 hectáreas de cada 4 cultivables a su producción.

En México, el maíz es el producto agrícola que tiene mayor identidad con la cultura mexicana, pues además de la importancia en la alimentación popular de zonas urbanas y rurales, fue el cultivo domesticado que permitió que surgieran culturas muy importantes en nuestro país como la olmeca, la maya, la teotihuacana, la tolteca y la mexicana (Sánchez *et al.*, 1998).

Tron (1999) hace mención sobre los nuevos tipos de maíz para la industria, señala que en México no hay una adecuación de cultivos de maíz u otros granos básicos en base a la oferta y la demanda real. Comenta que hasta el momento el 50 % de la demanda de maíz se orienta hacia los maíces amarillos, considerando para esto la alimentación humana, la producción de insumos industriales, incluidos el almidón y la fructosa, así como los requerimientos pecuarios. Por lo anterior para abastecer la demanda nacional de maíz, la Cámara Nacional del Maíz Industrializado promueve inducir en México la producción de maíz de especialidades, con lo cual se busca cultivar y producir: amarillos con alto contenido de aceite, maíz alto ceroso con más almidón extractable, pero especialmente un maíz, sea amarillo o blanco, con alta calidad de proteína o de sus elementos base: triptofano y lisina.

## Poliembrionía en Vegetales

### Generalidades

La poliembrionía se define como la formación de embriones múltiples desde un cigoto por su fisión en una etapa de desarrollo temprana. El fenómeno ocurre tanto en animales como en vegetales superiores. Los monocigotos gemelos (duplos) constituyen el ejemplo más simple de poliembrionía. Sin embargo, se puede observar casos de número superior de embriones funcionales como triates (varias especies vegetales), cuádruples (armadillo, maíz), de 10 a 30 embriones (mango, naranja), y hasta de 2000 embriones en un solo cigoto en ciertas avispas parásitas.

Webber (1940) describe los diferentes tipos de poliembrionía existentes en gimnospermas y angiospermas, así como las causas y la relación de este fenómeno con la agricultura:

- **Poliembrionía esporofítica.** Los embriones esporofíticos se forman de las células de la nucela o del integumento, estas células se dividen y desarrollan dentro del saco embrionario y producen uno o varios embriones; para el desarrollo de los embriones esporofíticos es necesario el estímulo de la polinización y fertilización.
- **Poliembrionía segmentada (cleavaje).** Este tipo de poliembrionía es resultado de la separación o división del cigoto o embrión joven en dos o más unidades, cada uno de los cuales desarrolla en embriones por separado. Los embriones segmentados son monocigóticos de origen, por lo que las plantas resultantes son idénticas.
- **Poliembrionía simple.** En las gimnospermas, la poliembrionía se debe a la formación de huevos múltiples a partir de una sola megaspora, y la unión de estos huevos con el esperma. Aunque la producción de más de un huevo u óvulo puede atribuirse a segmentación, es probable también que el caso de

los embriones extras (adventicios) se deba a que se derivaron de las sinérgidas, las cuales fueron fecundadas por un núcleo generativo extra.

- **Poliembrionía euploide.** Dentro de la poliembrionía euploide, se incluye a los embriones múltiples que dan lugar a plantas monoploides así como también a euploides. Estos casos se han reportado en varios géneros de plantas y los casos más comunes son, en gramíneas:

Haploide - diploide: *Dactylis, Triticum, Poa, Phleum.*

Haploide - triploide: *Phleum*

Diploide - triploide: *Poa, Triticum, Secale, Avena, Phleum, Dactylis*

Diploide - tetraploide: *Triticum.*

Triploide - triploide: *Dactylis, Lolium, Poa.*

En la mayoría de los géneros los casos más comunes son los pares diploide - diploide. También se han descubierto tripletes (triatres) en *Triticum* siendo: triploide - triploide – diploide; es evidente que los pares idénticos son derivados de la división monocigótica, y que existe fertilización de las sinérgidas y antípodas.

**Competencia entre embriones.** Es sabido que en algunas especies, variedades o razas es más común la poliembrionía que en otras, y en algunos casos la cantidad de embriones por semilla son elevados, como los encontrados en variedades de *Citrus* y *Manguifera* donde casi cada semilla es poliembriónica y se han observado aproximadamente 30 embriones en una sola semilla esto da como consecuencia una lucha feroz o competencia por la supervivencia; los embriones varían en tamaño y posición por lo que generalmente pocos germinan. La producción de plantas débiles o la vitalidad de los embriones quizá se deba a una desviación en la proporción normal del nivel de ploidía, o a la posición del embrión durante su desarrollo embrionario. Normalmente en diploides, el embrión es 2X, el endospermo 3X, y el tejido periférico es 2X; si el embrión múltiple es euploide, es decir 3X o más X, el endospermo puede ser 5X ó más X, y el tejido periférico permanecerá como 2X; esta condición parece una desventaja para el embrión euploide.

**Poliembrionía y Agricultura.** En diversos cultivos la poliembrionía se considera como una ventaja por la posibilidad de obtener diploides monocigóticos de haploides y como resultado líneas puras, las cuales son muy importantes desde el punto de vista genético. Algunos ejemplos de cultivos donde se muestran las ventajas de la poliembrionía son:

En cítricos por medio de poliembrionía se provee de un gran número de plantas genéticamente uniformes, fácilmente y a bajo precio; en la producción de pastos forrajeros se aumenta el peso de las partes constitutivas por los posibles poliploides generados; muchas otras plantas importantes como el algodón, tabaco, trigo y papa, son poliploides, algunos de los cuales indudablemente son originados a través de poliembrionía. Como se ha mencionado los poliploides tienen un alto peso en comparación a las plantas normales esto es por la producción de una masa vegetativa extraordinaria y la aparición de órganos de mayor tamaño que los diploides, fenómeno que se conoce como gigantismo.

### **Poliembrionía en Maíz**

El fenómeno de poliembrionía se ha investigado desde los años treinta cuando se encontraron plantas de maíz provenientes de granos con dos embriones las que se denominaron como plantas gemelas (Randolph, 1936; y Skovsted, 1939; citados por Pesev y Petrovic, 1976).

Morgan y Rappleye (1951) reportan la aparición de plantas múltiples provenientes de una sola semilla en maíz (*Zea mays*), al hacer cruzamientos de líneas puras con polen expuesto a varias dosis de irradiación (rayos-X). En el estudio citogenético de ápices radicales de plántulas múltiples provenientes de cruces con polen irradiado, no se encontró ninguna alteración en el número cromosómico, mostrando siempre la dotación completa de 20 cromosomas.

Uno de los casos más conocidos en el manejo de maíces de doble embrión es el que presentan Pesev *et al.* (1976) quienes seleccionaron líneas endogámicas de maíz con semillas de dos embriones a partir del material encontrado en 1963-1964 por ellos Beograd-Zemun en el Maize Research Institute de Yugoslavia, y que consiste en mazorcas que contenían uno a tres granos con dos embriones. Las doce líneas seleccionadas en 1973 tuvieron una frecuencia de granos con dos embriones de 2.1% a 25.3% y el promedio de todas las líneas fue de 11.8%. La mejor línea incrementó ocho veces el número de granos con dos embriones que el material inicial (3.1%). También detectaron un contenido más alto de lisina y aceite al comparar a las semillas poliembriónicas con granos normales de la misma línea.

Dada la importancia económica, actual y potencial, de la apomixis en especies cultivadas, es importante señalar que históricamente se ha señalado la conjunción apomixis, euploidía y poliembriónia; se sospecha la existencia de apomixia en los siguientes casos: 1) presencia constante de anomalías cromosómicas irregulares de generación en generación; 2) Existencia de varios embriones por semilla (poliembriónia) y de algunas otras anomalías florales (varios estigmas u ovarios dobles o fusionados, etc.).

La agamospermia es un fenómeno de apomixia donde en sentido estricto falla la reproducción sexual pero se forman semillas de origen asexual. La poliembriónia adventicia es un tipo de agamospermia y un caso común es la formación de líneas nucelares en naranjo donde en el saco embrionario se desprenden células de la nucela ( $2n$ ) y desarrollan para formar embriones y el óvulo se fertiliza con gametos masculinos normales, esto da como resultado una semilla poliembriónica con un embrión sexual y embriones adventicios (Cubero, 1999).

El estudio y manejo de plantas “doble embrión” o “gemelas”, denominación inicial (1973 a 1994), y poliembriónicas, denominación desde 1995 a la fecha, ha sido una línea de investigación en el IMM de la UAAAN. El objetivo central

ha sido el de generar poblaciones de maíz que concentran en alta medida a este carácter. La selección artificial practicada en estos dos grandes periodos ha permitido pasar de 2% de PE a 47% (1973 – 1994); y de 47% a 67% (1995 – 2000). En este último periodo se han desarrollado más estudios, relativos a determinaciones de contenido bromatológico de los granos de maíz; el incremento en la proporción de tres o más plantas por semilla; la dilucidación de los mecanismos genéticos que controlan la expresión de la poliembionía, y la indagación sobre casos euploides en estos grupos bajo estudio; el trabajo que se reporta en esta tesis es con respecto a la caracterización cromosómica de las subpoblaciones braquítica y normal de alta poliembionía.

### **Trabajos Publicados sobre Poliembionía en el Instituto Mexicano del Maíz.**

Castro (1973) reporta los resultados del estudio realizado en maíces con el carácter doble embrión encontrado en el compuesto 301- SSE (Selección Super Enana) en una frecuencia aproximada de 2 %, formado por la cruce de una planta de tallo cuadrado con una población segregante para  $br_2br_2$  con 75% de germoplasma de la variedad Puebla grupo 1 y 25% de Tuxpeño braquítico.

Rodríguez y Castro (1978) continuaron la selección en forma divergente, para comprobar la heredabilidad del carácter doble embrión. Formaron tres grupos de la siguiente manera: sintético 1, diez familias seleccionadas en el campo para alta frecuencia de plantas gemelas; Sintético 2, diez familias seleccionadas en la bodega para alta frecuencia de plantas gemelas; Sintético 3, diez familias seleccionadas en bodega para baja frecuencia de plantas gemelas. Las polinizaciones fueron: en los dos primeros sintéticos (N x N) (N x TG), y en el tercer sintético se cruzó (N x N). Los resultados en este ciclo indican que en los sintéticos 1 y 2 hubo un aumento de 4.012% a 11.45% mientras que en el sintético 3 sólo aumentó de 4.012% a 5.011%; un incremento de 7.43 y 1.098 % respectivamente.

Castro (1979) señala que en el cuarto ciclo de selección hacia mayor poliembrionía (PE) se prosiguió en forma divergente siguiendo el método de cruza doble crítica entre los dos primeros sintéticos para hacer uno solo. En este ciclo la frecuencia PE alcanzó 33.28%.

Con este método se comprobó que la herencia de estas semillas está gobernada por genes de acción aditiva, ya que la regresión progenie-progenitor se calculó en ( $p,op = 0.65$ ); también se observó una marcada influencia materna en las plantas gemelas.

Rodríguez (1981) prosigue con la selección de maíces hacia mayor poliembrionía, haciendo selección recurrente para incrementar los genes que condicionan el carácter “doble embrión” concluyendo que este carácter es altamente heredable, determinando también que las dos plantas resultantes de las semillas con doble embrión son gemelas genéticamente idénticas en base a la reducida varianza que se presenta dentro de los pares de plantas.

Gómez (1982) continuó el programa de selección recurrente en la población de maíz para incrementar la frecuencia del carácter “doble embrión”, concluyendo que la frecuencia aumentó a 46.58 % para el sexto ciclo de selección.

Espinoza *et al.* (1998) señalan que a partir de 1992, la base germoplásmica de gemelas se dividió en dos subpoblaciones: “enana” y porte normal. El manejo reproductivo de las poblaciones desde entonces fue a través de cruza fraternales con mezcla de polen. Para 1995, cada población se manejó con dos subpoblaciones, representadas por un grupo que se seleccionó para alta poliembrionía (AP) y otro hacia baja poliembrionía (BP). La metodología consistió en sembrar bajo invernadero 50 semillas por familia de medio hermanos seleccionados (MHS), eligiendo a estas familias por su proporción PE y mayor germinación. Posteriormente se transplantó utilizando 30 a 35 plántulas por familia. La frecuencia de PE para 1996 fue de 61% para

enanos y 63% en normales, la manifestación más frecuente de la PE fue de dos plántulas por semilla, sin embargo, se indica una tendencia a incrementar los casos de tres o más plántulas.

### **Valor Nutritivo del Grano de Maíz**

El maíz es fuente de carbohidratos y proteínas; estas últimas son de escaso valor biológico por su bajo contenido en dos aminoácidos esenciales: lisina y triptofano. Por lo general, la proteína en el grano de maíz se encuentra distribuida en mayor parte en el endospermo que cuenta con un 75 – 85 % de la proteína total, y en el embrión se encuentra del 15 - 20 % de la proteína total (Reyes,1971).

El hecho de que una semilla de maíz cuente con dos o más embriones reviste gran importancia debido a que en el embrión se concentra la mayor parte del aceite y la proteína de mejor calidad rica en lisina de la semilla de maíz.

El porcentaje del embrión en el grano entero es mayor significativamente en semillas con doble embrión en comparación con semillas monoembriónicas de la misma mazorca, ya que en semillas con doble embrión el porcentaje del embrión en el grano es de 18.70 % y en semillas normales correspondió a 16.96 % por lo que se afirma que el carácter doble embrión hace que la semilla sea superior nutritivamente (Rodríguez, 1981).

Jugenheimer (1981) menciona que el aceite del maíz es un valioso subproducto derivado de la industria del almidón que tiene un alto valor energético para la alimentación del ganado. La mayor parte del aceite se encuentra en el germen de la semilla, las propiedades nutricionales del aceite refinado de maíz lo hacen un alimento valioso y fácil de digerir, las investigaciones sobre las grasas saturadas y su influencia sobre el colesterol han colocado a este aceite en una posición dietética favorable.

Dale (1997) reporta los valores medios de proteína cruda (PC) y extracto etéreo (EE) para varios tipos de maíz estadounidense, entre los que se encuentran: el maíz amarillo con un contenido de PC= 7.9% y un EE= 3.5%, el maíz alto en aceite (Optimum) con 8.4% de PC y 6.3% de EE, y el maíz dentado amarillo con 7.5% de PC y 3% de EE.

Feed & Grain, en su facículo de abril, 1998, hacen mención de las características favorables de la influencia del maíz alto en aceite (HOC, por sus siglas en inglés) en los alimentos para aves. La introducción del HOC se anuncia como una solución potencial para reducir o eliminar la necesidad de añadir grasas de origen animal a las dietas para aves que representa un costo adicional para el productor. Las variedades de HOC contienen entre 6% y 8% de aceite y 8% de proteína cruda. El HOC debe su alto contenido de aceite al incremento en la porción de germen del grano; también hay un incremento correspondiente de 0.38% en proteína por cada incremento de 1% en aceite. Un incremento de 1% en la concentración de grasa cruda resulta por lo general en una disminución de un 1% de almidón. Debido a que la grasa contiene cerca de 2.25 veces más energía que el almidón, el resultado es un incremento en el contenido de energía. El aumento en la fracción del germen a costa del endospermo, mejora la calidad de la proteína de todo el grano de HOC.

Pesev *et al.* (1976) hicieron una comparación del valor nutritivo de las semillas con doble embrión contra granos normales provenientes de la misma línea seleccionada hacia mayor poliembriónía, determinando que las semillas con doble embrión mostraron un mayor incremento en: proteína (4 - 6%), gramos de lisina/100 gramos de materia seca (38 - 70.9%); gramos de lisina/100 gramos proteína (21.3 - 34.0%), y aceite (3.5 - 13.6%).

Los análisis de laboratorio para contenidos de proteína cruda (PC) y grasa (GR) en semillas completas de 30 familias de medio hermanos de los grupos de maíz poliembriónico (PE): enano (braquítico) y normal, muestran una

media general de PC = 11.08% y de GR = 4.46%, lo que indica que la PC de estos maíces es de 6 a 30% más alta que en maíces comunes (amarillos o blancos mexicanos); el contenido de grasa en estos datos ubica también a los maíces poliembriónicos en los niveles superiores de los maíces comunes. La superioridad cuantitativa en PC de los maíces PE puede ser también cualitativa, al incluir más proteína de origen embrionario por la condición de que el 60% de los granos de una mazorca tienen dos o más embriones (Espinoza *et al.*, 1999).

## **Estudios Citogenéticos**

### **Técnicas para elaborar preparaciones**

García (1990) reporta la técnica para el estudio de cromosomas somáticos en ápices radicales de maíz utilizando coloración con carmín-propiónico, método que dá excelentes resultados y produce muy buen contraste entre los cromosomas y el citoplasma, emplea principalmente los siguientes materiales: pretratador 8-hidroxiquinoleína, fijador Farmer, solución colorante carmín propiónico, citasa y ácido propiónico.

Hernández, (1990) describe una técnica para estudios de cromosomas mitóticos, donde utiliza 8-hidroxiquinoleína o paradiclorobenceno como pretratador, fijador Farmer, efectúa la hidrólisis tradicional con HCl 1N a 60° C en intervalos de tiempo, utiliza Feulgen para coloración, citasa como medio para maceración y colorante carmín propiónico.

Dyer (1979) menciona una técnica básica para estudios citogenéticos en tejidos somáticos de plantas, cuyo procedimiento es el siguiente: pretratamiento con colchicina al 0.05% durante 4 – 6 horas a una temperatura inferior a 18° C; fijación utilizando etanol absoluto, cloroformo, formaldehido y ácido acético glacial; para maceración emplea M HCl a 60° C en baño maría; y en el teñimiento utiliza orceína.

## **Cariotipo e idiograma**

El cariotipo de una especie se estudia con el interés de clasificar a los cromosomas con base en las características físicas como son: número de cromosomas, longitudes relativas, posición del centrómero, constricciones secundarias, y otras de menos importancia, que se pueden ilustrar mediante fotografías y dibujos de núcleos metafásicos en mitosis, o de paquiteno en meiosis. En el idiograma el conjunto haploide de cromosomas, es representado mediante un diagrama donde cada cromosoma se muestra en serie decreciente del tamaño y se muestran cada uno por una línea o barra en la que se indica la posición relativa del centrómero, la localización del satélite y constricciones secundarias (García, 1990).

Hayes (1955) llevó a cabo estudios citológicos en maíz, división meiótica, y de donde menciona que los cromosomas que contiene la especie son diferenciables morfológicamente, se caracteriza por diferencias en el largo, en la relación entre la longitud del brazo corto y el brazo largo; los cromosomas se enumeraron del 1 al 10 sobre la base del orden decreciente en la longitud de los mismos siendo el número 1 el más largo y el número 10 el más corto.

Jugenheimer (1981) hace estudios citogenéticos en maíz en la etapa de paquiteno de meiosis, para la creación de un mapa citológico de los cromosomas, donde reporta que los 10 cromosomas que comprende el número haploide o gamético del maíz, son diferenciables morfológicamente por sus longitudes relativas, la localización del centrómero (determinando las posiciones de los brazos), los nudos intensamente teñidos en posiciones características, entre otros; además, reporta en el cariotipo tres cromosomas metacéntricos, cinco submetacéntricos y uno subtelocéntrico, y el cromosoma seis (6) con satélite.

McClintock *et al.* (1981) informan de estudios cromosómicos en maíz con la finalidad de determinar por medio de comparaciones de la constitución cromosómica de plantas de varias razas o variedades, colectadas en sitios donde se desarrolló inicialmente el maíz. El examen cromosómico se hizo en las fases meióticas de paquiteno, y muestran un idiograma de los diez cromosomas del complemento, con posiciones formadoras de nudos, la posición del centrómero, el cromosomas 6 con organizador nucleolar y satélite, y la presencia de los cromosomas 10 anormal, y tipo B.

García (1990) menciona que el cariotipo de un individuo se analiza usualmente en metafase mitótica, aunque algunas especies como el maíz han sido estudiadas en la profase meiótica (en paquiteno); el autor indica que la fórmula cromosómica en maíz es de  $2n=2X=20$ , por lo que es un organismo diploide, con 10 cromosomas no homólogos, el cromosoma 1 que es el de mayor tamaño mide de 8 a 10 micras, y el cromosoma 6 presenta organizador nucleolar y satélite.

## **Poliploidía**

**Mutación.** Este fenómeno de relevancia genética y evolutiva puede definirse de manera sucinta como sigue:

- 1) El proceso por el cual un gene sufre un cambio estructural.
- 2) Un gene modificado resulta de una mutación; y
- 3) Por extensión, el individuo manifestando la mutación. De Vries (1901) adopta el término mutación para describir alteraciones drásticas, repentinas, espontáneas, alteraciones en el material hereditario de especies del género vegetal *Aenóthera*.

La palabra mutación significa en sí, cambio, y se describe como cambios bruscos que afectan la herencia en las plantas y los animales. Son las que dan origen a cualquier cambio hereditario y son por lo tanto la base fundamental de la evolución, existen varios tipos de mutación que se clasifican de acuerdo a la

parte de la célula donde se localizan; una de éstas son las mutaciones genómicas que se describen como cambios en el número total de cromosomas característico de una especie. Puede presentarse porque el conjunto total de cromosomas se repita más de dos veces, dando así origen a una condición poliploide. También puede haber cambios en el número de cromosomas que se refiere a cromosomas completos, pero no a todo el genomio y se conoce como aneuploidías (Brauer, 1986).

Cubero (1999) menciona que los cambios en número de cromosomas se dan por razones diversas, el número total de cromosomas se duplica, una o varias veces. Se originan así los poliploides, de tanta importancia en la evolución, particularmente en plantas. En el caso más simple y más común, una sola duplicación, se tienen los tetraploides. Los nuevos individuos tendrán  $4n$  en lugar de  $2n$  cromosomas, formando gametos  $2n$  cromosomas que al unirse a los normales de  $n$  cromosomas, producen cigotos de  $3n$  (triploides): puede comprenderse con facilidad que el apareamiento entre homólogos se complica pues ahora hay tres copias, y no dos, de cada cromosoma. El resultado es, en muchos de los casos, esterilidad por la mala formación de gametos, o producción de gametos con número desigual de cromosomas.

### **Origen de los poliploides**

Strickberger (1974) menciona que la poliploidía en organismos sexuales se puede deber a la fecundación de un óvulo por más de un espermatozoide; un fallo en la mitosis que duplique el número de cromosomas somáticos de un órgano sexual, con lo que varía el número de cromosomas gaméticos; y un fallo en la meiosis que dé lugar a un gameto diploide en vez de a un gameto haploide.

Fogiel (1989) menciona que la poliploidía es de importancia en la agricultura ya que las plantas poliploides tienen mejor vigor y las flores y frutos son más grandes en comparación con las plantas diploides.

Existen dos tipos de poliploidía: autoploidía y alopoliploidía. La autoploidía se refiere a poliploides donde todos los juegos cromosómicos o genomas son homólogos y la alopoliploidía se refiere a genomas no homólogos que provienen de diferentes especies, aun de diferente género taxonómico.

La poliploidía se produce cuando dos o más espermias fertilizan a un huevo; o cuando en la mitosis falla la separación de cromosomas.

Los triploides ( $3n$ ) con tres genomas completos ocurren cuando una planta tetraploide ( $4n$ ) o un diploide no reducido produce gametos  $2n$  y se unen en la fertilización con gametos normales, de constitución  $n$ . Algunas veces falla la división reduccional en plantas diploides, resultando gametos con más de un solo genoma (Gardner *et al.*, 1984).

Las plantas poliembriónicas pueden tener varios orígenes: a) en el progenitor femenino existe un fallo en la meiosis y se producen células no reducidas (oosfera  $2n$ ); cuando esta se une con el gameto masculino ( $n$ ) produce cigotos triploides ( $3n$ ), pero también las sinérgidas se desarrollan sin fecundación y forman cada una un embrión ( $2n$ ), resultando tres embriones en un solo saco embrionario:  $2n : 3n : 2n$ . b) el saco embrionario normal con los 8 núcleos haploides normales, puede ser fecundado por núcleos germinativos no reducidos que al unirse con la oosfera normal ( $n$ ) forma un embrión  $3n$  y las sinérgidas cada una un embrión  $n$  que daría un trío:  $n : 3n : n$  o que más de un grano de polen ( $n$ ) fecundara a otras dos células femeninas (Dr. A. García Velázquez, comunicación personal ).

Dr. Armando García Velázquez, profesor-investigador titular, laboratorio de citogenética, Programa de Postgrado de Genética, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados (IRGP-CP), Montecillo, Texcoco, México. C.P. 56260.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Características Generales del Lugar de Trabajo**

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en sus instalaciones sede, ubicadas en Buenavista, Saltillo, Coahuila, a 6 Km al sur de la ciudad de Saltillo, localidad que tiene una altitud de 1742 m.s.n.m., latitud Norte 25° 22' y longitud Oeste 101° 00'.

La región sur de Saltillo, que incluye a Buenavista, cuenta con un clima muy seco, semicálido, con invierno fresco, extremoso, con lluvias de verano e invierno. La precipitación total media anual es de 298.5 mm., humedad relativa media de 60% en el año y temperatura media anual de 19.8 ° C; el tipo de clima es BWhw (X') (e): clima muy seco, semicálido, con invierno fresco, extremoso, con lluvias de verano y precipitación Invernal superior al 10 % de la total anual.

La investigación se hizo conjuntamente en los laboratorios de Genética de Drosophila y Citogenética del departamento de Fitomejoramiento de la propia Universidad, en el periodo comprendido octubre 1999 (estudios preliminares) a mayo 2000 (conclusión).

### **Materiales**

#### **Material Biológico**

Se utilizaron semillas de maíz de 30 familias de medio hermanos maternos (FMH) de cada una de las poblaciones de alta poliembrionía, denominadas:

BAP (braquíticas) y NAP (normales), pertenecientes al ciclo O-I 1998/1999, generadas en la localidad de Villa Hidalgo, Nayarit. Cada familia se representó por 26 semillas, tomadas al azar, mismas que fueron colocadas en toallas de papel y humedecidas para germinación.

## **Reactivos**

**Pretratador.** El pretratador es un agente químico que se utiliza con el propósito de lograr un acortamiento adecuado de los cromosomas, además de influir para lograr suficientes metafases y anafases en ápice de raíz, que son las fases de la división celular donde con mayor claridad se distinguen las constricciones cromosómicas, y se facilita el estudio detallado del número y del cariotipo. Existen métodos físicos o químicos para pretratar cromosomas y en este caso se utilizó la 8-Hidroxiquinoleína al 0.04 %.

**Fijador (Farmer).** La función de los fijadores es la de detener los procesos vitales, preservando ciertas estructuras con un mínimo de alteraciones. Estos agentes químicos o fijadores consisten de varios ingredientes en diversas proporciones, en este caso se utilizó el fijador de Carnoy, fórmula sin cloroformo conocida como Farmer, que consta de tres partes de alcohol etílico absoluto y una parte de ácido acético glacial.

**Colorante.** La coloración se emplea debido a que los cromosomas son poco visibles a causa de que su densidad es muy similar a la del citoplasma. Para la coloración de los cromosomas en este estudio se utilizó carmín-propiónico que es una solución de carmín y ácido propiónico cuyas partes se conforman de 100 ml de ácido propiónico 45 % al que se le agrega 0.5 a 1.0 g de carmín; esta solución se deja hervir a fuego lento por espacio de tres a cuatro horas, se enfría y se filtra. Después se almacena en un frasco color ambar bajo refrigeración.

**Citasa.** La citasa es un complejo de enzimas que sirve como medio para la maceración de tejidos vegetales, actuando sobre la lámina media celular para la separación fácil de las células. Este complejo enzimático se obtiene del estómago del caracol de jardín (*Helix spp.*). La citasa puede utilizarse directamente y sin hacer ninguna dilución, sin embargo durante el almacenamiento en refrigeración llega a deshidratarse, sin perder por esto sus propiedades, y para restaurar su estado líquido se agrega un poco de agua destilada.

**Otros Materiales y Equipo.** Se utilizaron diversos materiales durante todo el proceso, como son:

- 1 agua destilada.
- 2 papel absorbente para germinación.
- 3 papel filtro.
- 4 frascos de vidrio, diferentes capacidades.
- 5 tubos de ensayo de fondo plano, capacidad de 10 ml.
- 6 bisturí y espátula.
- 7 portaobjetos y cubreobjetos.
- 8 mechero de alcohol.
- 9 microscopio compuesto.
- 10 aceite de inmersión.
- 11 Parafina.
- 12 Incubador, temperatura controlada a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

## **Métodos**

### **Pruebas preliminares**

Al inicio de este trabajo de investigación se germinaron las semillas en papel absorbente y al tercer día cuando las semillas tenían una punta de raíz de aproximadamente un centímetro, aun sin haber plántula, se hicieron los cortes de ápices radiculares. Después, se siguió la metodología para el estudio de cromosomas somáticos donde se efectúa la hidrólisis tradicional con HCl 1N a  $60^{\circ}\text{C}$  y coloración con Feulgen además de carmín propiónico.

Con este procedimiento no se tuvo éxito en la observación de cromosomas debido a que la hora del día (8:15 a 8:45 hs) en que se realizaron los cortes no fue la apropiada para la aparición de metafases; sólo se observó casos de fases tardías de la división celular; además de esto, la etapa de germinación de las semillas no era la adecuada para los fines de calificar casos de plántulas múltiples por semilla, lo cual requiere que las semillas germinen y exhiban plántulas con al menos un par de hojas.

A partir de estos resultados se reorientó el trabajo hacia formas que permitieran realizar pruebas a diferentes etapas de desarrollo de plántulas con siete y nueve días de germinación, y cortes de raíz a intervalos de tiempo de 15 minutos en el horario de ocho a diez de la mañana, durante el mes de diciembre de 1999. También en esta ocasión se tuvo la oportunidad de practicar otra técnica más sencilla que es la, descrita por García (1999), donde se utiliza coloración con carmín-propiónico.

Los resultados de estas pruebas fueron muy favorables, ya que permitieron la observación de suficientes células en metafase en casos de plántulas de nueve días de germinación y a las nueve de la mañana, llevar a cabo conteos cromosómicos, además de abundantes raíces por plántula y no una como en el caso descrito previamente. Se continuó utilizando la técnica de coloración con carmín-propiónico haciendo unas modificaciones en cuanto al tiempo de permanencia de los ápices en pretratador, que fue solo de tres horas, en lugar de 8 - 10 horas, y en citasa, de 12 horas, esto para lograr una mejor maceración o separación de células.

### **Procedimiento efectivo**

Las familias de medio hermanos maternos utilizadas, se evaluaron por grupos de cuatro familias a la vez, los que se germinaron cada ocho días en rollos de germinación utilizando papel absorbente estéril. Del archivo de

semillas de cada familia se tomaron al azar 26 granos y se dispusieron en dos tacos de 13 semillas para un mejor desarrollo de las plántulas. La germinación se hizo en el cuarto de incubación del laboratorio de genética de *Drosophila*; ahí se mantuvieron con luz artificial blanca permanente, a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  y riegos empapando con agua potable a los rollos cada tercer día.

Al noveno día de la siembra, se cuantificó la germinación, teniendo plántulas desarrolladas con un mínimo dos hojas, identificando así los casos individuales y poliembriónicos; se hicieron los cortes de puntas de raíz (con ayuda de un bisturí y portaobjetos) de tres plántulas fenotípicamente anormales (poco vigor, deformes, etc.) y una normal tomadas al azar de cada familia, en horario de 9:00 a 9:20 hs. durante febrero y marzo, y de 10:00 a 10:20 en días de abril a junio del 2000 tiempo oficial de verano en Saltillo, México.

Las muestras de ápices se colocaron en solución pretratadora de 8-Hidroxiquinoleína al 0.04%, en frascos por separado y debidamente identificados, durante tres horas. Una vez teniendo las muestras, se tomaron datos en cuanto a semillas germinadas, plántulas anormales, normales y, dentro de éstas, los casos de dos o más plántulas por semilla. Después, se hizo el cambio de los ápices a fijador Farmer enjuagando previamente con agua destilada; aquí permanecieron 12 horas, cambiándolos posteriormente a tubos de ensayo de fondo plano con carmín-propiónico, retirando antes el fijador y habiendo enjuagado los tejidos.

En carmín propiónico se mantuvieron por espacio de dos horas, y después se procedió a calentar por cuatro a seis ocasiones casi a ebullición, colocándolos directamente al mechero con espacios de 10 a 12 segundos por ocasión.

Al terminar este proceso, las muestras se lavaron con agua destilada nuevamente para luego agregar la citasa, condición bajo las que se mantuvieron en refrigeración por espacio de 12 horas, buscando una mayor

seguridad en la maceración de las células. Por último, se retiró la citasa, se enjuagaron las muestras, y se agregó nuevamente carmín-propiónico. Es en este estado que las muestras estuvieron listas para la evaluación cromosómica.

A partir del cambio a fijador, el resto del procedimiento se hizo en el Laboratorio de Citogenética del departamento de Fitomejoramiento.

### **Preparaciones citológicas**

Se elaboraron tres preparaciones como mínimo por cada plántula y al observar a aquéllas al microscopio, se contaron los cromosomas de 10 a 15 células por caso.

En el procedimiento para hacer las preparaciones se utiliza como medio de montaje la solución colorante (carmín-propiónico 45 %), después se da un calentamiento directo al mechero y se hace el aplastado de la muestra de una manera uniforme procurando que el cubreobjetos no se mueva de lugar, se utiliza ácido propiónico en caso de que la preparación quede muy coloreada, si ésta se quiere preservar por poco tiempo, se procede a sellar los bordes con parafina caliente para evitar la evaporación del colorante. Si se desea elaborar como muestra una preparación permanentemente, se retira la parafina de los bordes, se sumergen el porta y cubreobjetos en ácido acético por tres días hasta que éstos se separen; una vez separados, se pasan a alcohol butílico terciario y alcohol etílico absoluto 1 a 1 de tres a cinco minutos, después a alcohol butílico terciario I y a alcohol butílico terciario II, dejando transcurrir la misma cantidad de tiempo en cada uno; por último se coloca una gota de bálsamo de Canadá (resina) y se monta nuevamente la preparación. Para retirar el exceso de resina se dejan secar las preparaciones por varios días, removiendo el material seco de los bordes con ayuda de un bisturí.

## Cariotipo

El estudio para definir el cariotipo, se hizo a partir de microfotografías de cinco células distintas, tres repeticiones cada una, donde se midió la longitud de los cromosomas en milímetros con ayuda de un vernier, luego se hizo el arreglo de aquéllos en orden decreciente por longitud, enumerándolos progresivamente, y clasificándolos de acuerdo a la posición del centrómero.

La conversión de milímetros a micras se obtuvo mediante la siguiente ecuación:  $\mu\text{m} = ((X/(A/N)) * C$

Donde:

X= longitud del cromosoma en milímetros sobre la fotografía.

A= medida en milímetros del largo de la fotografía ampliada.

N= medida en milímetros del largo del negativo.

C= número de micras que hay en cada milímetro del negativo obtenido en base al campo de observación, con el objetivo de 100X con que fue tomada la fotografía. ( Dr. M. Humberto Reyes Valdés, comunicación personal).

Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés, Profesor Investigador Titular A., laboratorio de Análisis de Genomas Vegetales, Departamento de Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de los estudios citogenéticos practicados en tejido apical de plántulas de maíces poliembriónicos se presentan en este capítulo con respecto a los temas siguientes: conteo cromosómico, análisis de cariotipo, modificaciones de la técnica para estudios cromosómicos mitóticos en maíz, además de las características sobre germinación y frecuencia de poliembriónía de los grupos NAP y BAP y la presencia de plantas triploides en una de las familias de la población BAP.

### Conteo Cromosómico

De las 120 plántulas analizadas en 360 casos estudiados (tres preparaciones citológicas por especimen) de las 30 familias de medio hermanos NAP, no se encontró ninguna alteración en número de cromosomas, mostrando todas la constitución diploide ( $2n = 2X = 20$ ), como se puede apreciar en las Figuras 4.1,4.2.

La misma condición se presentó en las 29 familias de medio hermanos BAP (Figs. 4.3;4.4); sin embargo en un caso de plántula normal, proveniente de la familia denominada BAP-200, se observó la existencia de células que presentaron la condición triploide ( $2n = 3X = 30$ ), véase las Figuras 4.5,4.6.

Debido a la forma en que se tomaron inicialmente las muestras de tejido apical para el estudio no fue posible identificar si el caso correspondía a una plántula poliembriónica o una individual. Con el interés de dilucidar si la triploidía observada era un mero accidente o un fenómeno generalizado en la

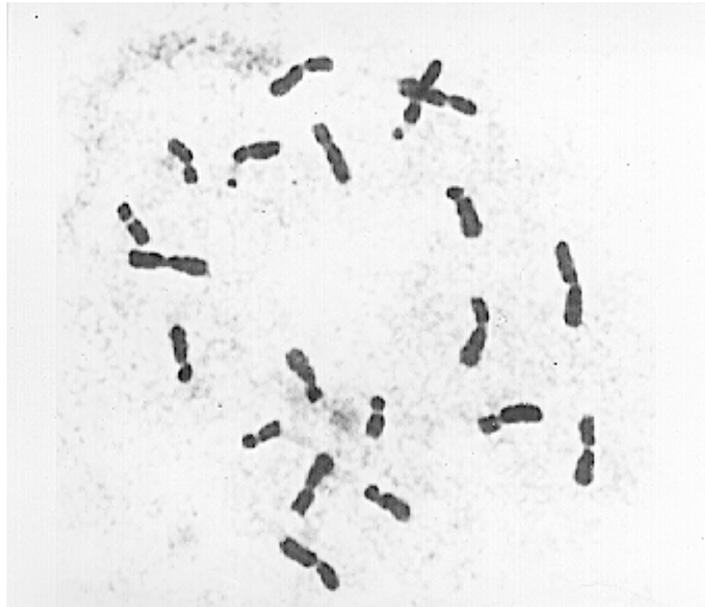


Figura 4.1 Cromosomas en célula diploide, metafase mitótica de la familia NAP-89

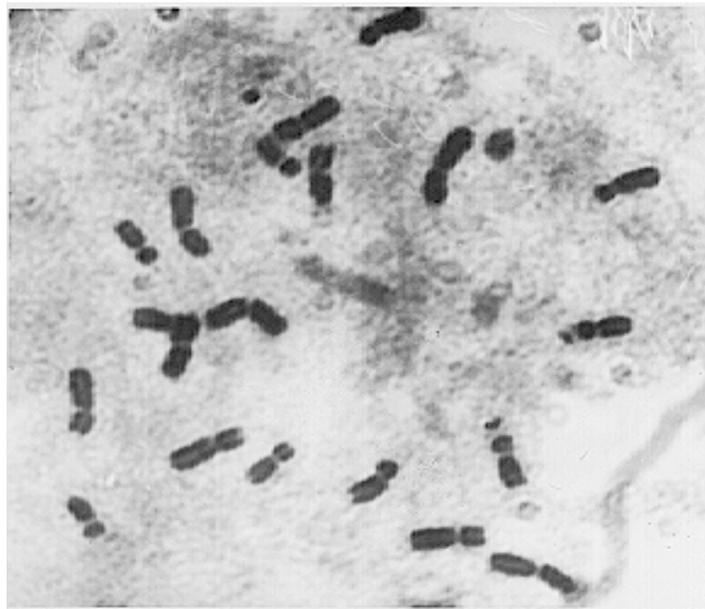


Figura 4.2 Cromosomas en célula diploide, metafase mitótica de la familia NAP-132



Figura 4.3 Cromosomas en célula diploide, metafase mitótica de la familia BAP-137.

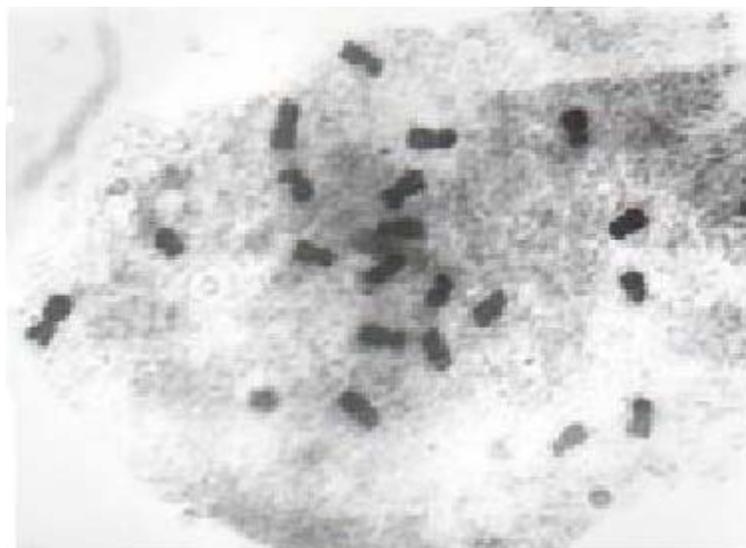


Figura 4.4 Cromosoma en célula diploide, metafase mitótica de la familia BAP-168.

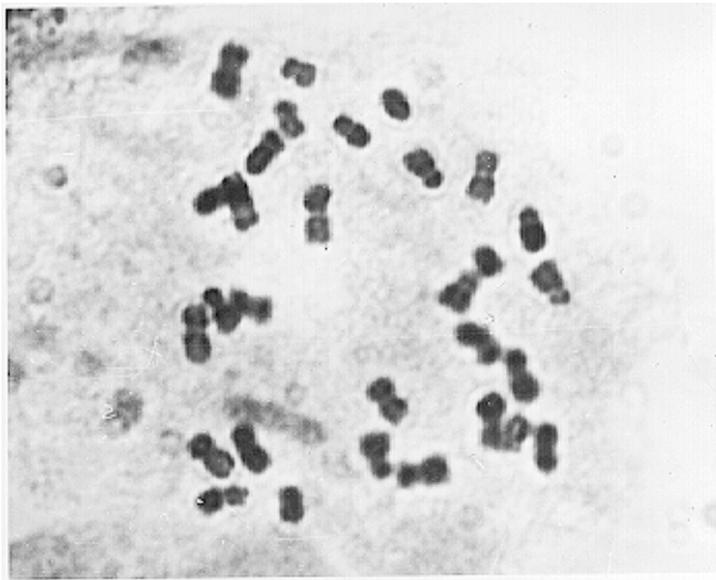


Figura 4.5 Contenido cromosómico en célula triploide, metafase mitótica de la familia BAP-200.

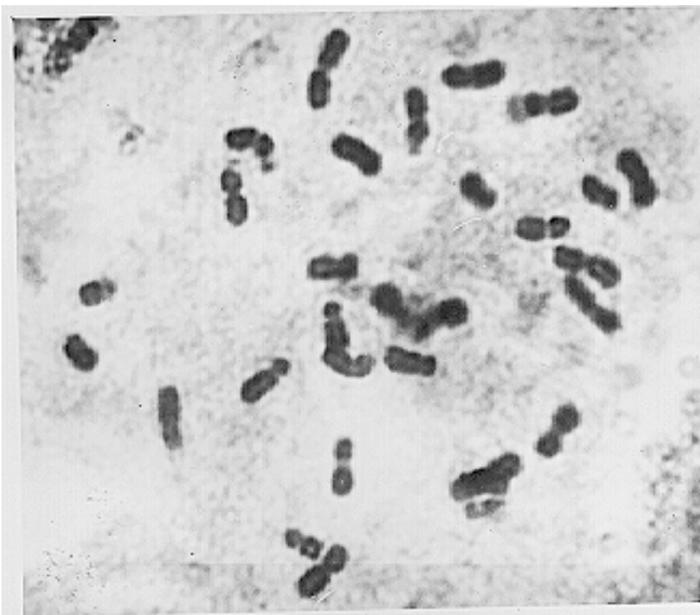


Figura 4.6 Contenido cromosómico en célula triploide, metafase mitótica de la familia BAP-200.

familia mencionada, se decidió repetir la experiencia, a partir de una muestra de semillas de la familia BAP-200.

En esta ocasión se utilizaron 40 semillas, haciéndolas germinar en grupos de 10 en cuatro “tacos” de papel; de las plántulas desarrolladas hasta el noveno día, se tomó al azar ocho plántulas de apariencia anormal; cuatro de tipo normal y una plántula por semilla; ocho de crecimiento normal pero dos plántulas por semilla; y cuatro de crecimiento normal pero tres por semilla. Una vez clasificadas, se tomó ápices de cada plántula, y se le aplicó el mismo procedimiento de inspección cromosómico descrito en la sección anterior.

El estudio practicado arrojó los siguientes resultados: en una de las plántulas originadas como triples se determinó la condición triploide ( $2n=2X=30$ ), mientras que en el resto de los casos se observó un conteo cromosómico correspondiente a maíz diploide ( $2n = 2X = 20$ ). Considerando el total de muestras en la familia BAP-200, donde se analizaron los ápices radicales de un total de 28 plántulas distintas, los dos casos triploides observados permiten suponer que este fenómeno, en esta familia, se presenta con frecuencia de 7.1 %. Si la mazorca que dio origen a la familia de BAP-200 tuvo un total de 420 granos, parece razonable proyectar que alrededor de 30 de ellos fueron de condición triploide.

La ocurrencia confirmada de triploides en la familia BAP-200 requiere de una explicación sobre las causas de esta euploidía. El manejo experimental de plántulas para la toma de muestras para indagación cromosómica, no incluyó el trasplante de las mismas a macetas de invernadero o a campo, de tal suerte que pudiera observarse a cada una de ellas en su desarrollo, incluyendo floración y producción. Sin embargo, se puede enumerar algunas de las causas más probables para la ocurrencia del fenómeno, como sigue: 1) La fertilización de una oosfera reducida por un núcleo generador no reducido; 2) La fertilización de una oosfera no reducida por un núcleo polínico reducido; 3) La fertilización

de los núcleos polares o de fusión del saco embrionario por un núcleo del tubo polínico normal. En opinión de García Velázquez (Op. Cit., pag.17), las causales más probables son las primeras dos enunciadas aquí. Para dilucidarlo, será necesario recurrir al archivo de semillas de BAP-200 y estudiar a partir de ellas la mitosis y meiosis, así como su desarrollo vegetativo completo.

Por otra parte, es de importancia señalar que en el estudio respectivo de todos los ápices radicales pertenecientes a plántulas calificadas como “anormales” en todas las familias, de las dos poblaciones NAP y BAP, incluidas en este trabajo, no se detectó ninguna desviación del número cromosómico diploide, ni tampoco pudo detectarse aberración alguna. El tamaño de la muestra sobre este particular es considerado como adecuado y representativo de las dos poblaciones, ya que se estudiaron ápices de 188 plántulas anormales, lo que significa un mínimo de 564 preparaciones y cuando menos 5640 células observadas. La información obtenida en este trabajo permite afirmar que la condición anómala de plantas en los grupos poliembriónicos bajo estudio no tiene relación con alteraciones cromosómicas, donde está ausente, desde luego, la condición de monoploidía. Esto es relevante ya que se conoce que en linajes de maíz con el gen "ig" en homocigosis, las plantas portadoras tienden a presentar frecuencias de monoploides, 3% y poliembriónía, 6% (Hallauer y Miranda, 1981; Pollacsek, 1992).

### **Análisis de Cariotipo**

De acuerdo al procedimiento descrito en el Capítulo anterior, se presentan en el cuadro 4.1 las medidas en micras de los diez cromosomas observado en las muestras de tejido apical de maíces poliembriónicos, ordenados en forma descendiente de tamaño y la medida respectiva de sus brazos largo y corto.

Los resultados del análisis del cariotipo realizado en este trabajo a partir de microfotografías del complemento cromosómico de las plántulas diploides

Cuadro 4.1, Medidas en micras del complemento cromosómico en ápices radicales de plántulas de maíz poliembriónico.

Cromosoma número	Longitud ( $\mu\text{m}$ )		
	Total	Braço largo	Braço corto
1	4.5	2.5	2
2	4	2	2
3	4	2.5	1.5
4	3.5	2	1.5
5	3	2	1
6	3	2	1
7	3	2	1
8	3	2	1
9	2.5	1.5	1
10	2	1.5	0.5

**Cuadro 4.2 Descripción del complemento cromosómico de maíz poliembriónico (*Zea mays* L.)  $2n=2X=20$ .**

Cromosoma número	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
Brazo	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C
Tamaño relativo (%) (total = 100)	7.7	6.1	6.1	6.1	7.7	4.7	6.0	4.7	6.1	3	6.1	3	6.1	3	6.1	3	4.7	3	4.7	1.5
Relación de brazos L:C	1:1		1:1		2:1		1:1		2:1		2:1		2:1		2:1		2:1		3:1	
Posición del centrómero	Medio		medio		submedio		medio		submedio		Submedio		submedio		submedio		submedio		Subterminal	
Tipo de cromosoma	MC		MC		SC		MC		SC		SC		SC		SC		SC		ST	

**L = brazo largo; C = corto; MC = Metacéntrico; SC = Submetacéntrico; ST = Subtelocéntrico.**

son similares a los reportados en la literatura (McClintock y Kato, 1981) y en donde no se detectó anomalía alguna. El Cuadro 4.2 presenta la descripción respectiva, en el orden siguiente:

- Clasificación en orden decreciente de tamaño de los diez cromosomas que comprenden el número haploide.
- El tamaño relativo de cada cromosoma dentro del genoma, estimado en porcentaje con respecto a la longitud total del genoma, tomada como 100%.
- Relación de brazos, para determinar la posición del centrómero.
- Posición del centrómero: cromosomas 1,2 y 4 medios, 3,5,6,7,8, y 9 submedios y el cromosoma 10 subterminal.
- Tipo de cromosoma en relación con la posición del centrómero: cromosomas 1,2 y 4, metacéntricos, 3,5,6,7,8, y 9, submetacéntricos y el cromosoma 10, subtelocéntrico.

En las Figuras 4.7 y 4.8 se muestra el ordenamiento de los diez cromosomas básicos del maíz; la primera muestra el complemento cromosómico representado cada uno por barras, donde se puede apreciar la posición del centrómero de cada uno de ellos, el organizador nucleolar y satélite, localizados en el cromosoma 6, y el ordenamiento de tamaño del cromosoma más grande (1) al más chico (10). La segunda es una composición elaborada a partir de microfotografías que muestra el arreglo de cada par de cromosomas homólogos, ordenados en forma descendiente por tamaño.

Es pertinente aclarar que el método elegido aquí para el análisis cariotípico fue el más apropiado para lograr mediciones de los cromosomas debido al tamaño demasiado pequeño de los mismos. Por otra parte, al intentar las mediciones por medio del microscopio (micrómetros ocular y objetivo) sólo se pudieron medir los cromosomas 1-3 que son los de tamaño más grande y se estimaron en 4.8 y 3.6 micras. Estos datos son similares a los encontrados por el método de microfotografías que aquí seguimos, característica que permite una prueba de que las mediciones de cromosomas por medio de fotografías es

Cromosoma: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

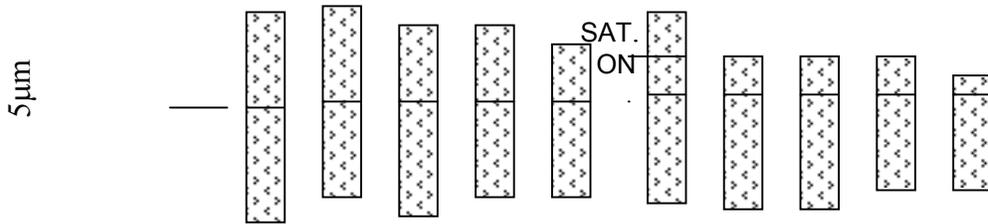


Figura 4.7 Idiograma de cromosomas somáticos de maíz poliembriónico  $2n=2X=20$ , cromosomas ordenados por tamaño decreciente, y posición del centrómero. El cromosoma 6 con organizador nucleolar y satélite.

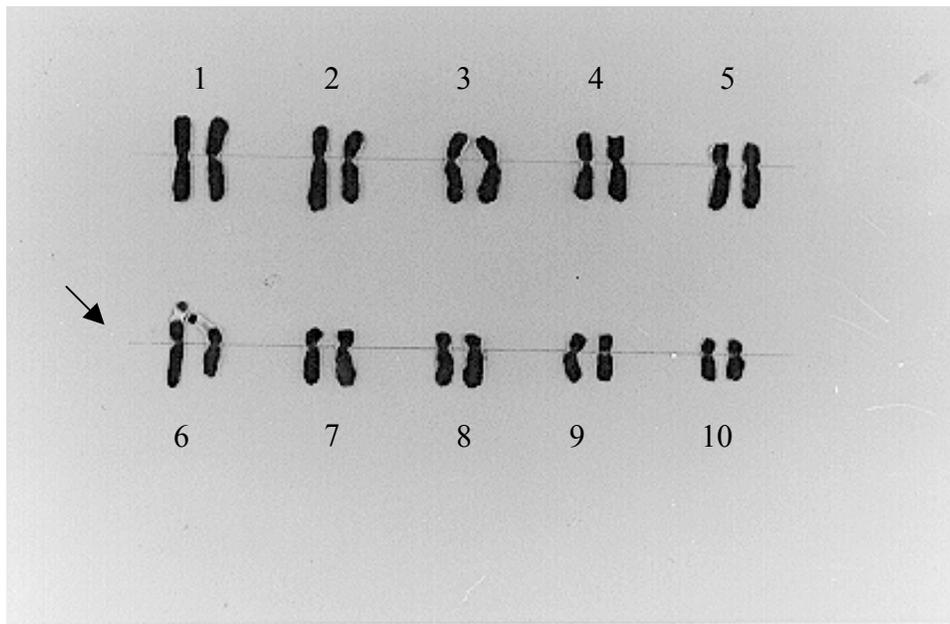


Figura 4.8 Fotografía de los diez pares de cromosomas homólogos de maíz, magnificación en 100 X, cromosoma 6 satelado.

aceptable y conveniente para conocer la longitud de cromosomas muy pequeños cuando sólo se cuenta con la ayuda del microscopio compuesto.

En este estudio el cromosoma más grande (1) se estimó en 4.5 micras de longitud, mientras que en la literatura se reporta la longitud para este mismo cromosoma en 10 micras. Al respecto puede señalarse que esta diferencia pudo causarse por una mayor permanencia de los tejidos en pretratador, provocando un acortamiento excesivo de los cromosomas. Otra causa probable es la edad del tejido utilizado, que en este trabajo fue al noveno día post-siembra en lugar del común para estudios de cromosomas mitóticos que es de 3 a 4 días.

### **Modificaciones de la Técnica para Estudios**

#### **Cromosómicos en Maíz**

Antes de iniciar el trabajo de investigación probando con semillas de maíz ordinario, se siguieron las recomendaciones del proceso para los estudios citogenéticos que comúnmente se practican en el área de trabajo donde se realizó este estudio. Pero el procedimiento no era el más adecuado para los fines que requería el trabajo que aquí se presenta. La técnica que comúnmente se sigue en el laboratorio en cuestión utiliza semillas de máximo tres días de germinación, cuando la radícula aparece con aproximadamente un centímetro de longitud, sin haberse expresado todavía la plántula. En el caso de esta tesis la evaluación en plántulas desarrolladas era indispensable para calificar los casos de plántulas múltiples (poliembrionía) y detectar a plántulas anormales.

Con este propósito, se procedió a identificar la marcha más adecuada que permitiera que los embriones germinados por semilla se desarrollaran hasta la condición de plántula de dos hojas primarias. Como se dijo antes, la germinación fue en toallas de papel especializado para el propósito,



Figura 4.9 plántula de nueve días de desarrollo; tamaño que se utilizó para el análisis citológico en ápice de raíz.

estériles, y con humedad permanente (tacos de germinación), bajo condiciones de temperatura controlada, ( $25^{\circ} \text{ C} \pm 1^{\circ}$ ). Así, se probó la hechura de preparaciones citológicas a diferentes tiempos, al noveno día de siembra, logrando establecer que a esta edad, en horario de 9:00 a 9:20 hs durante febrero y marzo, y 10:00 a 10:20 hs en mayo-junio (tiempo oficial de verano en Saltillo), se puede obtener preparaciones citológicas que permiten observar células en división mitótica (Fig. 4.9).

Como se describió en la sección correspondiente del capítulo anterior, en este estudio se siguió una técnica distinta a la convencional, ya que es más sencilla y de aplicación más rápida, y permite que las células se separen adecuadamente, los cromosomas se teñían perfectamente y la separación de éstos fuera buena para los conteos y su estudio individual. Otra característica favorable de esta técnica es el ahorro de reactivos en comparación con la utilizada en los estudios preliminares.

#### **Características Generales de Poliembriónía y Germinación de los Grupos NAP y BAP Utilizados en este Trabajo**

En cuanto a la caracterización física de los dos grupos poliembriónicos NAP y BAP al noveno día postsiembra, se muestran las variables: porcentaje de germinación para cada uno de los grupos, que resultó superior al 95 %; la frecuencia de semillas que exhibieron dos o más plántulas es ligeramente superior a 50 % y los casos de tres a más embriones superan el 15 %, (Cuadro 4.3).

Destacable también el hecho de que la proporción de plántulas anormales es del orden de 25 %, condición al menos 10 puntos arriba de los porcentajes que se observan

con estos materiales, cuando se les maneja en charolas de germinación, bajo condiciones de invernadero.

Cuadro 4.3. Valores porcentuales promedio de variables de interés en plántulas de maíz poliembriónico, observadas al noveno día postsiembra en tacos de germinación.

<b>Población</b>		
Variable	BAP	NAP
Germinación	98 ± 4	98 ± 3
Poliembrionía	54 ± 14	53 ± 11
Dos plántulas	84 ± 14	83 ± 12
Tres o más plántulas	16 ± 14	17 ± 12
Plántulas individuales	25 ± 12	24 ± 9
Plántulas anormales	21 ± 13	23 ± 11

Datos de 30 familias por grupo, 26 semillas por familia.

Los resultados obtenidos en estos muestreos en familias de medio hermanos de las poblaciones BAP y NAP, ratifican los altos niveles de poliembrionía que han alcanzado estos grupos por efecto de la selección artificial.

Es importante señalar la diferencia de criterios de calificación que se prosiguieron aquí para plántulas anormales, con los que se practican en siembras de invernadero, utilizando este mismo tipo de materiales.

En invernadero, si una semilla poliembriónica presenta al menos una plántula de tipo normal, se califica como caso poliembriónico, mientras que en este trabajo las semillas germinadas en toallas de papel, la calificación de anormalidad se aplicó a casos de plántulas defectuosas, que germinaban “arrepolladas”, o raquílicas, aunque fueran más de dos plántulas y una de ellas tuvieran la apariencia normal. Esto se hizo con la finalidad de contar con un número mayor de plántulas anormales y practicar un muestreo aleatorio más amplio, procurando aumentar la posibilidad de encontrar alteraciones cromosómicas en este tipo de plántulas. Como ya se estableció antes no se detectaron cambios cromosómicos en los estudios citológicos de ápices radicales de plántulas clasificadas como anormales, fallando en una de las expectativas de este trabajo al no detectar monoploides en estos especímenes. De acuerdo con la literatura (Hallauer y Miranda, 1981) la condición homocigótica recesiva del gen "*ig*" propicia la ocurrencia del tres por ciento de monoploides y de seis por ciento de poliembrionía. En las poblaciones estudiadas (BAP y NAP), la poliembrionía rebasa el 50 % y no se detectó ningún monoploide; esto podría indicar que las poblaciones BAP y NAP carecen del gen *ig*.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, lo más relevante de la investigación fue:

En el conteo cromosómico realizado no se encontraron aberraciones cromosómicas, ni la presencia de monoploides. Esto muestra que las anomalías observadas en algunas plantas de las poblaciones poliembriónicas estudiadas, no se deben a la condición haploide de sus células, ni a cualquier otro cambio en la morfología de los cromosomas.

Sólo la familia BAP-200 registró triploidía en dos plántulas de un total de 20 casos muestreados. Esta condición de ploidía es atípica en el maíz, por lo que es recomendable analizar la meiosis en las plantas de esta familia para conocer mejores detalles en su comportamiento reproductivo.

Con este hallazgo se puede confirmar la hipótesis que la poliembrionía está ligada a euploidías, es decir está asociada a cambios en número de juegos completos de cromosomas.

Es recomendable hacer estudios citogenéticos en mitosis considerando una muestra más amplia de progenies de la familia BAP-200 así como de otras familias de ambos grupos poliembriónicos (BAP y NAP), para aumentar la probabilidad de encontrar plantas con diferente nivel de ploidía al común,  $2n = 2x = 20$ .

En el análisis del cariotipo se presenta el tamaño de los cromosomas desde el más grande ( $4.5 \mu\text{m}$ ) hasta el más pequeño ( $2\mu\text{m}$ ) y el tipo de

cromosomas de acuerdo a la posición del centrómero (metacéntrico, submetacéntrico y subtelocéntrico), coincidentes con los de la literatura publicada.

Las poblaciones BAP y NAP analizadas presentan poliembrionía promedio superior a 50 % con una germinación superior al 98 %.

En la técnica utilizada para el conteo de cromosomas se hicieron modificaciones en cuanto al aumento de los días de germinación de las semillas para poder observar plántulas desarrolladas con al menos un par de hojas, razón por la cual también se modificó el tiempo de permanencia en pretratador y citasa. Estas modificaciones pueden adaptarse a otros casos donde sea necesario identificar a las plántulas en etapas mayores de desarrollo.

## LITERATURA CITADA

- Brauer H.,O. 1969. Mutaciones, Fitogenética Aplicada, Ed. Limusa. P. 313.
- Castro G.,M. 1979. Estudio sobre herencia y valor nutritivo de semillas con doble embrión. Avances de investigación en maíz. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. pp. 24 –25.
- Castro G., M. 1978. Incremento del carácter doble embrión. Boletín Técnico No. 1. Escuela Superior de Agricultura Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. 47 pp.
- Cubero J., I. 1999. Cambios en la estructura o número de cromosomas y apomixis. Introducción a la mejora genética vegetal. Madrid, España. pp. 61; 180 – 183.
- Dale, N. 1997. Ingredient analysis table. Feedstuffs Reference Issue. Vol. 69, No. 30: 24 –31.
- Dyer F., A. 1979. Finding Chromosomes a matter of method. Investigating Chromosomes. p.
- Espinoza, J.; M.C. Vega.; E. Navarro; G.A. Burciaga. 1998.Poliembrionía en maíces de porte normal y enano. Agronomía Mesoamericana 9 (2): 83 – 88 .
- Espinoza, V. J.; M. C. Vega S.; D. Jasso C. 1999. Contenidos de grasa y proteína cruda en semillas de maíces poliembriónicos. Memoria del Segundo Taller Nacional de Especialidades de Maíz. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. pp. 159 - 165.
- Feed&Grain. 1998. La influencia del maíz alto en aceite en los alimentos para aves. Revista para fabricantes de alimentos balanceados, operaciones integradas y procesadores de grano. pp. 4-7.

- Fogiel, M. 1989. Polyploidy and aneuploidy. The Genetic Problem Solver. Staff of Research and Education Association. New York, U.S.A. pp. 42 – 46.
- Gardner, E. J.; M. J. Simmons.; D. P. Snustad. 1984. Polyploidy in Plants. Principles of Genetics. p. 524.
- García, V. A. 1990. Estudio de cromosomas somáticos en ápices radicales de maíz. Técnicas y procedimientos de citogenética vegetal. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. pp. 87 – 88.
- Gómez, G. J. R. 1983. Estudio sobre herencia y valor nutritivo de semilla de maíz con doble embrión. Avances de investigación en maíz. Instituto Mexicano del Maíz. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. pp. 77.
- Hallauer, A. R., and J. B. Miranda. 1981. Quantitative Genetics in Maize Breeding. 1<sup>st</sup>. Edition. Ames, Iowa. The Iowa State University Press. p.14.
- Hayes, K.H.; R. Immer, F. 1955. Estudio sobre el ligamiento en el maíz. Métodos Fitotécnicos. Pp. 276 – 286.
- Hernández, S.M. 1990. Elaboración de preparaciones cromosómicas en vegetales. Manual de laboratorio, citología y citogenética. Ed. Trillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México. pp. 65 – 67.
- King, R. C.; W. D. Stanfield.1990. A Dictionary of Genetics. Fourt edition. Oxford University Press N. Y. p 247.
- Lincoln, R. J.; G.A. Boxshall; P. F. Clark. 1995. Diccionario de Ecología, Evolución y Taxonomía. Ed. Fondo de Cultura Económica. Traducción del inglés por: C. Domínguez; A. de Alba; y M. A. P. México. p. 346.
- Morgan, D.T.; Rapleye, R. D. 1951. Polyembryony in Maíz and Lily, following X-irradiation of the Pollen. Jour. Hered. 41: 90 – 93.

- McClintock, B.; T. A. Kato; A. Blumenschein. 1981. Constitución cromosómica de las razas de maíz. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. pp 13 -17.
- Pesev, N.; R. Petrovic; L. Secevic; M. Milosevic. 1976. Study of Possibility in Raising Maize Inbred Lines with Two Embryos. Theoretical and Applied Genetics 47: 197 - 201.
- Rodríguez, H., S.; M. Castro. G. 1978. Estudio sobre herencia de semillas con dos embriones. Avances de investigación en maíz. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. p. 19.
- Rodríguez, H. S. A.1981. Determinación de la heredabilidad y efectos de la selección para el carácter doble embrión en maíz (*Zea mays L.*). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. p. 48.
- Sánchez, R. G.; F.A. Martínez M.; L. A. López I. 1998. Oportunidades de Desarrollo del Maíz Mexicano. Alternativas de Competitividad. FIRA Boletín Informativo. Vol. XXX, No. 309. Morelia, Michoacán. México. 88 pp.
- Strickberger, M. W. 1974. Variación del número de cromosomas. Genética. Universidad de Missouri. Traducción del inglés por: M. Aguade. Universidad de Barcelona. Pp. 465 - 468.
- Tron, J. E.1999. Nuevos Tipos de Maíz para la Industria Perspectivas y Espectativas. Memoria del Segundo Taller Nacional de Especialidades de Maíz. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. pp. 17 – 34.
- Webber, J. M. 1940. Polyembryony. The Botanical Review. Vol. VI, No. 11: 575 – 594.



