

## ESTUDIO CITOLÓGICO DEL MERISTEMO TERMINAL DE LA RAÍZ DE *ZEA MAYS* EN CULTIVO DE TEJIDOS

MARÍA TERESA CRUZ \*

### RESUMEN

Fueron cultivadas siete variedades de semillas de maíz en diferentes medios, a los que se les añadió distintas auxinas. Con la variedad número 1, el medio de White y la auxina 2,4-D se logró mantener el callus de *Zea mays* durante un año. También fueron hechos estudios citológicos e histológicos a diferentes intervalos, observando la separación progresiva de la membrana y el citoplasma, así como la formación de gránulos en el núcleo. Se comprobó que estos gránulos son de ADN utilizando la técnica de corifosfina O.

### ABSTRACT

Seven varieties of corn seeds were cultured in different media and several auxines were added. The callus of the root of *Zea mays* was kept for a year using variety number 1 and White media with 2,4-D. Also cytological and histological studies were made observing progressive separation of the membrane and cytoplasm as well as the formation of granules in the nucleus. It was verified that these are DNA granules, by using coriphosphine O technique.

### INTRODUCCION

Aunque en los últimos quince años ha aumentado considerablemente el cultivo de tejidos en monocotiledóneas, ya desde 1933, Gautheret en 1933 y Mc Clary en 1940 informaron del crecimiento de meristemo de maíz en cultivo.

De aquí en adelante, una serie de investigadores se han dedicado al estudio de los mismos. Observamos que Loo en 1945 hizo crecer meristemas apicales de *Asparagus officinalis*. Gautheret en 1947, cultiva Pináceas, Ginkgoáceas, Filicáceas y Licopodiales. Curtis y Nichols (1947) trabajan en embriones de orquídea "in vitro"; Morel y Wetmore 1951 iniciaron sus estudios sobre un miembro de las aráceas, *Amorphophalus riviére*, que es una planta originaria de China, cuyos tu-

bérculos se mantuvieron por tiempo indefinido en medio de Gautheret, Leche de Coco y Acido Naftalenacético; estos mismos autores en 1951a. y 1957b., establecieron un cultivo derivado de *Lycopodium* y *Selaginella*, también separaron el endospermo de *Arimina triloba* como un cultivo continuo; Ball (1950) describió la regeneración de plantas nuevas de *Sequoia*, así como la asimilación de isótopos radioactivos por este mismo cultivo. Lowenberg y Skoog (1952) obtuvieron el crecimiento de embriones de dos especies de pinos.

Tulecke (1953) logra el crecimiento de un cultivo "in vitro" de polen de *Ginkgo biloba*. Strauss y la Rue (1954) demuestran el crecimiento ilimitado de en-

\* Programa de Genética. Comisión Nacional de Energía Nuclear.

dospero de maíz. El medio en el que se hace el cultivo contiene 2% de sacarosa y 0.5% de extracto de levadura. Sin embargo, La Rue (1960) observa que este tejido empieza a reducir su vigor de crecimiento y todos los elementos que se le añaden, incluso vitaminas y jugo de tomate, causaban la muerte del mismo.

Sternheimer (1954), cultivó endospermo de grano de maíz aislado diez a doce días después de la polinización en medio de White y le añadió 20% de jugo de tomate.

Roberts y Street en 1955 y Ahmesstrand en 1957, informaron haber obtenido clones de raíces separadas de Petkus (Centeno de Invierno) en el 10% de los casos, al haber añadido extracto de levadura o triptofano al medio normal de raíz.

Norstog (1956) señaló el crecimiento ilimitado de endospermo de centeno "in vitro" en un medio de White, sales minerales, sacarosa, ácido indolacético, leche de coco y extracto de levadura.

Tamoaky y Ulstrop (1958) obtuvieron del endospermo de algunas variedades de maíz dulce, ocho o diez días después de su polinización, cultivo de callus de crecimiento indefinido en un medio modificado de Nitch con extracto de levadura (Difco). Este tejido no mostró ninguna respuesta a la acción del ácido

giberélico, ácido indolacético, ácido naftalenacético, 2,4-Diclorofenoxiacético, caseína hidrolizada y leche de coco. Los intentos que estos mismos autores realizaron al cultivar meristemas, no dieron resultados positivos. Carew y Shartting (1958) en este mismo año mantuvieron el cultivo de centeno en un medio modificado de Heller.

Ferguson (1963) informó haber obtenido cultivos continuos de trigo (variedad Hilgendorf) durante tres años y medio, usando medio de White, pero con 2% de glucosa en lugar de sacarosa, complementado con 2.17 p.p. de tripofano.

Nickel (1964) separó cultivos de parénquima internodal de algunas variedades de caña de azúcar usando medio basal de White, 18% de leche de coco y 6 p. m. de 2,4-D.

En el presente trabajo se efectuaron pruebas sobre siete variedades de semillas de maíz en diferentes medios, con la adición de distintas auxinas. Se logra el crecimiento de una de ellas durante un año, formando callus; al cabo de este tiempo se observa el ennegrecimiento del tejido y su muerte; una de las variedades formó ocasionalmente raíces secundarias, y un hecho importante es que no cambiamos el pH del medio después de esterilizar éste. También se informa sobre algunos tejidos y células, observadas a diferentes edades del cultivo.

## MATERIAL Y METODOS

Se probó con siete variedades de semillas (proporcionadas por el Ing. Gilberto Palacios, Jefe de la Sección de Maíz del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas).

Fueron estudiados distintos medios: de Heller, Torrey y White con diferentes auxinas: Acido Naftalenacético (A. N. A.) (Matheson Coleman & Bell Division) Acido Indol 3 Acético (A. I. A.) y Kinetina (Nutritional Biochemical Corporation) Acido 2,4-D (Eastman Organic Chemicals) además se le añadió al medio extracto de levadura (E. L.) y agar.

proporcionados por los Laboratorios Difco. Las sales orgánicas y la sacarosa fueron de grado analítico.

Para desinfectar las semillas se siguió el método de Zenteno (1964) que consiste en: sumergir las semillas durante dos minutos en alcohol de 96°, lavar rápidamente en agua estéril, pasar a bicloruro de mercurio al 0.1% durante diez minutos y lavar tres veces consecutivas en agua estéril. En seguida se colocó a las semillas entre dos capas de algodón húmedo, dentro de cajas Petri (todo es sometido durante veinte minutos al autoclave a 20

libras y escape lento). Se las incubó a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  para su germinación. Al cabo de tres a cinco días fueron cortados 3 mm de la punta de la raíz (tejido meristemático) y colocados en 50 cc de medio basal de White en cajas de Petri de 20 x 20 mm complementado con sacarosa al 2%, A. I. Á. en una concentración de  $2 \times 10^{-3}$  y 0.5% de Agar, para su solidificación. Se esterilizó en el autoclave por el procedimiento anterior y se midió el pH sin cambiarlo posteriormente.

En este medio permanecieron las raíces durante ocho días. Después de este tiempo se hicieron cortes de 2 mm bajo el microscopio de disección, se quitó todo el protodermo y se practicaron tres incisiones. Estos trozos de tejidos tuvieron un peso de 2 a 4 mg y se colocaron 2 de ellos en la misma caja que contenía el medio anterior, pero cambiando el

A. I. A. por 2,4-D en una concentración de 10-5 M. Se añadió E. L. a 0.1% y se hizo la incubación nuevamente a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  con luz difusa.

A los cuarenta y cinco y noventa y nueve días se obtuvo el peso húmedo. El peso seco se logró, sometiendo el tejido a  $105^{\circ}\text{C}$  durante cuatro horas. Los subcultivos se efectuaron cada veinte días.

Para la observación histológica se siguió el método de inclusión en parafina; para las técnicas citológicas se usó la de Aceto-Carmín, (Darlington y La Cour, 1960) y la técnica de Corifosfina (Keble, 1962). Las preparaciones de aceto carmín se hicieron permanentes por el método de congelación (Conger y Fairchild, 1953).

A un grupo de cajas de Petri se le añadió 1 cc de agua destilada estéril, cada tercer día, durante treinta días.

## RESULTADOS

Se hicieron distintas pruebas con el objeto de localizar el medio de cultivo más adecuado para el crecimiento de las semillas; colocando diez en cada uno de ellos. Los resultados se presentan en la tabla 1, en la cual podemos darnos cuenta de que el idóneo es el W1, puesto que en él crecieron el mayor número de semillas, con una longitud más o menos constante, engrosamiento del meristemo fundamental y procambium.

En la tabla 2, se muestra la genealogía de las semillas, el número con el que se marcaron y su porcentaje de germinación. Los grupos que presentan mayor porcentaje de germinación fueron el 13 y el 14, pero es probable que esto se deba a que son las semillas más jóvenes; sin embargo, esto no tuvo relación con el crecimiento posterior del tejido en el medio de cultivo.

En la figura 1, se demuestra el crecimiento de las siete variedades en el primer medio de White, a los siete días. Aunque casi todas presentan la misma apariencia, al efectuar el segundo trasplante, los mejores crecimientos se per-

ciben en la semilla 1. La 4 formó raíces laterales (Fig. 2).

Se realizaron otras pruebas consistentes en añadir a este segundo medio de cultivo Kinetina en una concentración de  $2 \times 10^{-3}$  y  $10^{-3}$  y A. N. A. al  $2 \times 10^{-3}$ ; pero comprobamos que se obtenían mejores resultados con medio de White adicionado con sacarosa al 2%, 2,4-D al  $10^{-5}$ M, L. E. al 0.1%, Agar al 0.5% para su solidificación y con un pH de 6.3, ya que con un pH de 5.8 el tejido no presentó crecimiento.

El cultivo se procesó en diferentes tiempos:

- 1.—A los doce días del segundo trasplante tenemos un corte histológico (Fig. 3) en el que podemos apreciar claramente la proliferación celular a partir del procambium; parece ser que ésta se realiza justamente en los sitios en donde se efectúan las incisiones, puesto que cuando éstas no se llevan a cabo el tejido muere sin proliferar.

Medio	Longitud	Tejidos engrosados	Raíces secundarias
W <sub>1</sub> -1	6 mm	X	
W <sub>1</sub> -2	6 mm	X	
W <sub>1</sub> -3	6 mm	X	
W <sub>1</sub> -4	6 mm		
W <sub>1</sub> -5	6 mm	X	
W <sub>1</sub> -6	5 mm	X	
W <sub>1</sub> -7	6 mm	X	
W <sub>2</sub> -1	12 mm		
W <sub>2</sub> -2	10 mm		
W <sub>2</sub> -3	15 mm		
W <sub>2</sub> -4	11 mm		S
W <sub>2</sub> -5	18 mm		
W <sub>2</sub> -6	11 mm	X	
W <sub>2</sub> -7	20 mm	X	
W <sub>2</sub> -8	10 mm		
H <sub>1</sub> -1	15 mm		
H <sub>1</sub> -2	6 mm		
H <sub>1</sub> -3	6 mm		S
H <sub>1</sub> -4	4 mm		
H <sub>1</sub> -5	9 mm	X	S
H <sub>2</sub> -1	11 mm		
H <sub>2</sub> -2	15 mm		
H <sub>2</sub> -3	17 mm		
H <sub>2</sub> -4	12 mm		
H <sub>2</sub> -5	12 mm		
H <sub>2</sub> -6	10 mm		
H <sub>2</sub> -7	8 mm		
T <sub>1</sub> -1	6 mm		
T <sub>1</sub> -2	6 mm		
T <sub>1</sub> -3	8 mm	X	
T <sub>1</sub> -4	5 mm		
T <sub>1</sub> -5	8 mm	X	
T <sub>1</sub> -6	6 mm		
T <sub>2</sub> -1	11 mm		
T <sub>2</sub> -2	5 mm		
T <sub>2</sub> -3	4 mm		
T <sub>2</sub> -4	4 mm		
T <sub>2</sub> -5	10 mm		

1.—AIA al 2x10<sup>-3</sup> 2.—2,4-D al 10<sup>-5</sup>N.

W.—Medio de White. H.—Medio de Haller. T.—Medio de Torrey.

Observamos que los meristemas cultivados en el medio W<sub>1</sub>, presentan un crecimiento homogéneo transversal y longitudinalmente.

2.—A los treinta días se procesó el cultivo por dos métodos: inclusión en parafina y aceto-carmín; en las primeras nos damos cuenta de que existe un corazón central de células en proliferación las que, hacia la periferia, van perdiendo su núcleo, forma y dimensiones (Fig. 4). Para las preparaciones con aceto-carmín tomamos dos clases de tejidos, unos con aspecto blanquecino, y otros en donde el tejido empieza a mostrar un cierto tono café. Las células de unas y otras, fueron muy distintas. Las primeras tenían aspecto normal con pared celular, citoplasma y núcleo. En el sitio donde se inicia el crecimiento, las células son fusiformes; conforme se alejan de este punto van tomando aspecto redondeado, aumentando de diámetro sin alteración aparente (Fig. 5). En el grupo segundo vemos que las células de la periferia empiezan a contraer sus citoplasmas y se hace una visible separación entre éstos y la membrana (Fig. 6). Para asegurarnos que esta apariencia no era artificio de técnica, se observó un cultivo bajo el microscopio de contraste de fase, y se encontró en todas las preparaciones observadas, esta misma clase de células. A los cuarenta y cinco días se tomó el peso húmedo, siendo éste de 46.7 mg, y el peso seco de 3.3 mg; a los noventa días, se pesó el cultivo y su peso húmedo fue de 109.7 mg.

3.—A los sesenta, ciento veinte y trescientos días se procesaron los cultivos por medio de la técnica de aceto-carmín, pues los cortes en parafina no proporcionaron datos precisos. En todos estos tiempos observamos las mismas clases de células; algunas veces se logró localizar figuras mitóticas, pero éstas fueron encontradas en pocas ocasiones. Las células que más abundaban en el campo del microscopio, eran células en cuyos núcleos distinguimos cinco o seis gránulos fuertemente teñidos; en ocasiones éstos encubren al nucléolo haciendo imposible su localización; sin embargo, otras veces éste puede distinguirse fácilmente (Fig. 7). En la figura 8 observamos células con protoplasmas vacuolados. Finalmente en la periferia del cultivo vemos células gigantes y pequeñas con sus citoplasmas perfectamente contraídos. Las células gigantes se encuentran principalmente en los tejidos más antiguos (Fig. 9). Estas son parecidas a las que señala Venketeswaran (1963) en cultivos de *Vicia faba*, pero con la diferencia de que en las células que él encontró no se observa contracción del citoplasma.

Al observar las preparaciones teñidas con Corifosfina en el microscopio de fluorescencia, pudimos comprobar que los gránulos que se observan en el núcleo son gránulos de ADN, puesto que se tiñen en verde. coloración específica para este ácido.

## CONCLUSIONES

De lo expuesto anteriormente se puede pensar que intervienen varios factores para lograr el crecimiento del tejido. El más importante parece ser la genealogía de las semillas, puesto que las distintas variedades presentan diferentes crecimientos, encontrándose algunas que son

incapaces de crecer en el medio de cultivo.

Es importante observar que aún en los primeros días se encuentran pocas figuras mitóticas y es probable que desde un principio el cultivo no esté en condiciones apropiadas para su crecimiento, pues co-

mo demostró Mascarenhas (1965) para lograr su proliferación indefinida, es necesario añadirle difenil urea.

Dos hechos importantes que sobresalen en este estudio, son los gránulos del núcleo y la contracción del citoplasma. Se comprobó que estos gránulos son de ADN, puesto que al teñirlos con la técnica de Corifosfina toman el color verde característico de este ácido a diferencia del nucléolo, el cual se tiñe de rojo.

Puede pensarse que la contracción del citoplasma se debe a una alta concentración de las sales en el medio, provocada

por la evaporación del agua contenida en el mismo. Se añadió 1 cc de agua destilada estéril cada tercer día; sin embargo, en treinta días que duró esta prueba no se logró que las células distendieran sus citoplasmas. Este experimento se prolongará por más tiempo. Es casi seguro que la muerte del cultivo no se debe a este fenómeno, puesto que desde un principio se encuentran pocas mitosis en el mismo.

En estudios posteriores con difenil urea y citrato de sodio en el medio, se tratará de observar si la falta de mitosis, la contacción citoplásmica y los gránulos, tienen alguna relación.

Variedad	Número con el que se marcaron y genealogía	Lugar y fecha de cosecha	% de crecimiento
H - 113	( 1 )		85%
♀ ♀ H - 113	( 4 ) Lote 5 ♂ Hgo.55 - 9	Chapingo, 1961	75%
♀ ♂ H - 113	( 6 ) Lote 6 ♂ Hgo.55 - 45	Chapingo, 1962	87%
H - 128	( 8 ) Lote 9 ♀	Chapingo, 1961	84%
CH - 11 - 148 - 2 - 21	(11) Lote 13	Chapingo, 1960	35%
H - 129	(13) Lote 10 ♀	Chapingo, 1963	95%
H - 129 - Hgo.55 - 9x Hgo.55 - 45	(14) Lote 8 ♀	Chapingo, 1964	95%

Tabla 2

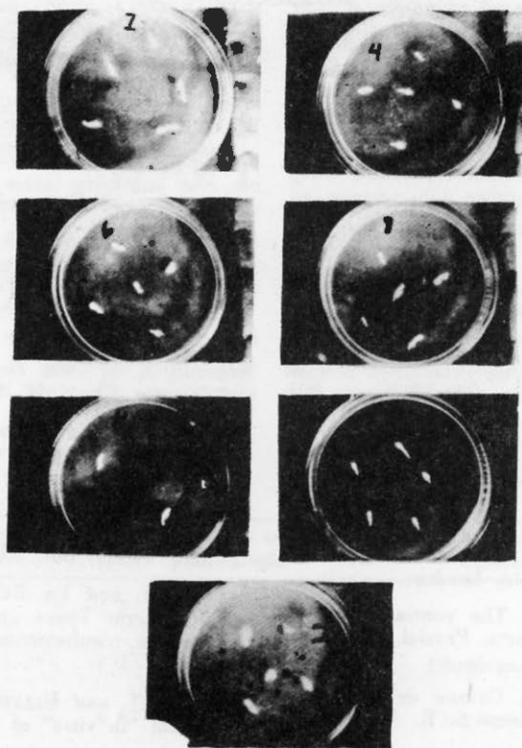


Fig. 1. Crecimiento del meristemo terminal de la raíz de las siete variedades de *Zea mays*. Después de siete días en el primer medio de cultivo.

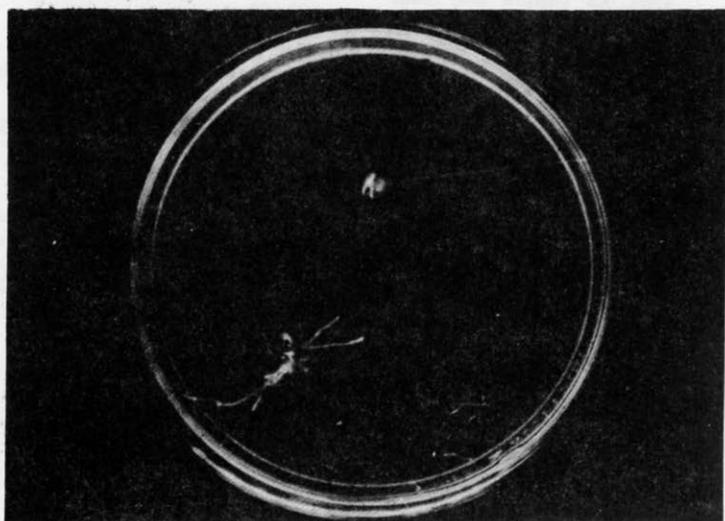


Fig. 2. Formación de raíces secundarias de la variedad No. 4 en el segundo medio de cultivo.

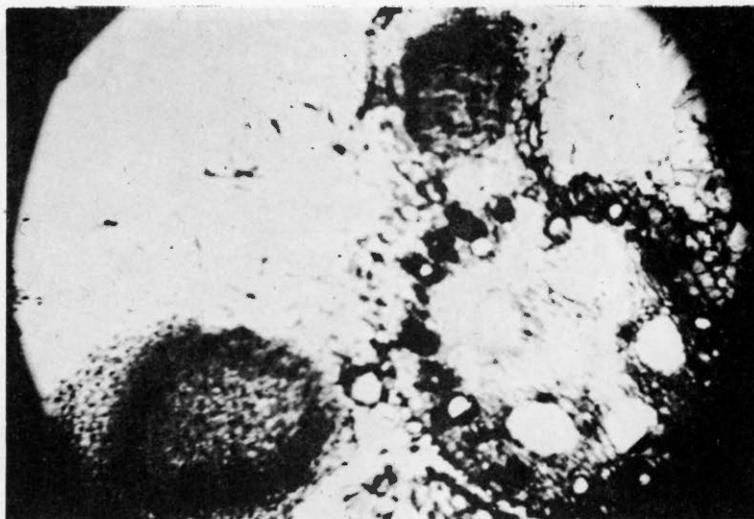


Fig. 3 A. Corte transversal efectuado a los doce días. Observamos la proliferación celular a partir del procambium.

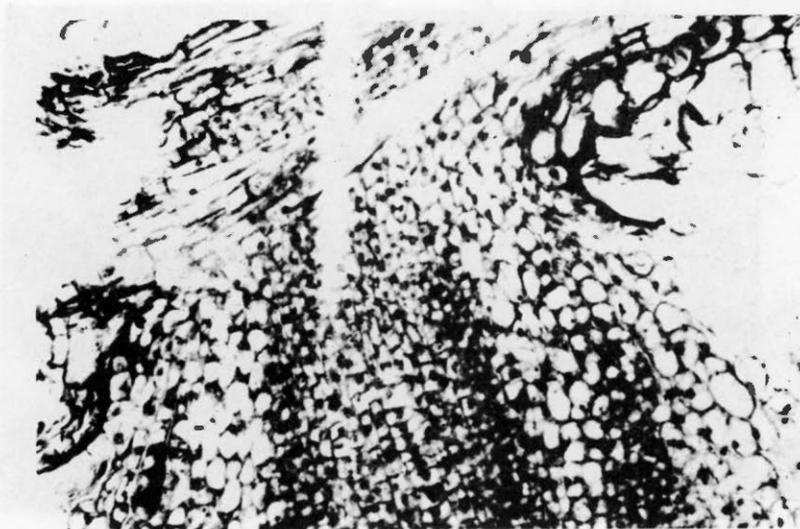


Fig. 3 B. Corte longitudinal.

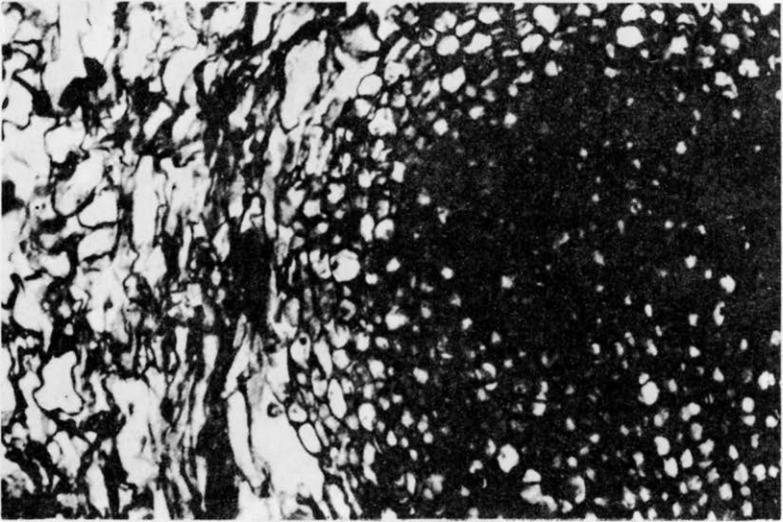


Fig. 4. Corte transversal a los treinta días, en donde observamos la pérdida de la forma de las células.

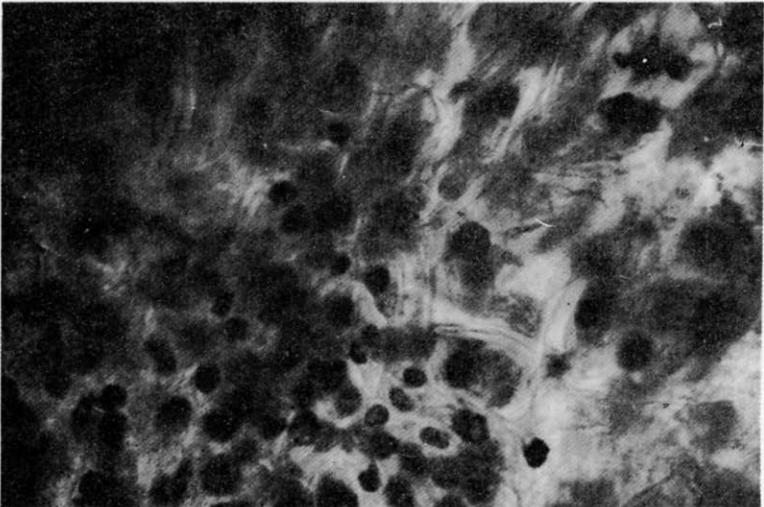


Fig. 5. Cambio de forma de los distintos estratos celulares.

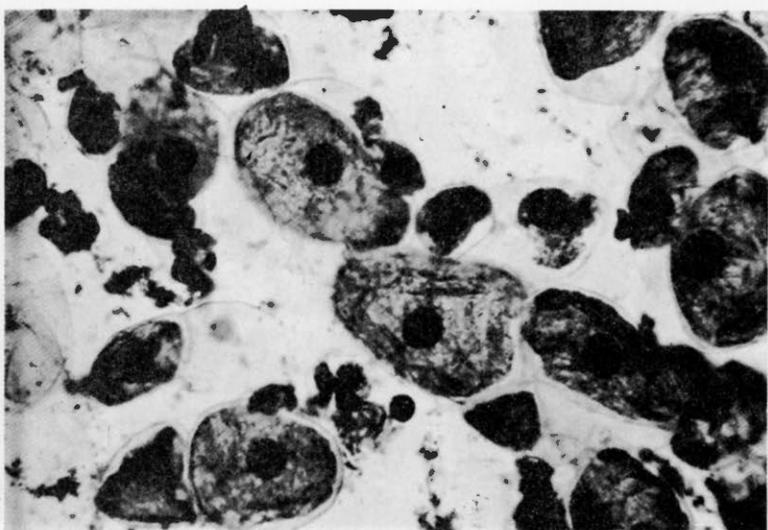


Fig. 6. Contracción del citoplasma.

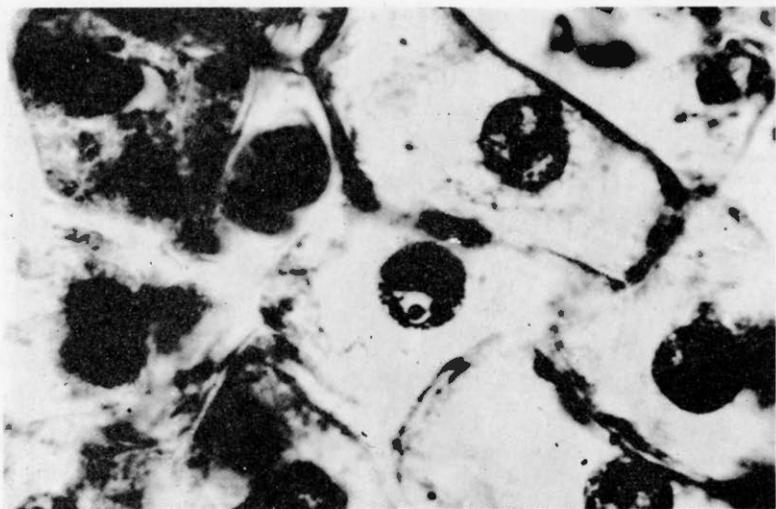


Fig. 7. Células con núcleos en los que observamos cuatro o cinco gránulos de ADN y el nucléolo.

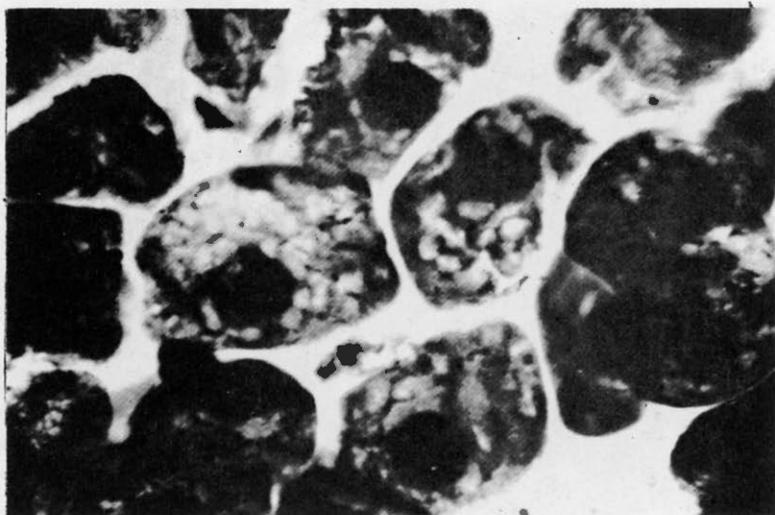


Fig. 8. Vacuolización del protoplasma.



Fig. 9. Células gigantes y pequeñas con sus citoplasmas contraídos.