

## Cultivo “ In Vitro” de maíz

### Maize “In Vitro” culture

Ma. Elena González Guajardo<sup>1</sup>, Humberto de León Castillo<sup>1</sup>

#### Resumen

El proyecto Cultivo “in vitro” de maíz utiliza diversas técnicas de laboratorio como son: cultivo de tejidos vegetales, métodos de densidad, selección para resistencia a enfermedades y evaluación para tolerancia a sequía. Para la determinación de cada una de las técnicas inherentes se realizaron estudios preliminares, para determinar condiciones de laboratorio, umbrales de toxicidad, presiones osmóticas requeridas, concentración de soluciones de densidad variable, tamaño y condiciones de muestra, número de repeticiones por experimento, variables a medir y el tiempo que tardaría cada uno de los procesos. Este proyecto encierra actividades del área exploratoria y los resultados son entregados al fitomejorador que lo solicita para que él haga uso de ellos, aplicándolos a los materiales que contempla en su proyecto de investigación y de esta manera contribuir al programa de mejoramiento genético del Instituto Mexicano del Maíz.

**Palabras Clave:** Resistencia, tolerancia, cultivo de tejidos vegetales, umbral de toxicidad, presión osmótica.

#### Abstract

The pilot project “in vitro” corn culture uses different laboratory technics like: vegetable tissue culture, variable density methods, selection for diseases and drought resistance evaluation. For the determination of each one of the inherent technics, preliminary studies were carried out to determinate laboratory conditions-toxicity –point, osmotic-pressure request, concentration of variable density solutions, size and conditions of sample, number of repetitions per experiment, variables for measure and time that each of the processes would take. This pilot project closes activities of the exploratory area and the results are delivered to the plant breeding researchers for the best use of them. The plant breeding researchers apply these results to their materials that they contemplate in their research project and in this way make their contribution for the Mexican Corn Institute genetic improvement.

**Key words:** Resistance, tolerance, vegetable tissue culture, toxicity threshold, osmotic presion

#### Introducción

A. Cultivo de tejidos vegetales. Su potencial es muy amplio pudiéndose obtener plantas a partir de cualquiera de sus partes como las siembras de: Meristemos en la obtención de plantas libres de virus. Embriones en resistencia a enfermedades,

---

<sup>11</sup> Profesores investigadores del Instituto Mexicano del Maíz Dr. Mario E. Castro Gil”, dirección electrónica: [imm@uaaan.mx](mailto:imm@uaaan.mx)

tolerancia a condiciones adversas, embrión abortivo o dañado. Partes especializadas en la preservación de individuos valiosos, Células en el mejoramiento, clonación, etc.

- B. Utilización del método de densidad variable. La densidad específica del grano presenta correlación positiva con el peso del grano, así como el peso es directamente proporcional a la densidad, se aprovecha esta metodología en la búsqueda de mayores rendimientos por hectárea.
- C. Selección de genotipos de maíz tolerantes a sequía. Ante la imposibilidad de controlar el ambiente, es urgente la selección genética de materiales tolerantes a condiciones adversas como la sequía.
- D. Selección de genotipo de maíz resistentes a *Fusarium moniliforme*. La proliferación de *Fusarium* es alarmante y los productos químicos de combate hacen incosteable la producción, por lo que debe realizarse la selección genética.

### **Metodología Experimental.**

- A. Cultivo de tejidos vegetales. El cultivo “in vitro” es una técnica para desarrollar nuevas plantas en un medio nutritivo artificial bajo condiciones asépticas de laboratorio a partir de segmentos muy pequeños de la planta, seleccionándose en base a su potencial genético y objetivo de la investigación, al igual que los medios nutritivos artificiales que están constituidos principalmente a base de sales inorgánicas, soluciones orgánicas, sacarosa, agar y reguladores de crecimiento.
- B. Método de densidad variable. El método se basa en la utilización de una mezcla de densidad variable constituida de cloroformo y acetato de etilo como indicadora de la densidad del grano. La muestra total de material vegetativo que se somete a esta prueba es separada en A (> densidad) y b (<densidad). El más denso o pesado se va a campo y regresa el próximo ciclo para ser evaluado y así sucesivamente señalando que hay buenos resultados en cuanto a incremento en peso se refiere.
- C. Selección de genotipos de maíz tolerantes a sequía. Evaluación “in vitro” de genotipos de maíz tolerantes a sequía mediante el uso de secuestradores de humedad. Para la evaluación de genotipos en laboratorio se siembran 10 semillas por taco en un sustrato como papel secante, del utilizado en ensayos de germinación y humedecidos a saturación completa con las soluciones a la concentración a evaluar. Previo al humedecimiento el papel secante se divide en 2 y se raya con distancias de 2 cm, a partir de la parte media, sujetando las semillas con pegamento. Se utiliza doble la hoja del mismo tamaño y cantidad de solución; en una se siembra y con la otra se cubre. Para la preparación de estas soluciones se siguen las ecuaciones propuestas por Michel et al 1983 para el polietilenglicol y la ecuación propuesta por Van 't-Hoff para manitol.

Ecuación de Michel et al

$$\Psi\Pi=1.29 (\text{PEG})^2 T- 140.8(\text{PEG})^2 -4 (\text{PEG})$$

Donde :  $\Psi\Pi$ = Potencial Osmótico

T = Temperatura

Peg = Polietilenglicol

- Preparar P:E:G: a una concentración de -4 bar

Ecuación de Van'  $\frac{RT}{V}$  NS

Donde:  $\Pi$ =Presión osmótica

R=Constante de los gases

T= Temperatura

V= Volumen

NS= Número de moles

- Preparar Manitol a una concentración de -5 bar.

Una vez hecho lo anterior, el papel secante con la siembra de semillas es enrollado en forma de taco. Posteriormente a esto, cada taco, previamente identificado es colocado en bolsas de polietileno en una cámara germinadora con luz de 25 – 28° C. Para la toma de datos 7 días es suficiente para los testigos. Para los materiales sometidos a secuestradores de humedad, la toma de datos se realiza al 10° día.

D. Selección de genotipos de maíz resistentes a enfermedades.

- Recolección de material enfermo.
- Preparación del medio para el aislamiento del hongo.
- Aislamiento del hongo en el laboratorio.-
- Siembra de material enfermo.
- Identificación del patógeno.
- Conservación del hongo.
- Preparación del medio para obtener el filtrado tóxico.
- Inoculación del medio papa-dextrosa-sacarosa
- Agitación del pds inoculado.
- Para confirmar la ausencia de azúcares, se utiliza el reactivo Benedict o bien tiras de glucosa.
- Pasteurización.
- Siembra de materiales e inoculación.
- Toma de datos.

Nota: Se mencionan solo los pasos por falta de espacio.

Preparación e inoculación de palillos de dientes infestados con el hongo para evaluación de resistencia.

Para 50 g. ( 2 frascos de Gerber)

A: Preparación de los palillos de dientes

1. Poner a hervir por 2 horas en un vaso de precipitado 10 palillos.
2. Pesar 1.,9 g. De media PDA y pasarlos a un vaso de precipitado
3. Agregar 50 ml. De agua destilada.
4. Agitar y calentar para disolver el medio
5. Vaciar 25 ml. De medio en cada frasco de Gerber
6. Colocar palillos por frasco y sellar.
7. Esterilizar medio y palillos por 1 hora a 120°C.

B. Inoculación del medio con el hongo:

- 1, Colocar micelio del hongo sobre el medio nutritivo
2. Mantener el material en incubación por 15 días a 245°C para un buen desarrollo del hongo sobre los palillos de dientes.

C. Inoculación de entrenudos del tallo con palillos de dientes infestados con el hongo.

1. Colectar del campo tallos de plantas a evaluar
2. Fraccionar el tallo
3. Hacer un orificio con ayuda de un alambre grueso en el centro del entrenudo
4. Encajar en el orificio el palillo de dientes infestado, atravesando completamente el entrenudo
5. Colocar el entrenudo inoculado en una bolsa de plástico
6. Inocular en una estufa a 20°C
7. Evaluar el daño causado por el hongo después de 4 semanas, esto en base al grado de avance del hongo en el interior de los tejidos del entrenudo.

En Campo.- hacer un orificio en el 2° entrenudo en etapa de floración y ahí encajar el palillo de dientes exactamente a la mitad del 2° entrenudo. Después de cosecha cortar la planta abrir el tallo y medir el daño o avance del hongo.

## **Resultados Y Discusión.**

- A. Cultivo de tejidos vegetales. Se han establecido técnicas sencillas y prácticas que merecen adecuación anual, dependiendo del potencial genético del material y objetivo de la investigación. Estas técnicas son la herramienta básica con que se desarrollan los otros subproyectos dentro del proyecto cultivo "in vitro" de maíz. En el 2003 se dió apoyo al proyecto de desarrollo plantas de doble propósito (ornamental y medicinal). Se apoyó al rescate de individuos valiosos y estímulos de germinación.
- B. Método de densidad variable. Se evaluaron los materiales involucrados en el programa de calidad nixtamalera del I.M.M., mediante varias metodologías como: peso volumétrico, densidad con picnómetro, densidad con densímetro y el de densidad variable.

- C. Selección de genotipos de maíz tolerantes a sequía. Se evaluaron 221 hermanos completos provenientes del convenio CIMMYT-UAAAN para el programa Bajío-Valles Altos y 181 colectas de materiales del proyecto Rescate de maíces criollos.
- D. Selección de genotipos de maíz resistentes a enfermedades se evaluó material genético proveniente de Derramadero municipio de Saltillo, 181 colectas de los estados de Coahuila, Nuevo León, Zacatecas y San Luis Potosí.

## **Conclusiones**

- A. Cultivo de tejidos. La obtención de individuos valiosos por este mecanismo es la contribución al fitomejorador en la formación de materiales superiores.
- B. Método de densidad variable. La separación de la semilla en tamaño, peso, densidad y forma ha resultado ser magnífica herramienta en el mejoramiento de la calidad de la misma.
- C. Selección de genotipos de maíz tolerantes a sequía. La sequía es uno de los factores ambientales que mayormente limita la productividad de los cultivos y ante la imposibilidad de controlar el ambiente urge la selección genética.
- D. Selección de genotipos de maíz resistentes a *Fusarium moniliforme*. La proliferación de enfermedades ocasionadas por hongos es alarmante. El problema de *Fusarium* no es solo nacional sino mundial, por lo que requiere atención prioritaria.

Es de todos conocido que el maíz que se produce en México en su mayoría proviene de áreas de temporal 85% donde se cultiva frecuentemente bajo condiciones adversas y en peligro de extinción las variedades criollas que conforman la biodiversidad, riqueza de México. Atendiendo las consideraciones anteriores desde la década de los 70's la entonces sección maíz creó un laboratorio que sirviera para la realización de estudios "in vitro" que permitieran tener un avance sobre la selección y mantenimiento de materiales superiores.

## **Recomendaciones Técnicas.**

Es conveniente que todos los genotipos de maíz que interesen en un programa de mejoramiento genético como el del I.M.M, sean sometidos a todas las evaluaciones de laboratorio con el fin de aplicarles todos los criterios de selección y así lograr un mejoramiento integral de los mismos, contribuyendo así los laboratorios con el fitomejorador a la formación de materiales superiores.

## **Literatura citada.**

- AGRIOS, G.N. 1989, Fitopatología, Segunda. Edición, Ed. Limusa, México.
- Alvarado S., M:E: 1996. Selección de líneas de maíz en función a su capacidad de germinación en presencia de secuestradores de humedad. Tesis de Licenciatura UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- De León C., H., Musito R., E., Martínez L:E: Evaluación de 8 líneas de maíz para tolerancia a sequía y *Fusarium moniliforme* en laboratorio a nivel plántula
- Graniti, A. 1982. The evolution of toxin concept in plant disease. Woork A. B. Ballio Ballio and graniti (eds). Academic pres U.S.A.

- González G., D.F: 1999. Selección de maíces forrajeros para tolerancia a sequía mediante secuestradores de humedad. Tesis de Licenciatura. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila México.
- Hurtado M.D.V., Merino M:M:E: Cultivo de tejidos vegetales. Ed. Trillas.
- Jugenheimer R.W. Maíz 1987. Variedades mejoradas métodos de cultivo y producción de semillas editorial Limusa, México.
- Martínez M., J.L. Selección de líneas de maíz *Zea mays* L. Para tolerancia a sequía y al hongo *Fusarium moniliforme* (Sheld) bajo condiciones de laboratorio. Tesis UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Ramayo R. L. F. 1983. Tecnología de granos. Universidad Autónoma de Chapingo, México. Serna S. Sergio Othón (1996) Química, almacenamiento e industrialización de los cereales, primera edición AGT editor, S. A. México.
- Robert L.M., Loyola, V.M 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México CONACYT, Primera edición, México, D.f.
- Villegas H., H. 1996. La densidad específica de la semilla de maíz (*Zea mays* L.) como un atributo de calidad. Tesis UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

