



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL**

**SELECCIÓN *in vitro* DE MAÍZ POR
TOLERANCIA AL ESTRÉS OSMÓTICO**

IVONNÉ CASTRO MONTES

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis, titulada: **Selección *in vitro* de maíz por tolerancia al estrés osmótico**, realizada por la alumna: **Ivonné Castro Montes**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



DRA. MARÍA CRISTINA GPE. LÓPEZ PERALTA

ASESOR:



DR. VÍCTOR ARTURO GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

ASESORA:



DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero de 2008.

SELECCIÓN *in vitro* DE MAÍZ POR TOLERANCIA AL ESTRÉS OSMÓTICO

Ivonné Castro Montes, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2008

Se estudió la respuesta morfo-fisiológica al estrés osmótico de brotes obtenidos vía organogénica de líneas de maíz LE-13, LE-14, LE-16 y LE-46, durante tres ciclos de selección *in vitro*. El estrés osmótico fue inducido con polietilenglicol (PEG-8000) adicionado al medio básico MS (1962). A partir de plántulas *in vitro* se disecaron secciones de coleóptilo (explante) y se sembraron en medio sólido. Se encontraron diferencias significativas entre las líneas con respecto a: longitud de coleóptilo, altura de plántula y número de hojas. Durante la inducción de organogénesis, se encontró un efecto significativo del genotipo x pH, posición del explante, consistencia del medio y del genotipo x período de subcultivo. En la etapa de multiplicación y alargamiento de brotes el tiempo entre subcultivos (15 d) influyó significativamente en número de explantes con brotes (83 %). Estos brotes desarrollaron mayor altura, número de hojas y peso fresco, en comparación con LE-16 y LE-46. Durante la multiplicación bajo estrés osmótico en medio líquido con PEG durante tres ciclos de selección, se observó un efecto significativo de la interacción genotipo x PEG sobre altura y número de hojas por brote; genotipo x ciclo sobre número de hojas y peso fresco, y PEG x ciclo sobre peso fresco. En el segundo experimento se observó un efecto significativo de las variables antes señaladas, mas el genotipo x PEG sobre los potenciales hídrico, osmótico y ajuste osmótico total y genotipo x PEG x ciclo de selección sobre el contenido total de proteína soluble. Con base en las variables cuantitativas evaluadas, las mejores líneas fueron LE-14 y LE-16 debido a que presentaron mayor ajuste osmótico y características morfo-fisiológicas superiores asociadas con la acumulación de polímeros insolubles y prolina en el tejido del brote. Lo cual muestra que la selección *in vitro* es viable para elegir los mejores genotipos.

Palabras clave: Estrés osmótico, multiplicación de brotes, PEG, selección *in vitro*, *Zea mays* L.

***In vitro* SELECTION OF MAIZE BY TOLERANCE TO OSMOTIC STRESS**

Ivonné Castro Montes, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2008

The morpho-physiological response to the osmotic stress of shoots obtained via organogenic of maize lines: LE-13, LE-14, LE-16 and LE- 46, was studied during three cycles of *in vitro* selection. Osmotic stress was induced with polyethylene glycol (PEG-8000) it was added to basic culture medium MS (1962). From *in vitro* plantlets sections of coleoptile were dissected (explants) and they were placed in the solid medium. Significant differences between the lines were found by way of: length of coleoptile, height of plantlet and number of leaves. During the organogenesis induction, was a significant effect of genotype x pH, position of the explants, consistency of medium and genotype x period of subculture. In the stage of multiplication and elongation of shoots the time between subcultures (15 d) influenced significantly in number of explants with shoots (83 %). These shoots developed a greater height, number of leaves and fresh weight, in comparison with LE-16 and LE-46. During the multiplication under osmotic stress in liquid medium with PEG through three cycles of selection, a significant effect of the interaction was observed between genotype x PEG on height and number of leaves by shoots; genotype x cycle on number of leaves and fresh weight, and PEG x cycle on fresh weight. In the second experiment a significant effect of the variables before indicated was observed plus genotype x PEG on the water, and osmotic potential, and total osmotic adjustment; genotype x PEG x cycle of selection on the total soluble protein content. Among the quantitative variables evaluated, the best lines were LE-14 and LE-16 because they presented superior morpho-physiological characteristics associated with a greater osmotic adjustment and the insoluble polymer accumulation and proline in the tissue of the shoots. This shows that the *in vitro* selection is viable to choose the best genotypes.

Key words: Osmotic stress, shoots multiplication, PEG, *in vitro* selection, *Zea mays* L.

Este trabajo forma parte del proyecto de **investigación “Selección *in vitro* e *in vivo*” de genotipos de *Zea mays* L. tolerantes al déficit hídrico** con número de referencia **31968-B**, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo la responsabilidad de la Dra. María Cristina Guadalupe López Peralta.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**. Por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de postgrado.

Al **Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo**. Por permitirme continuar con mi formación académica en mis estudios de postgrado y superarme como profesional.

A los integrantes de mi Consejo Particular:

A la **Dra. Ma Cristina G. López Peralta**. Por la dirección, por todo el apoyo y paciencia brindada a través de mis estudios y con la promesa de seguir siempre adelante.

Al **Dr. Víctor A. González Hernández**. Porque gracias a su apoyo, consejo y atinados comentarios he llegado a realizar la más grande de mis metas.

A la **Dra. Adriana Delgado Alvarado**. Por su apoyo, aliento y estímulo el cual he recibo durante este tiempo.

Al personal de los **Laboratorios de Biotecnología Agrícola** de Genética, **Bioquímica** de Botánica, **Suelos** de Edafología y **Biblioteca** del Colegio de Postgraduados, por el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo.

A **Laura Isadora Tovar de Rodriguez**. Por su amistad, apoyo y todos los momentos compartidos en los diversos aspectos del presente trabajo.

A mis compañeros de estudio. ***M.C. Teresa Susana Hernández Flores, M.C. Andrés Hernández Utrera, M.C. José Espinosa y familia, M.C. David Hernández Hernández, M.C. Isabel Mendoza y M.C. Esmeralda Judith Cruz Gutierrez*** porque al final de este camino, en mi han quedado marcadas huellas profundas que compartimos en este recorrido.

Por terminar esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr esta hermosa realidad.

DEDICATORIA

A mis brillantes papis: *Raymundo e Ivonné*. A quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a una hija; Amor. A quienes sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y seguirme educando. A quienes la ilusión de su vida han sido convertirme en una persona de provecho. A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos, sacrificios ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Por esto y más...Gracias.

A mis queridas hermanitas: *Nainari, Itzel y Suheily Vianney*. Por que gracias a su apoyo durante los años más difíciles y más felices de mi vida, he llegado a realizar una de mis más grandes metas, lo cual constituye un aliciente para continuar con mi superación, esperando que ustedes me superen.

A *Edy*: Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer un camino de lucha, sacrificio, esfuerzo, comprensión y tolerancia constantes, sólo deseo que entiendas que el logro mío, también es logro tuyo, que mi esfuerzo es inspirado en ti y que mi único ideal eres tú.



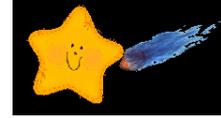
A la memoria de mis amados abuelitos que siguen siendo parte presente de mi vida: ***Amparo Oliva Vda de Montes †*** e ***Isidro Castro Valencia †***.

A mis queridos tíos: ***Víctor Hugo, Elba Minerva, Edgar y Wilfrido Montes Oliva***. Por su cariño, por el apoyo moral, estímulos brindados, confianza y por infundir en mí, ese camino que inicio con toda la responsabilidad que representa el término de mis estudios de grado.



A ti mi amigocho: ***Ariel de la O Hernández †***. A pesar de mis palabras, no puedo calmar el dolor de tu pérdida, sólo me resta decirte, que estas en mis oraciones, en mis pensamientos y que me haces mucha falta.

A la Sra. Elvira Paz Gatica y familia. Por el apoyo brindado en los tiempos difíciles.



A todas aquellas personas Estrellas y Cometas

Hay personas Estrella y hay personas Cometa.

Los Cometa pasan. Apenas son recordados por las fechas que pasan y vuelven. Los Estrella, en cambio, permanecen.

Hay mucha gente Cometa. Pasa por nuestra vida apenas por instantes; no cautiva a nadie, y nadie la cautiva. Es gente sin amigos, que pasa por la vida sin iluminar, sin calentar, sin marcar presencia.

Así son muchos artistas. Brillan apenas por instantes en los escenarios de la vida. Y con la misma rapidez que aparecen, desaparecen.

Así son muchos reyes y reinas: de naciones, de clubes deportivos o concursos de belleza. También entran los hombres y mujeres que se enamoran y se dejan enamorar con la mayor facilidad.

Así son las personas que viven en una misma familia y pasan al lado de otro sin ser presencia, sin existir.

Lo importante es ser Estrella. Hacer sentir nuestra presencia, ser luz, calor, vida. Los amigos son Estrella. Los años pueden pasar, pueden surgir distancias, pero en nuestros corazones quedan sus marcas.

Ser Cometa no es ser amigo, es ser compañero por instantes, explotar sentimientos, aprovecharse de las personas y de las situaciones. Es hacer creer y hacer dudar al mismo tiempo.

La soledad es el resultado de una vida Cometa. Nadie permanece, todos pasan. Y nosotros también pasamos por los otros.

Es necesario crear un mundo de personas Estrella, verlas y sentirlas todos los días, contar con ellas siempre, ver su luz y sentir su calor. Así son los Amigos: estrellas en nuestras vidas.

Se puede contar con los amigos. Ellos son refugio en los instantes de tensión, luz en los momentos oscuros, pan en los períodos de debilidad, seguridad en los pasajes de desánimo.

Al mirar a las personas Cometa es bueno no sentirnos como ellas, ni desear el agarrarnos de su cola. Al mirar a los Cometa, es bueno sentirse Estrella, dejar por sentada nuestra existencia, nuestra constante presencia, vivir y construir una historia personal.

Es bueno sentir que somos luz para muchos amigos y que ellos nos han iluminado a su vez. Es bueno sentir que somos calor para muchos corazones y que esos corazones nos arroparon cuando el frío nos castigó.

Ser Estrella en este mundo pasajero, en este mundo lleno de personas Cometa, es un desafío, pero por encima de todo, una recompensa.

Ser Estrella es nacer, vivir, y no existir apenas.

Autor desconocido.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xix
LISTA DE CUADROS DEL APÉNDICE	xxii
LISTA DE FIGURAS DEL APÉNDICE	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	xxiv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos generales.....	3
1.2. Objetivos específicos.....	3
1.3. Hipótesis general.....	4
1.4. Hipótesis específicas.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Generalidades del maíz	5
2.2. Aspectos generales de la tolerancia a sequía en plantas	8
2.2.1. Resistencia a sequía.....	8
2.2.2. Clasificación de resistencia a la sequía.....	9
2.2.3. Potencial hídrico y sus componentes.....	10
2.2.4. Ajuste osmótico.....	15
2.2.5. Osmorregulación.....	17
2.3. Polietilenglicol	17
2.3.1. Definición.....	17
2.3.2. Principales características como agente osmótico.....	17
2.3.3. Aplicaciones generales.....	18

2.3.4. Usos del polietilenglicol como agente osmótico.....	19
2.3.4.1 Respuestas <i>in vivo</i>	19
2.3.4.2. Respuestas <i>in vitro</i>	22
2.4. Relación dosis-respuesta en estudios de estrés.....	24
2.4.1. Importancia.....	24
2.4.2. Dosis y concentración letal media.....	27
2.5. Selección recurrente.....	28
2.5.1. Definición.....	28
2.5.2. Importancia.....	29
2.5.3. Métodos de selección convencional.....	30
2.5.4. Aplicación de la selección recurrente en selección <i>in vitro</i>	31
2.6. Usos de la selección somaclonal en la selección <i>in vitro</i>...	34
2.6.1. Introducción	34
2.6.2. Características de la variación somaclonal.....	35
2.6.3. Factores relacionados con la generación de variación somaclonal.....	36
2.6.4. Variación somaclonal y su aplicación en el mejoramiento genético.....	39
2.7. Características de la selección <i>in vitro</i>.....	41
2.8. Aspectos moleculares de la tolerancia al estrés osmótico.....	43
2.8.1. Herramientas genéticas moleculares para el estudio de genes.....	43
2.8.2. Herramientas genómicas para estudio de genes.....	51
2.8.3. Proteínas relacionadas con la tolerancia a sequía.....	59
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.1. Material vegetal.....	63

3.2. Medio decultivo.....	63
3.3. Condiciones ambientales de incubación.....	63
3.4. ETAPA I. Organogénesis <i>in vitro</i>.....	64
3.4.1. Establecimiento del cultivo aséptico y germinación de semillas.....	64
3.4.1.1. Desinfección de la semilla.....	64
3.4.1.2. Siembra y germinación.....	65
3.4.1.3. Variables cuantificadas.....	66
3.4.2. Inducción de brotes.....	66
3.4.2.1. Evaluación del efecto del pH del medio de cultivo y de la posición de los explantes en el coleóptilo sobre la actividad organogénica.....	66
3.4.2.2. Variables cuantificadas.....	69
3.4.2.3. Evaluación de las variantes físicas del medio de cultivo en la inducción de brotes.....	69
3.4.2.4. Variables cuantificadas.....	72
3.4.3. Multiplicación y alargamiento de brotes.....	73
3.4.3.1. Medio de cultivo.....	73
3.4.3.2. Variables cuantificadas.....	74
3.5. ETAPA II. Efecto de la dosis de PEG en la multiplicación <i>in vitro</i> vía organogénesis.....	75
3.5.1. Simulación del estrés osmótico con Polietilenglicol (PEG-8000).....	75
3.5.2. Medio de cultivo.....	75
3.5.3. Variables cuantificadas.....	76
3.6. ETAPA III. Selección <i>in vitro</i> de brotes durante su multiplicación bajo estrés osmótico.....	76
3.6.1. Establecimiento del estrés osmótico.....	76

3.6.2. Duración del ciclo de selección.....	76
3.6.3. Criterios de selección de brotes.....	77
3.6.4. Caracterización de brotes.....	77
3.6.5. Análisis de variables.....	84
3.6.6. Enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes seleccionados.....	85
3.6.6.1. Variables cuantificada.....	88
3.6.7. Aclimatación de plantas.....	89
3.6.7.1. Variable cuantificada.....	90
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
4.1 ETAPA I. Organogénesis <i>in vitro</i>.....	91
4.1.1. Cultivo aséptico y germinación de semillas.....	91
4.1.2. Inducción de brotes.....	93
4.1.2.1. Efecto del a) pH y b) de la posición de los explantos sobre la capacidad organogénica.....	93
4.1.2.2. Efecto de las variantes físicas del medio de cultivo en la inducción de brotes.....	98
4.1.3. Multiplicación y alargamiento de brotes.....	101
4.2. ETAPA II. Selección <i>in vitro</i> de brotes durante la multiplicación bajo estrés osmótico.....	108
4.2.1. Caracterización morfológica de los brotes seleccionados <i>in vitro</i> en varios niveles de estrés osmótico.....	109
4.2.2. Caracterización fisiológica de los brotes seleccionados <i>in vitro</i> bajo estrés osmótico.....	117
4.2.2.1. Contenido relativo de agua en brotes del tercer ciclo de selección.....	117
4.2.2.2. Potencial hídrico y sus componentes.....	121
4.2.2.2.1. Ajuste osmótico y sus componentes.....	131

4.2.2.3. Proteína soluble total y prolina soluble, en tres ciclos de selección <i>in vitro</i> de maíz bajo estrés osmótico.....	135
4.2.3. Enraizamiento <i>in vitro</i> y aclimatación <i>ex vitro</i> de brotes seleccionados bajo estrés osmótico.....	153
V. CONCLUSIONES.....	158
VI. RECOMENDACIONES.....	160
VII. LITERATURA CITADA.....	161
VIII. APÉNDICE.....	185

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Unidades probit obtenida a partir de los valores de la respuesta a un agente químico (Valle y Lucas, 2000).....	27
2	Relación de genotipos y niveles de pH evaluados en la inducción de brotes a partir de secciones de tallo.....	68
3	Evaluación de la consistencia física del medio de cultivo, volumen del medio de cultivo y del recipiente y tiempo en la inducción de brotes de cuatro genotipos de maíz.....	70
4	Evaluación del intervalo de tiempo de subcultivo durante la multiplicación de brotes de cuatro genotipos de maíz.....	73
5	Ensayo uno de rizogénesis de brotes seleccionados en la etapa III bajo estrés osmótico.....	85
6	Ensayo dos de rizogénesis de brotes seleccionados en la etapa III bajo estrés osmótico.....	86
7	Ensayo tres de rizogénesis de brotes seleccionados bajo estrés osmótico.....	86
8	Ensayo cuatro de rizogénesis de brotes seleccionados en la etapa III bajo estrés osmótico.....	89
9	Valores de F del análisis de varianza de la germinación y características de las plántulas, obtenidas <i>in vitro</i> , por efecto del genotipo. Datos combinados de tres experimentos.....	91
10	Promedio de la germinación de semillas y las características de las plántulas obtenidas <i>in vitro</i> . Tres experimentos.....	92
11	Valores de F del análisis de varianza del número de explantes con brotes (NEB) por efecto del genotipo, pH y la interacción. Datos combinados de dos experimentos.....	94
12	Medias del número de explantes con brotes (NEB) por efecto combinado el genotipo y pH del medio de cultivo. Datos de dos experimentos.....	95
13	Valores de F para la frecuencia de explantes que mostraron actividad organogénica en función de su posición en el coleóptilo de la plántula donadora. Datos de un tercero y cuarto experimentos.....	96
14	Frecuencia de explantes con actividad organogénica en función de su posición en el coleóptilo de la plántula. Valores de un tercero y cuarto experimentos.....	97
15	Valores de F del análisis de varianza de la altura y número de hojas por brote por efecto del genotipo, intervalo de inducción, volumen del frasco, consistencia del medio de cultivo y sus interacciones. Datos del primer experimento.....	99

16	Medias para la altura y número de hojas por brote por efecto significativo de la interacción genotipo x intervalo. Datos del primer experimento.....	100
17	Medias de la altura de los brotes por efecto de la consistencia física del medio de cultivo. Datos del primer experimento.....	101
18	Valores de F del análisis de varianza del número de explantes con brotes, número de brotes por explante y de la tasa de multiplicación por efecto del genotipo e intervalo entre subcultivos. Resultados de un primer experimento.....	102
19	Medias para el número de explantes con brotes por efecto significativo del intervalo entre subcultivos, y del número de brotes por explante. Con datos del primer experimento.....	103
20	Respuestas organogénicas de los brotes después de tres subcultivos de multiplicación. Evaluación de tres genotipos del primer experimento.....	104
21	Porcentaje de brotes vivos durante tres subcultivos consecutivos hechos a diferentes intervalos de tiempo. Evaluación de tres genotipos en el primer experimento.....	107
22	Características morfológicas de brotes obtenidos por tres subcultivos hechos cada 15 d. Valores de un segundo experimento.....	107
23	Valores de F del análisis de varianza de características morfológicas de los brotes, por efecto del genotipo, del estrés osmótico con PEG y del ciclo de selección. Datos del primer experimento.....	110
24	Medias de las características morfológicas de brotes vivos por el efecto de la interacción genotipo x PEG. Datos del primer experimento.....	111
25	Medias de las características morfológicas por brote por efecto de la interacción genotipo x ciclo de selección. Datos de un primer experimento.....	112
26	Medias de las características morfológicas por brote dado el efecto de la interacción PEG x ciclo de selección. Datos de un primer experimento.....	114
27	Valores de F del análisis de varianza de la acumulación de biomasa y de agua en brotes de genotipos seleccionados <i>in vitro</i> por tres ciclos bajo estrés osmótico. Datos del segundo experimento.....	117
28	Acumulación de biomasa y contenido de agua de brotes del tercer ciclo de selección. Datos del segundo experimento.....	118
29	Valores de F del análisis de varianza del potencial hídrico, sus componentes y el ajuste osmótico total en brotes	121

	seleccionados <i>in vitro</i> bajo estrés osmótico. Valores del segundo experimento.....	
30	Medias del potencial hídrico y sus componentes en el tejido foliar de brotes seleccionados en función de la interacción genotipo x PEG. Resultados de un segundo experimento.....	122
31	Datos estimados del ajuste osmótico total y sus componentes (efecto de polímeros y de solutos) en los brotes de maíz en respuesta a la interacción genotipo x PEG. Valores del segundo experimento.....	131
32	Valores de F del análisis de varianza del contenido de proteína soluble en brotes del primero y tercero ciclos de selección <i>in vitro</i> . Con datos del primero y segundo experimentos.....	136
33	Contenido total de proteína soluble en brotes correspondientes al primero y tercero ciclos de selección <i>in vitro</i> bajo estrés osmótico inducido con PEG (PM.8000).....	138
34	Frecuencia de enraizamiento de brotes seleccionados durante tres ciclos en varios niveles de estrés osmótico con PEG.....	155

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Dinámica de la producción, el consumo y de la importación de grano de maíz en México. Fuente: Foreign Agricultural Service-United States Department of Agriculture (2007).....	7
2	Potenciales hídricos de una hoja de <i>Pachysandra terminalis</i> . El potencial de presión presenta valores positivos y se revierte a valores negativos conduciendo a una pérdida de turgencia. Fuente: Beck et al. (2007).....	14
3	Curva dosis-respuesta sin ninguna transformación estadística de los datos (Fuente: Valle y Lucas, 2000).....	25
4	Curva de toxicidad en función de la dosis de un agente químico (Fuente: Valle y Lucas, 2000).....	26
5	Esquema de rutas de transducción de señales producidas por el estrés osmótico e iónico en las planta. Fuente: Rodríguez <i>et al.</i> , (2005).....	53
6	Redes de regulación transcripcional de los elementos cis y de factores de transcripción involucrados en la expresión de genes como respuesta al estrés osmótico y al frío en Arabidopsis. Las elipses indican factores de transcripción, los cuadros indican elementos cis. Los círculos pequeños indican la modificación de los factores de la transcripción para su activación (fosforilación). Las líneas punteadas indican la interacción entre proteínas.....	54
7	Posición de siembra de la semilla de maíz dentro del tubo de ensayo para su germinación <i>in vitro</i>	65
8	Plántula de maíz obtenida <i>in vitro</i> (izquierda) y segmento de tallo envuelto por el coleóptilo (derecha). El cuadro en blanco representa 1 cm ²	67
9	Esquema de la disección de explantes disco de tallo de maíz para la inducción de brotes.....	68
10	División de la masa de brotes de maíz durante los subcultivos para su multiplicación vía organogénesis.....	74
11	Microvoltímetro de punto de rocío (HR-33T, Wescor, Logan, UTHA) [®]	78
12	Plántula de maíz germinadas <i>in vitro</i> con desarrollo normal.....	92
13	Inducción de organogénesis de maíz en los explantes tomados del coleóptilo (discos I al V). A) Organogénesis en los tres primeros explantes conservando su posición acrópeta sobre el medio de cultivo; B) Organogénesis en cinco explantes acomodados en forma circular sobre el medio de cultivo; C) Acercamiento de la organogénesis en el explante de la primera posición.....	97

14	Inducción de organogénesis de maíz a partir del disco I del nudo coleoptilar: A) Medio líquido con plataforma B) Medio sólido.....	98
15	Brotos vegetativos de maíz, caracterizados por su desarrollo de hojas. A) Brotos normales y B) Brotos con hojas vitrificadas y banqueras.....	106
16	Organogénesis de estructuras reproductivas observadas en los brotes durante su multiplicación. A) Explante con numerosos brotes solamente vegetativos; B) Emisión de estructuras blanquecinas sin hojas; C) Estructuras que se observan una vez que se eliminan las hojas de los brotes; D) Estructura similar a jilotes con estilo-estigamas; E) Desarrollo avanzado de los ovarios y estilos del jilote; F) Pares de espiguillas dispuestas en el jilote.....	106
17	Relación entre el número de hojas y altura de brote, medidos después de tres subcultivos de multiplicación hechos cada 15 d.....	108
18	Variación morfológica y senescencia de hojas en los brotes en condiciones de estrés osmótico durante su multiplicación <i>in vitro</i> . Brotos reproductivo (A y B), brotes vegetativos; (C y D) Brotos vegetativos; (E y F) Brotos con senescencia foliar.....	116
19	A) Cambios en la acumulación de biomasa y B) Contenido de agua por brote en función del nivel de estrés osmótico del medio de cultivo, después de tres ciclos de selección. Las barras verticales en las líneas corresponden a los errores estándares. Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).....	119
20	Potencial hídrico del tejido foliar de brotes de cuatro genotipos de maíz seleccionados durante tres ciclos <i>in vitro</i> , en respuesta a los niveles de PEG.....	124
21	Potencial de presión de turgencia del tejido foliar de brotes seleccionados en tres ciclos bajo estrés osmótico con PEG, y potencial hídrico del medio de cultivo líquido. Las barras verticales en las líneas corresponden al error estándar.....	125
22	Relación entre el contenido relativo de agua y los potenciales hídrico y osmótico de brotes de maíz, cultivados en varios niveles de PEG. Segundo experimento.....	126
23	Brotos de maíz cultivados en diferentes niveles de estrés osmótico simulado con PEG-8000 (de 0 % hasta 20 %)......	135
24	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida del genotipo LE-13 en los ciclos de selección 1 y 3 y en A) PEG 0 y 10 %; B) 0 y 15 %. C y D) Corresponde a la identificación visual de las diferentes bandas. M = Marcador de peso molecular, PC = Planta de campo, PV = Plántula cultivada <i>in vitro</i> ; C1 y C3 =	141

	Ciclo uno y tres de selección; P0, P10 y P15 = PEG 0%, 10% (A) y 15% (B).....	
25	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida del genotipo LE-16 en los ciclos de selección 1 y 3 y en A) PEG 0 y 10 %; B) 0 y 15 %. C y D) Corresponde a la identificación visual de las diferentes bandas. M = Marcador de peso molecular, PC = Planta de campo, PV = Plántula cultivada <i>in vitro</i> ; C1 y C3= Ciclo uno y tres de selección; P0, P10 y P15 = PEG 0%, 10% (A) y 15% (B).....	143
26	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida del genotipo LE-14 en los ciclos de selección 1 y 3 y en A) PEG 0 y 10 %; B) 0 y 15 %. C y D) Corresponde a la identificación visual de las diferentes bandas. M = Marcador de peso molecular, PC = Planta de campo, PV = Plántula cultivada <i>in vitro</i> ; C1 y C3= Ciclo uno y tres de selección; P0, P10 y P15 = PEG 0%, 10% (A) y 15% (B).....	145
27	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida del genotipo LE-46 en los ciclos de selección 1 y 3 y en A) PEG 0 y 10 %; B) 0 y 15 %. C y D) Corresponde a la identificación visual de las diferentes bandas. M = Marcador de peso molecular, PC = Planta de campo, PV = Plántula cultivada <i>in vitro</i> ; C1 y C3= Ciclo uno y tres de selección; P0, P10 y P15 = PEG 0%, 10% (A) y 15% (B).....	147
28	Acumulación de prolina libre en el tejido foliar de brotes de dos líneas de maíz (LE-13 y LE-16) seleccionadas <i>in vitro</i> en tres ciclos bajo estrés osmótico inducido con PEG-8000.....	151
29	Variación en la capacidad de enraizamiento <i>in vitro</i> de los brotes seleccionados por su tolerancia al estrés osmótico. Las primeras cinco imágenes son frontales (A = LE-14, B = LE-46, C = LE-13, D y E) y la última imagen es de la base del frasco (F).....	154
30	Proceso de aclimatación de brotes. A) Brotes seleccionados, B) Lavado de raíces y prevención de infecciones mediante inmersión en una solución con fungicida, C) Material desinfectado, D) Introducción de los brotes en un recipiente con sustrato, y E) Desarrollo plántulas en una cámara de crecimiento.....	156

LISTA DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadro	Título	Página
1 A	Componentes del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) y concentraciones finales de las hormonas empleadas para la inducción, multiplicación y enraizamiento de brotes de cuatro genotipos de maíz cultivados <i>in vitro</i>	185
2 A	Preparación del buffer de muestra para 50 mL de agua.....	186
3 A	Preparación de las soluciones para determinar la curva patrón del contenido de proteína. Albúmina de suero bovino (BSA, Sigma®) (0.25 µg. µL ⁻¹).....	186
4 A	Preparación del gel de separación al 12%.....	187
5 A	Preparación del gel apilador al 4 %.....	187
6 A	Preparación del buffer de corrida 10 X, pH 8.3.....	187
7 A	Relación de los doce geles hechos con base en los diferentes tratamientos de PEG y ciclos de selección.....	188
8 A	Preparación del colorante Comassie para teñir geles.....	188
9 A	Preparación de la solución de Ácido Sulfosalicilico al 3 %.....	189
10 A	Preparación de la solución de Ninhidrina ácida.....	189
11 A	Preparación de las soluciones para determinar la curva patrón del contenido de prolina.....	189

LISTA DE FIGURAS DEL APÉNDICE

Figura	Título	Página
1 A	Forma de ensamblar los vidrios y los espaciadores de una cámara de electroforesis vertical.....	190
2 A	Procedimiento para el ensamblaje de un modelo de cámara de electroforesis vertical.....	191
3 A	Interior de una cámara de electroforesis vertical en operación: a) Durante la colocación de la muestra en el pocillo del gel, b) Después de aplicar un voltaje determinado el cual genera el empacamiento uniforme de las proteínas, c, d y e) las proteínas migran hacia el ánodo y se distribuyen en el gel a manera de bandas. (e)=electrón.....	192

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

NOMBRE	ABREVIATURA O SÍMBOLO
Acido clorhídrico	HCl
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido giberélico	AG ₃
Ácido indol- 3- acético	AIA
Ácido indol butírico	AIB
Ácido naftalenacético	ANA
Ácido ribonucleico	ARN
Agua destilada	H ₂ O _d
Agua destilada-desionizada	H ₂ O _{d-d}
Albúmina de suero bovino	BSA
Ampers	A
6-Bencilaminopurina	BAP
Centímetro	cm
Días	d
Grados centígrados	° C
Gramos	g
Gramos por litro	g L ⁻¹
Hidróxido de sodio	NaOH
Hora	h
Kilo-daltons	kDa
Kilogramos por centímetro cúbico	kg cm ⁻³
Litro	L ⁻¹
Micro moles por metro cuadrado por segundo	μmol m ⁻² s ⁻¹
Microlitro	μL
Mili-molar	mM
Mili-amperes	mA
Mililitro	mL
Millones	M
Minutos	min
Molar	M
Murashige y Skoog (1962)	MS
Nanómetros	nm

Nitrógeno líquido	N ₂
Normal	N
Número	núm
Número de brotes con explantes	NBE
Número de explantes con brotes	NEB
Partes por millón	ppm
Peso fresco	PF
Peso molecular	P.M.
Peso seco	PS
Polietilenglicol	PEG
Polivinil-pirolidona	PVP
Potencial de presión de turgencia	ψ_p
Potencial hídrico	ψ
Potencial osmótico	ψ_π
Proporción peso a volumen	p/v
Proporción volumen a volumen	v/v
Revoluciones por minuto	rpm
Segundo	s
Selección Asistida por Marcadores	MAS
Toneladas	ton
Ultravioleta	UV
Watts	W

I. INTRODUCCIÓN

El agua es importante para las plantas por su función como solvente, como agente refrigerante, y en el mantenimiento de la turgencia y expansión celular (Bänziger *et al.*, 2000).

El maíz es uno de los mayores cultivos fuente de alimento en el mundo (Jyoti y Varghese, 1990). Sin embargo, está expuesto continuamente al estrés por sequía. La incidencia de este estrés se incrementa debido parcialmente al efecto del cambio climático, al desplazamiento del maíz hacia ambientes desfavorables de bajo potencial productivo por otro más rentable, a la disminución de la fertilidad del suelo, y a la disminución de la capacidad del suelo para retener humedad (Bänziger *et al.*, 2000).

En zonas de temporal es importante desarrollar una variedad tolerante a la sequía que permita obtener una mayor producción. Para desarrollar esta variedad a través del mejoramiento genético es necesario controlar experimentalmente el factor sequía en cuanto a los siguientes factores: a) etapa de desarrollo de incidencia del estrés, b) intensidad del estrés, y c) aplicación uniforme del estrés en espacio y tiempo (Banziger *et al.*, 2000; Bruce *et al.*, 2002).

El mejoramiento genético convencional, ha sido importante en la producción de variedades superiores, pero este tipo de mejoramiento necesita mucho tiempo (10 o más años) (Jauhar, 2006). Además, en campo la aplicación uniforme del estrés deseado es difícil y los recursos invertidos son mayores. En tal caso las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, pueden ser una herramienta eficiente para el fitomejorador al lograr una selección rápida de los genotipos deseados (Nabors, 1992). Además, los métodos de evaluación y selección *in vitro* poseen ventajas importantes con respecto a los equivalentes *in vivo*, ya se pueden aplicar en cualquier época del año, permiten mantener un control de las condiciones



ambientales, evitan varios riesgos comunes en campo o en invernadero, y pueden reducir la cantidad de espacio ocupado por cada ensayo (Gunn y Day, 1986).

La selección *in vitro* implica aplicar un agente selectivo (patógeno, tratamiento químico o físico) directamente al explante cultivado, para obtener la tolerancia en las plantas regeneradas (Gunn y Day, 1986). Sin embargo, es factible seleccionar *in vitro* sin necesidad de regeneración, bajo la hipótesis de que las plantas donadoras de los explantes se comportarán de la misma forma en presencia del agente selectivo. En algunos casos la regeneración no ha sido posible o se han conseguido materiales de poco interés; en otros casos la tolerancia no se expresa en la planta regenerada (Cubero, 2003).

La ausencia de un protocolo estandarizado de regeneración *in vitro*, vía embriogénesis somática, es una limitación para la transformación genética de varios cereales, debido a que la eficiencia de la regeneración varía entre especies y aún entre variedades de la misma especie (Jauhar, 2006). Particularmente, el maíz es uno de los cereales más difíciles en su propagación *in vitro*. Las fallas para lograr un crecimiento rápido y abundante de los callos y la regeneración de plántulas completas a partir de ellos, son un serio problema para la explotación de las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* en los programas de mejoramiento del maíz (Jyoti y Varghese, 1990). Para el establecimiento del cultivo aséptico *in vitro* de esta especie se han usado diferentes tejidos como explantes, como: embriones maduros e inmaduros, espigas, anteras, microsporas, mesocotilos, nudos coleoptilares, glumas de la espiguilla, partes basales de las hojas (Li *et al.*, 2002), jilotes, meristemo apical del vástago y yemas axilares (Walden *et al.*, 1989).

Investigaciones desarrolladas en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad, se ha demostrado que es factible el empleo de la técnica de cultivo de tejidos vegetales para la selección *in vitro* de maíz (Proyecto CONACYT 31968-B); sin embargo, aún es necesario reducir los ciclos de selección, establecer nuevos criterios de selección *in vitro*,



evaluar el agente estresante Polietilenglicol (PEG) para simular el estrés osmótico y lograr mayor entendimiento de los factores que inciden en el desarrollo de los brotes reproductivos porque éstos no son capaces de regenerar una planta completa.

1.1 OBJETIVOS GENERALES

- 1) Evaluar la respuesta organogénica de genotipos de maíz sometidos a estrés osmótico *in vitro*.
- 2) Seleccionar brotes de maíz por tolerancia a estrés osmótico durante su multiplicación *in vitro*.
- 3) Cuantificar características morfológicas y fisiológicas en los brotes seleccionados *in vitro* por tolerancia al estrés osmótico.
- 4) Cuantificar los contenidos de proteínas y prolina totales por ciclo de selección.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Evaluar la influencia de la posición del explante, de la consistencia física del medio de cultivo y del pH, sobre la capacidad de brotación, tipo crecimiento y diferenciación de brotes.
- 2) Evaluar la influencia del intervalo entre subcultivos durante la multiplicación de brotes.
- 3) Evaluar varios niveles de estrés osmótico inducidos con Polietilenglicol durante la multiplicación de brotes
- 4) Evaluar la respuesta morfológica y fisiológica de brotes seleccionados por tolerancia al estrés osmótico.
- 5) Enraizar clones tolerantes al estrés osmótico.



1.3 HIPÓTESIS GENERAL

Es posible detectar genotipos tolerantes al estrés osmótico inducido con Polietilenglicol durante la multiplicación *in vitro* de brotes vía organogénesis, y lograr ganancias en tolerancia a dicho estrés mediante selección recurrente *in vitro*.

1.4 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- 1) Las características del medio de cultivo influyen en la capacidad organogénica de los explantes.

- 2) Existen diferencias genotípicas en las respuestas morfológicas y fisiológicas al estrés osmótico.

- 3) Hay diferencias en las respuestas morfológicas y fisiológicas entre brotes seleccionados bajo estrés osmótico con respecto a los brotes seleccionados sin estrés.



II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del maíz

En México el maíz tiene una importancia primordial, ya que se ha considerado como uno de los primeros centros de domesticación de esta gramínea (Wellhausen, 1981; García, 2001). La información de tipo orográfico, hidrográfico, edáfico, climatológico, citológico, arqueológico, histórico y agroastronómico, indica que la domesticación del maíz se inicio hace más de 10,000 años en la región del Bajío y Occidente de México, lugar considerado como el centro primario de su domesticación; posteriormente, de este centro el maíz domesticado se difundió por otras zonas de Centroamérica, Sudamérica y el Caribe (Miranda, 1998).

En México hay gran diversidad de variedades de maíz, las cuales se han coleccionado, estudiado y clasificado en razas (Wellhausen, 1981). Actualmente, el maíz es cultivado en las 17 regiones agrícolas del país y en todos los tipos de clima, salvo en altitudes superiores a los 3200 metros sobre el nivel del mar (Granados y López, 1996).

En México la superficie sembrada de maíz ha variado a través de los años, así en el período de 1940 a 1944 se sembraron un promedio de 3,405,850 ha; de 1965 a 1969 se establecieron 7,679,118 ha; para 1997 osciló entre 7 y 8 millones de hectáreas; en 1999 fue de 8.2 millones de ha, de las cuales el 85 % se estableció bajo condiciones de temporal y el restante 15 % bajo condiciones de riego (Rodríguez, 1981; Morales, 1997; García, 1999). En 2003 la superficie cultivada con maíz fue de 8 millones de ha (López, 2003).

De la superficie total sembrada con maíz que abarca la región centro-norte de México, el 27 % no produce grano por efecto de la sequía, principalmente por su incidencia durante la floración y el llenado de grano. Además, las causas principales por las que en ocasiones no se cosecha grano son: inicio tardío de



lluvias, el inicio temprano de heladas, el corto periodo de lluvias y la siembra de variedades de ciclos más largos del requerido. Así, el objetivo del fitomejorador del maíz en esa región es formar variedades con ciclo vital adaptado a las condiciones regionales, tolerantes a la sequía, resistentes al acame, resistentes a enfermedades; con ello, se pueden disminuir las pérdidas por sequía y heladas (Luna y Gutiérrez, 1998).

Por otra parte, el rendimiento promedio nacional de grano de maíz se incrementó significativamente en la segunda mitad del siglo pasado, así para 1940 se reporta un promedio de 0.941 ton ha⁻¹, en tanto que, para 1980 fue de 1.78 ton ha⁻¹ y en 1999 se ubicó en 2.1 ton ha⁻¹ (Rodríguez, 1981; Morales, 1997; García, 1999).

Como resultado del aumento de la superficie sembrada y del rendimiento por unidad de área, la producción nacional se ha incrementado de 1907 a 1999 de 1.088 millones de toneladas de grano a 17.5 millones. Esto último representa apenas el 7.6 % de la producción de los Estados Unidos de Norte América (E.U.A.) (Ovalle y López, 1997).

A pesar del panorama económico del maíz en México, el consumo *per capita* promedio fue de 100.3 kg durante el período de 1940 a 1944, mientras que en 2010 se espera que alcance cifras superiores a los 178 kg. De esta manera, de 1970 a 1991 México tuvo un déficit anual de 2.1 M ton (millones de toneladas) de grano (Turrent y Aveldaño, 1997). Por otra parte, el consumo nacional en 1999 fue distribuido así: 13.22 M ton (54.06 %) para consumo humano; 5.23 M ton (21.39 %) en actividades agropecuarias; 3 M ton (12.26 %) a la industria como almidón, jarabes y frituras; 1.2 M ton (4.90 %) a la industria aceitera y se mantuvo como reserva nacional 1.8 M ton (7.36 %) (García, 1999). Por otra parte, en ese mismo año (1999) se consumieron 24.46 M ton de grano, demanda que se estimaba sucediera hasta el 2010 (Hibon *et al.*, 1992), por lo que al restarle la producción se tiene un déficit anual de 6.95 M ton. Estas cifras se acercan a lo afirmado por Millán (1999) y Mata (2001) de que anualmente México requiere



cerca de 24 M ton de maíz para satisfacer la demanda derivada del consumo humano, del sector pecuario y la industria procesadora; mientras que la producción nacional a partir de 1993 se ha situado entre 17 y 18 M ton. Para 2003 la producción aproximada de maíz se ubicó en 19 M ton, mientras que la demanda del grano fue de 26 M ton, sobresaliendo un déficit de 7 M ton en el país (López, 2003). Se observa en la Figura 1 que la importación de maíz en México donde se observa que va en aumento ya que el consumo es mayor que la producción de grano (FAS-USDA, 2007).

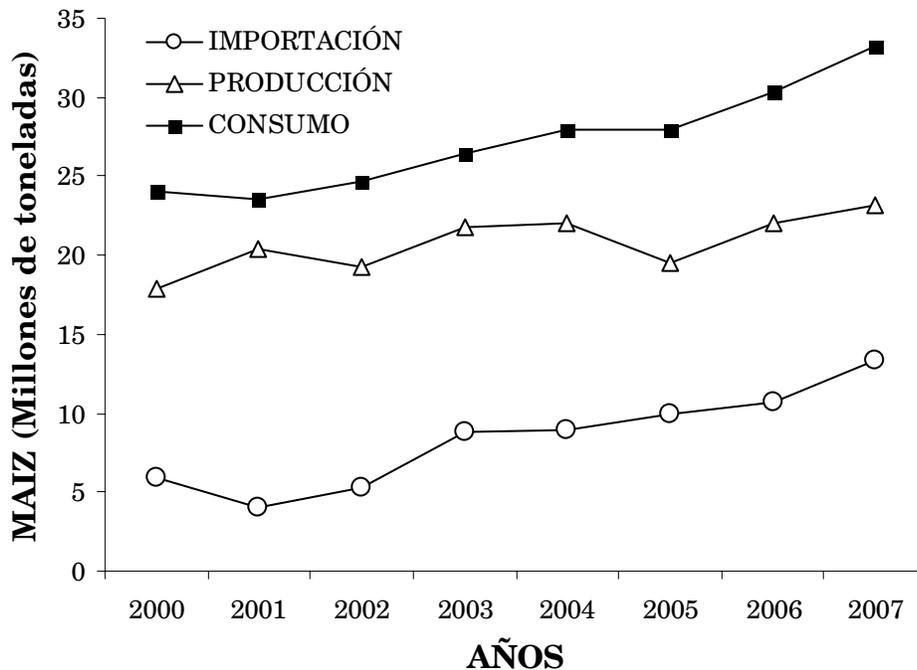


Figura 1. Dinámica de la producción, el consumo y de la importación de grano de maíz en México. Fuente: Foreign Agricultural Service-United States Department of Agriculture (2007).

Dada la escasez de nuevas superficies de suelo en que se podría introducir la producción de maíz, los rendimientos más altos son la única fuente probable para incrementar la producción y satisfacer la demanda creciente que necesita el país (López y López, 1996).



2.2. Aspectos generales de la tolerancia a sequía en plantas

2.2.1. Resistencia a sequía

La definición más práctica de estrés en biología es: aquella fuerza adversa o una condición que inhibe el funcionamiento normal de un sistema biológico, como las plantas (Mahajan y Tuteja, 2005).

El estrés hídrico se puede concebir de cualquier forma: por una insuficiente o una excesiva disponibilidad del agua en el ambiente de la planta. El primer caso se denomina estrés por déficit hídrico (Levitt, 1980). El déficit hídrico se manifiesta cuando el contenido de agua en los tejidos es menor al contenido de agua que se presenta en el estado de mayor hidratación (Taiz y Zeiger, 2006).

La sequía meteorológica es una condición atmosférica caracterizada por un déficit en la cantidad de precipitación pluvial que normalmente se presenta en una región y en un periodo de tiempo dado. Cuando este déficit de precipitación se asocia con alta temperatura, baja humedad relativa y con la radiación solar, se incrementa la evapotranspiración y en consecuencia se acentúa el déficit de humedad en el suelo impidiendo o limitando el desarrollo de los cultivos; esta etapa es la sequía agrícola, que puede durar de uno a varios meses (Nuñez *et al.*, 2007).

El estrés por déficit hídrico también ocurre en ausencia de sequía, por las razones siguientes: excesiva transpiración, inhibición de la absorción de agua por las propiedades del suelo, un exceso de sales en la solución del suelo, aireación deficiente o daño en el sistema radical (Kramer, 1980).

La disminución de la temperatura, la sequía y la salinidad son estresores ambientales que causan las mayores pérdidas económicas en la agricultura (Beck *et al.*, 2007). En México la agricultura de temporal es una de las actividades económicas más afectadas por la sequía. En el periodo de 1994 a 2003 la



superficie agrícola siniestrada por la sequía osciló entre 37 % y 41% (Núñez *et al.*, 2007).

2.2.2 Clasificación de resistencia a la sequía

Se ha definido la resistencia a la sequía como la habilidad que tienen las plantas para producir satisfactoriamente en áreas donde la humedad del suelo esta limitada por condiciones climáticas (Turner, 1980).

La resistencia a la sequía ha sido clasificada de diversas maneras, así Levitt (1980) propone que existen dos tipos de resistencia: a) esquivación al estrés, donde la planta puede prevenir o disminuir la influencia del estrés en sus tejidos. Con ello evita el equilibrio termodinámico con el estrés, parcial o totalmente, ya sea por medio de barreras físicas en las células o por medio de alguna barrera química o metabólica. La esquivación permite a la planta sobrevivir metabolizar, desarrollar y completar su ciclo de vida, estando expuesta al estrés. b) tolerancia al estrés, donde la planta puede resistir aun bajo la influencia del estrés en sus tejidos, pero disminuyendo o eliminando las tensiones; es decir, la tolerancia permite a la planta solamente sobrevivir mientras transcurre el estrés, para después reiniciar su metabolismo y desarrollo normales. Se llega a un equilibrio termodinámico con el estrés sin sufrir daños.

Recientemente Taiz y Zeiger (2006) distinguen dos tipos de resistencia a la sequía: 1) oposición a la desecación, donde la planta tiene la capacidad de mantener sus tejidos hidratados, y 2) tolerancia a la desecación, con la cual la planta funciona mientras se deshidrata. Adicionalmente, tales autores no reconocen a la esquivación como un tipo de resistencia puesto que precisan que ninguna planta realmente esquivada la sequía, más bien todas las plantas que sobreviven la toleran.

Por otro lado, se reconoce como estrés osmótico a la inhibición del proceso de absorción de agua por la planta en presencia de iones en solución en el medio



(Marcum, 2002), fenómeno factible de simularse *in vitro* usando como agente estresante el polietilenglicol (PEG) permitiendo así el análisis de las relaciones hídricas en plantas cultivadas (Pandey y Agarwal, 1998). A diferencia, el estrés por sales causa estrés osmótico y estrés iónico. El estrés osmótico es activado por un exceso de sales en el suelo, mientras que el estrés iónico es causado por la sobre acumulación de iones dentro de las células. Estos tipos de estrés tienen diferentes efectos sobre el estado fisiológico de las plantas (Ueda *et al.*, 2004).

2.2.3. Potencial hídrico y sus componentes

El agua es un elemento indispensable para la planta y la cantidad que se requiere para el proceso fotosintético es de aproximadamente 0.01 % de la cantidad total utilizada; así, la mayoría de las funciones en las cuales participa son de naturaleza física (Sánchez y Aguirreolea, 2000).

El potencial químico del agua es una expresión cuantitativa de la energía libre asociada a sus propiedades. En termodinámica la energía libre representa el potencial para desarrollar un trabajo. Así, el potencial químico es una cantidad relativa y se expresa como la diferencia entre el potencial de una sustancia en un estado dado y el potencial de la misma sustancia en un estado estándar. La unidad de medida para el potencial químico es la energía por mol de sustancia (J mol^{-1}). En fisiología de plantas, el potencial hídrico se define como el potencial químico del agua dividido por el volumen parcial molal del agua ($18 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$), lo cual es una medición de la energía libre del agua por unidad de volumen (J m^{-3}). Estas unidades son equivalentes a las unidades de presión tales como el Pascal, que comúnmente es la unidad de medición común del potencial hídrico (Taiz y Zeiger, 2006).

Salisbury y Ross (1994) definieron al potencial hídrico como el potencial químico del agua en un sistema de interés, expresado en unidades de presión, comparado



con el potencial químico del agua pura, a la misma presión atmosférica y temperatura. Esta definición se puede expresar de la siguiente manera: $\psi = \frac{\mu - \mu^\circ}{\bar{v}}$

Donde:

ψ = potencial hídrico

μ = potencial químico del agua en el sistema considerado

μ° = potencial químico del agua pura

\bar{v} = volumen molar parcial del agua.

Los factores mayores que tienen influencia en el potencial hídrico de las plantas son la concentración, la presión y la gravedad. El potencial hídrico puede dividirse en sus componentes individuales, usualmente escribiéndose como la siguiente suma (Taiz y Zeiger, 2006):

$$\Psi = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g$$

Los componentes denotan el efecto de los solutos, presión y gravedad, respectivamente, sobre la energía libre del agua.

1. El potencial hídrico de la planta (ψ) permite expresar el estado energético del agua en sus células y tejidos mediante sus componentes (Sánchez y Aguirreolea, 2000).

2. Potencial osmótico (ψ_π o ψ_s). Está determinado por la concentración de sustancias osmóticamente activas en las vacuolas y es idéntico a la presión osmótica de este organelo. En las células vegetales el ψ_π siempre posee valores negativos, que varían con el volumen celular (Sánchez y Aguirreolea, 2000).

3. El potencial osmótico también llamado potencial de solutos representa el efecto de los solutos disueltos sobre el potencial hídrico. Los solutos reducen la energía libre por dilución del agua. Esto es principalmente un efecto de entropía; es decir, con la mezcla de solutos y agua se incrementa el desorden del sistema y por consecuencia disminuye la energía libre. Esto significa que el potencial osmótico es independiente de la naturaleza del soluto (Taiz y Zeiger, 2006).



4. Potencial de presión (ψ_p). Cuando el agua entra en la célula, aumenta el volumen de las vacuolas ejerciendo una presión de turgencia sobre las paredes celulares. Al mismo tiempo, se desarrolla en dirección opuesta una presión de igual magnitud a la de turgencia. El potencial de presión adquiere valores positivos, siempre que las vacuolas ejerzan una presión sobre las paredes circundantes; pero a medida que se pierde agua en la célula, la vacuola se contrae y baja el valor del potencial hasta cero (plasmólisis incipiente) (Sánchez y Aguirreolea, 2000).

5. El potencial de presión también indica la presión hidrostática de una solución. Las presiones positivas incrementan el potencial hídrico, mientras que las presiones negativas lo reducen. La presión hidrostática dentro de las células es referida como presión de turgencia. Los valores de este potencial también pueden ser negativos, como en el caso del xilema y de las paredes entre las células, donde una tensión o presión hidrostática negativa puede expresarse (Taiz y Zeiger, 2006).

6. Potencial gravitacional (ψ_g). En el transporte de agua a nivel celular, el componente gravitacional generalmente se omite porque es insignificante comparado al efecto del potencial osmótico y la presión hidrostática (Taiz y Zeiger, 2006).

7. Potencial matricial (ψ_m). Es el resultado de fuerzas que retienen moléculas de agua por capilaridad, adsorción e hidratación, básicamente en la pared celular y el citoplasma (Sánchez y Aguirreolea, 2000). Se presenta en los tejidos con bajo contenido de agua, como las semillas, donde el agua se ubica como una capa ultra delgada rodeando las superficies sólidas por interacciones electrostáticas (Taiz y Zeiger, 2006).

Debido a que los componentes del potencial hídrico tienen en efecto aditivo y en muchos tejidos el potencial matricial y el gravitacional son insignificativos, el



potencial hídrico se puede expresar así (Sánchez y Aguirreolea, 2000; Taiz y Zeiger, 2006): $\Psi = \Psi_p - \Psi_\pi$.

El concepto de potencial hídrico tiene dos usos principales: primero, este potencial gobierna el transporte a través de las membranas celulares; segundo, es útil para medir el estado hídrico de una planta. Debido a la pérdida de agua por transpiración hacia la atmósfera, las plantas requieren hidratación continua. Durante los periodos de sequía, ellas sufren de un déficit hídrico que inhibe el crecimiento de la planta y la fotosíntesis, entre otros procesos fisiológicos (Taiz y Zeiger, 2006).

El grado de estrés por déficit hídrico en la planta, depende de la magnitud en la cual el potencial hídrico y la turgencia de las células se reducen más allá de los valores óptimos (Kramer, 1980). A medida que un suelo se seca, y su potencial hídrico va tomando valores cada vez más bajos, las plantas disminuyen más su potencial hídrico (ψ) con el fin de mantener el gradiente de potencial necesario para la absorción de agua. Cuando ese potencial del suelo desciende por debajo de un nivel crítico [-2.750 megapascales (Mpa)] cesa la absorción y la planta muere (Sánchez y Aguirreolea, 2000).

El proceso más afectado por el déficit hídrico es la expansión celular. La capacidad para mantener la actividad fisiológica disminuye conforme el agua es menos disponible, e implica la acumulación de solutos para mantener la presión de turgencia el uso de energía en órganos no fotosintéticos como las raíces para incrementar la capacidad de absorber agua, o en la construcción de estructuras capaces de soportar una gran presión negativa en el apoplasto (Taiz y Zeiger, 2006).

La pérdida de agua celular, principalmente de la vacuola, conduce a la contracción de toda la célula, no sólo del protoplasto sino también de los poros de la pared celular, resultando un mayor potencial mátrico. La pérdida de agua conduce al punto de la pérdida de turgencia (presión = cero), en consecuencia el



potencial de presión muestra valores negativos (tensión) forzando la pared celular a contraerse y con ello el potencial hídrico tiende a cero (Figura 2). De este modo la pared celular contribuye a la retención de agua en la célula, en mayor medida que el potencial osmótico por si solo (Beck *et al.*, 2007).

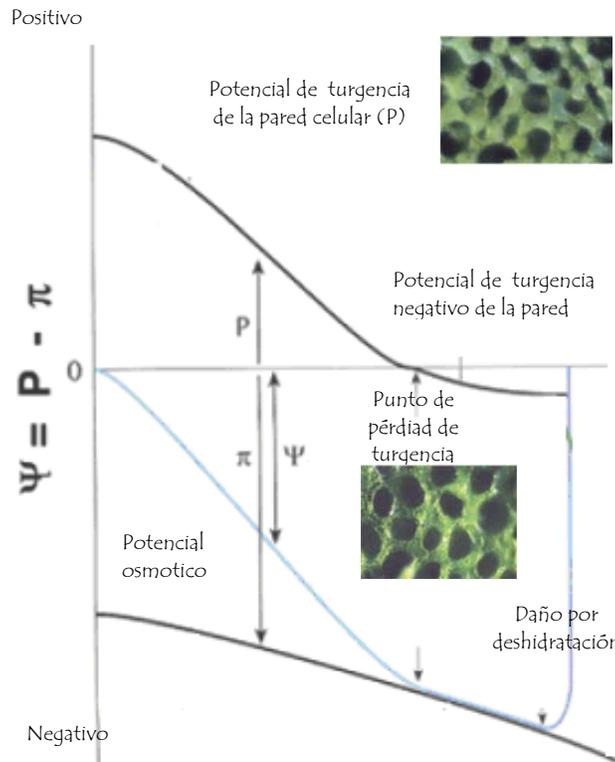


Figura 2. Potenciales hídricos de una hoja de *Pachysandra terminalis*. El potencial de presión presenta valores positivos y se revierte a valores negativos conduciendo a una pérdida de turgencia. Fuente: Beck *et al.* (2007).

En maíz, las tasas de alargamiento de raíces, tallo, hojas, y estilos (inflorescencia femenina) disminuyen conforme el agua en el suelo se reduce, ya que el ψ en la región de la expansión celular disminuye en cada órgano. El ψ requerido para que el crecimiento frene es de -0.50 , -0.75 , -1.0 y -1.4 mega pascales (Mpa), para el tallo, estilo, hojas y raíces respectivamente. El ψ_{π} disminuye en hojas, raíces y



tallos manteniendo la turgencia, mientras que en los estilos, la disminución es mayor y la turgencia se pierde. La pérdida de humedad tiene un efecto negativo sobre el crecimiento y sobre las respuestas de los órganos de la planta, alterando la relación raíz/vástago, es decir altera la acumulación de biomasa en la planta (Westgate y Boyer, 1985). De este modo la tolerancia se ha asociado con un incremento en la asignación de biomasa hacia la mazorca durante su desarrollo bajo sequía, lo cual se refleja en el incremento en el rendimiento (Chapman y Edmeades, 1999).

La morfología de la planta cambia por la selección de individuos establecidos en déficit hídrico (Chapman y Edmeades, 1999). Los caracteres morfológicos modificados por la selección bajo estrés han sido el número de mazorcas por planta, granos por mazorca, peso del grano, altura de la planta, y número de ramas de la espiga (inflorescencia masculina) (Edmeades *et al.*, 1999).

2.2.4. Ajuste osmótico

Debido a que las plantas terrestres experimentan constantes fluctuaciones en la disponibilidad de agua en el suelo, ellas han desarrollado adaptaciones para buscar y absorber agua a través de su sistema radical en el suelo. Aunque las plantas están expuestas a muchos tipos de estrés ambiental, el estrés osmótico, sequía, salinidad o bajas temperaturas, son los más relevantes en la limitación del crecimiento y por lo tanto de su productividad y su distribución. Las plantas responden a estos tipos de estrés a nivel morfológico, anatómico, celular y molecular. Una respuesta celular común al déficit hídrico es el ajuste osmótico. Este concepto se refiere a la disminución del potencial osmótico celular (ψ_{π}) debido a la acumulación de solutos, invirtiendo energía, conforme el potencial hídrico disminuye (Zhang *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2004).

Cuando las células están sujetas a estrés osmótico, ocurre el ajuste osmótico mediante la acumulación de solutos orgánicos e inorgánicos, representando un



mecanismo para mantener un potencial de presión de turgencia (Ψ_p) positivo en bajos potenciales hídricos, puesto que el mantenimiento de Ψ_p positivo generalmente es requerido para la apertura estomática y el crecimiento celular por expansión (Zhang *et al.*, 1999; Moinuddin y Chopra, 2004). Por estas razones el ajuste osmótico determina parcialmente la tolerancia de la planta al estrés hídrico (Pérez *et al.*, 1993a).

Las especies y cultivares difieren en el tipo de solutos acumulados, a saber: aminoácidos (prolina), azúcares (sacarosa y fructanos), poliolos (manitol y pinitol), aminos cuaternarias (glicina betaina), iones inorgánicos (Na, Cl, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y NO₃) y ácidos orgánicos (cítrico, pirúvico, málico, succínico y fumárico) (Pérez *et al.*, 1993a; Zhang *et al.*, 1999).

Ciertas plantas, algas marinas, bacterias y otros organismos acumulan azúcares-alcohol, prolina y compuestos a base de azufre. Estos compuestos se denominan solutos compatibles porque aun en altas concentraciones no inhiben la actividad enzimática (Rathinasabapathi, 2000). Además de incrementar la retención del agua y mantener la turgencia, la acumulación de solutos compatibles puede reemplazar el agua en algunas reacciones bioquímicas y pueden también asociarse a lípidos o proteínas para prevenir la desintegración de membranas, la disociación de complejos proteicos y la inactivación de enzimas (Zhang *et al.*, 1999).

Aunque muchos solutos confieren protección del estrés (osmoprotectores), su biosíntesis difiere. Se sintetizan en respuesta al estrés y se localizan en el citoplasma, mientras que los iones como Na⁺ y Cl⁻ se acumulan en la vacuola (Rathinasabapathi, 2000).

Considerando que la ingeniería metabólica es el mejoramiento directo de las propiedades celulares, a través de la modificación de reacciones bioquímicas específicas o por la introducción de nuevas reacciones, con el uso de la tecnología genética, algunas de las adaptaciones metabólicas al estrés se han modificado en



plantas como tabaco, arroz, *Arabidopsis*, alfalfa y *Brasica* (Rathinasabapathi, 2000).

Puesto que, el Ψ_{π} cambia inversamente proporcional al volumen de la célula o volumen de la solución y directamente proporcional al número de moléculas del soluto, se han propuesto varios métodos para cuantificar la capacidad de ajuste osmótico en planta, los más comunes son: método de regresión de Morgan, método de Ludlow, y el método de la rehidratación. Se ha observado que la capacidad de ajuste osmótico es heredable, lo cual ha sido demostrado en trigo y sorgo, entre otros cultivos (Zhang *et al.*, 1999).

2.2.5. Osmorregulación

La osmorregulación, se define como la regulación del potencial osmótico dentro de una célula por medio de la adición o remoción de solutos de la solución hasta que el potencial osmótico intracelular es aproximadamente igual al potencial del medio (Zhang *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2004).

2.3. Polietilenglicol

2.3.1 Definición

El polietilenglicol (PEG) es un polímero de cadena larga, inerte, no iónico $[\text{HOCH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}]$. De acuerdo a su peso molecular (PM) se clasifican varios: PEG 1000 (950-1050 PM), PEG 4000 (3000-3700 PM), PEG 6000 (6000-7500 PM), PEG 8000 y PEG 20000 (15000-20000 PM) (Cell Chemical Company, 2000).

2.3.2. Principales características como agente osmótico

Una característica importante de este polímero es que no penetra las células cuando su peso molecular es alto (Steuter y Mozafar, 1981). Con la adición de



PEG en un medio acuoso (g kg^{-1} de H_2O) disminuye negativamente el potencial hídrico (Ψ). Se ha sugerido que el Ψ de la solución con PEG es resultado de las fuerzas matriciales (Ψ_m) de las subunidades oxido-etileno del polímero. A mayor peso molecular, se necesita menor concentración para lograr cierto valor del Ψ , y viceversa; así que los cambios en el Ψ dependen de la temperatura de la solución y de la concentración de PEG; por ejemplo a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y 20 % de PEG-6000 o de PEG-20000 el Ψ ya no presenta valores inferiores a -7 bar (Michel y Kaufmann, 1973; Steuter y Mozafar, 1981).

2.3.3. Aplicaciones generales

El PEG es efectivo como un solvente no volátil por su alto punto de ebullición. Dado que el grado de condensación es manejable, existe un amplio espectro de productos, desde sólidos rígidos hasta líquidos. Conforme el grado de condensación aumenta, su propiedad higroscópica disminuye (Cell Chemical Company, 2000).

Tiene baja toxicidad, por lo que no hay daño en caso de contacto con la piel humana. Se usa en la elaboración de esponjas y gomas de látex. Se usa como suavizante, agente antiestático, agente limpiador. Tiene un efecto suavizante del papel. Evita la contracción y quiebra de la madera. Es usado como base en la elaboración de pomadas, shampoos, cremas, lociones. Se usa como aditivo en pinturas y resinas. Mejora el proceso de molienda y es usado para evitar corrosión y en la limpieza de metales. En medicina es utilizado como acarreador de proteínas. Es un aditivo para las dietas animales. En la ingeniería genética de plantas es útil en un método de transformación (Jauhar, 2006).



2.3.4 Usos del polietilenglicol como agente osmótico

2.3.4.1 Respuestas *in vivo*

Varios estudios, han usado el polietilenglicol (PEG) disuelto en una solución nutritiva para simular el estrés osmótico con experimentos *in vivo*. Otros agentes osmóticos como sales, manitol y sorbitol penetran las células y en consecuencia confunden la respuesta fisiológica (Ogawa y Yamauchi, 2006a). Según Hohl y Schopfer (1991) el manitol es absorbido participando en el ajuste osmótico del tejido por lo que confunde los efectos del estrés osmótico y las respuestas fisiológicas. Por otra parte, el estrés por salinidad causa tanto estrés iónico como estrés osmótico, mientras que el PEG solamente tiene un efecto osmótico (Ueda *et al.*, 2004). En consecuencia el PEG resulta más apropiado para estudiar las relaciones hídricas del tejido (Hohl y Schopfer, 1991), procurando que las soluciones acuosas con PEG se oxigenen para evitar el efecto de hipoxia (deficiencia de oxígeno) en las raíces de las plantas de maíz (Verslues *et al.*, 1998). Adicionalmente se ha encontrado que el comportamiento de plántulas de especies monocotiledóneas es diferente al que muestran las dicotiledóneas cuando se desarrollan en varios niveles de estrés osmótico impuesto con PEG-20000. En general, las monocotiledóneas resultan más sensibles al estrés a nivel del sistema radical, inclusive existen diferencias significativas entre especies (Materechera *et al.*, 1992).

Por sus características el PEG (Cell Chemical Company, 2000), se ha empleado como agente que induce estrés por déficit hídrico en varias especies de plantas, como *Lycopersicon esculentum* (Bressan y Hasegawa, 1981; Handa y Bressan, 1982, Bressan *et al.*, 1982), en *Oryza sativa* (Yeo y Flowers; 1984, Pandey y Agarwal, 1998), *Capsicum annuum* (Santos y Ochoa, 1994), *Eleusine coracana* (Uma *et al.*, 1995), *Triticum aestivum* (Kerepesi y Galiba, 2000; Pauk *et al.*, 2002), *Zea mays* (Jía *et al.*, 2001) y en *Picea glauca* (Stasolla *et al.*, 2003).



En arroz, el uso de PEG más NaCl disminuye la toxicidad de la sal en las plántulas y por lo tanto reduce su tasa de muerte. El PEG tiene efecto al reducir el transporte de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ hacia el interior del tejido (Yeo y Flowers, 1984). En ésta misma especie, el estrés inducido por PEG causa la acumulación de prolina en el vástago y reduce la actividad de la enzima nitrato reductasa en las plantas (Pandey y Agarwal, 1998).

Existe mayor frecuencia de estudios *in vivo* que consideran a la fotosíntesis como proceso metabólico más afectado por el estrés osmótico, dependiendo del grado de tolerancia del genotipo.

Considerando que la sequía es la combinación de factores estresantes como alta intensidad lumínica, alta temperatura y déficit hídrico, Jagtap *et al.* (1998) estudiaron las respuestas fisiológicas del sorgo a cada factor por separado. Determinaron que cada factor tiene efectos diferentes sobre las plantas, pero el estrés por déficit hídrico simulado con PEG-6000 (7.5 %), adicionado a la solución nutritiva tuvo los efectos más detrimentales sobre la acumulación de biomasa, contenido de clorofila, eficiencia del fotosistema II, actividad de la enzima PEPcarboxilasa y sobre la producción de oxígeno fotosintético. Tales efectos fueron menos drásticos en la variedad tolerante a la sequía. Por otra parte, Bhargava y Paranjpe (2004) evaluaron plántulas del mismo cultivo pero incrementando gradualmente el contenido de PEG-6000 en la solución nutritiva de 5% hasta 25 % durante una semana. Al intensificar el estrés osmótico las hojas mostraron menor contenido relativo de agua, baja tasa fotosintética, reducida conductancia estomática y menor eficiencia del transporte de electrones hacia el fotosistema II, principalmente en las variedades susceptibles. Sin embargo, la concentración intercelular de CO₂ incrementó con el estrés indicando que la inhibición de la actividad fotosintética se debió a factores metabólicos.

Cultivos hidropónicos de plántulas de trigo fueron sometidos a estrés hídrico con PEG. Los genotipos tolerantes acumularon carbohidratos reductores (sacarosa y fructuosa) en mayor cantidad con respecto a los genotipos sensibles. Esta



acumulación de carbohidratos solubles en el tallo se sugirió como marcador para seleccionar aquellos materiales más tolerantes (Kerepesi y Galiba, 2000).

Una serie de trabajos efectuados en trigo bajo estrés osmótico indican que con una concentración de 21 % de PEG-4000, adicionado a la solución nutritiva durante 7 d, disminuyó la conductancia estomática, la fotosíntesis neta, y el contenido de agua; pero aumentó la eficiencia en el uso del agua y el contenido de ácido abscísico, principalmente en la variedad tolerante Kobomugi (Nagy y Galiba, 1995). Usando esta variedad tolerante de trigo y PEG-6000, Gallé *et al.* (2002) encontraron una disminución del crecimiento relativo de la planta, del potencial hídrico foliar, del potencial osmótico foliar y el rendimiento cuántico del fotosistema II pero, con mayor énfasis en la variedad susceptible. Los resultados indicaron que la variedad Kobomugi conservó mayor agua en sus tejidos por el rápido cierre de estomas, manteniendo tanto el potencial osmótico como la actividad fotosintética sin cambios significantes. En forma similar Liu *et al.*, (2004) detectaron en plántulas de trigo estresadas con PEG-6000 (-0.55 MPa) una disminución del contenido de agua en las hojas, menor tasa de crecimiento de la planta y baja actividad de las enzimas H⁺-ATPasa y H⁺-PPasa del tonoplasto de vacuolas de la raíz, principalmente en la variedad susceptible. En la variedad tolerante se incrementó el contenido de espermidina y putrescina en el tonoplasto en comparación con la variedad susceptible en respuesta al estrés osmótico.

Para estudios del estrés por déficit hídrico en maíz, se ha empleado el PEG al 20 %, y se produjo un incremento significativo de ABA en raíz y hoja. La acumulación de ABA, se relacionó más con la pérdida de peso en el tejido que con el potencial osmótico. Los resultados indican que el inicio de la acumulación de ABA esta relacionada con cambios en el volumen celular (Jía *et al.*, 2001).

En plántulas de maíz de 13 d de edad, cultivadas bajo estrés osmótico (-1.4 MPa) con sorbitol durante 24 h en macetas, el contenido relativo de agua en las hojas disminuyó significativamente (de 99.2 % a 73.0 %) (Valentovic *et al.*, 2006). El menor contenido de agua en plántulas de maíz de 4 a 6 semanas de edad bajo



estrés osmótico (-0.35 MPa) con PEG (16.23 %) por 48 h se explicó por la reducción en la tasa de absorción de agua, la cual recuperó su ritmo normal al retirar las plántulas del estrés (Van der Weerd *et al.*, 2001).

2.3.4.2 Respuestas *in vitro*

La selección *in vitro* para tolerancia a la sequía se ha logrado adicionando al medio de cultivo moléculas no penetrantes, de alto peso molecular y osmóticamente activas, tales como PEG-4000 o PEG-6000. Puesto que el incremento en la tolerancia a la sequía esta comúnmente asociada al incremento a la tolerancia a la salinidad, las plantas obtenidas de cultivos *in vitro* tolerantes a la sal (NaCl), podrían también ser candidatos para su evaluación en resistencia a la sequía (Nabors, 1992). Los estudios de las respuestas al estrés, usando PEG y NaCl, han demostrado que es factible detectar variación genotípica a nivel de plántula. Con ambas sustancias se han detectado fenotipos de tomate y maíz tolerante y susceptible, incluso el comportamiento de los genotipos ha sido similar en PEG y en NaCl (Uma *et al.*, 1995).

Mejía (2001), reporta en maíz que la capacidad de multiplicación de los brotes del explante sujetos a la influencia del estrés por PEG se mantiene; sin embargo, las variables altura del brote y su número de hojas expandidas disminuyen afectando su vigor. Las hojas de los brotes cultivados en estrés mostraron consistencia más dura en comparación con aquellas cultivadas sin el agente estresante. Durante el proceso de multiplicación de los brotes *in vitro* con estrés, aproximadamente el 33 % no se multiplica, 19 % desarrolla órganos florales, y sólo el 48 % producen brotes vegetativos que son capaces de regenerar una planta completa. Los análisis histológicos de brotes con tres ciclos de selección en PEG (12.5 % de concentración), indicaron que los brotes se originan de yemas axilares de los nudos del tallo, como resultado de la continua proliferación por organogénesis. Estas yemas axilares dieron origen a nuevos brotes que mostraron conexión con el tejido vascular, lo que permite suponer que su origen fue similar a sus



precursoras. Los cortes histológicos en ellos permitieron observar la presencia de almidón en los primordios vegetativos y reproductivos. Se infiere que el almidón puede estar relacionado con el ajuste osmótico en las células.

Adicionalmente, trabajando con maíz *in vitro*, se usaron brotes para estudiar su respuesta al estrés osmótico impuesto por PEG 8000 en diferentes dosis (desde 0% hasta 30%), como el agente simulador del déficit hídrico. El número de explantes con brotes disminuyó conforme se incrementó la concentración del agente. La altura de los brotes se afectó en función de los genotipos de maíz evaluados. Su estudio histológico indicó que los brotes provenientes de yemas axilares presentaron un crecimiento más vigoroso que los brotes originados de *novo*. Así la variable altura del brote se relacionó con la tolerancia al déficit hídrico. Las líneas evaluadas tendieron a producir gran frecuencia de inflorescencias femeninas, masculinas y algunos brotes vegetativos. Fue evidente que las concentraciones de PEG afectaron el proceso de diferenciación en los brotes de varios genotipos, así como el crecimiento en longitud (Iracheta, 2002).

En arroz, una vez que se seleccionaron callos por su tolerancia a la salinidad *in vitro*, se regeneraron plantas que se cultivaron en campo. Posteriormente, para confirmar su tolerancia, se usaron plántulas de la línea original y de los clones para someterlas a estrés con una solución nutritiva conteniendo 15 % de PEG-6000. Después de 6 semanas en tales condiciones se encontró que los clones sobrepasaron a la línea original en porcentaje de plántulas sobrevivientes, contenido de prolina y de azúcares solubles en las hojas. En consecuencia se confirmó una correlación de la tolerancia *in vitro* con el comportamiento *ex vitro* y que la variación somaclonal durante el cultivo de callos permitió seleccionar variantes tolerantes (Vajrabhaya *et al.*, 2001).



2.4. Relación dosis-respuesta en estudios de estrés

2.4.1. Importancia

Un agente tóxico es el productor de una respuesta adversa en un sistema biológico. En términos cuantitativos la intensidad de la respuesta biológica es proporcional a la dosis que actúa sobre el organismo; así, se ha podido establecer una correlación matemática que describe esta interacción (Valle y Lucas, 2000).

Para determinar la relación “dosis-respuesta” de un agente tóxico de origen sintético sobre un organismo, se deben considerar los siguientes factores: a) selección del tipo de variable respuesta y su cuantificación, b) definición del organismo de prueba (sistema biológico), c) período de experimentación o duración del ensayo, d) serie de dosis a probar y, e) vía de administración (Valle y Lucas, 2000).

La respuesta biológica para una población de animales o plantas, cuando se ensayan varias dosis; de un agente tóxico se representan dichas dosis administradas en las abscisas y el porcentaje de respuesta en las ordenadas, se obtiene una curva ascendente como la mostrada en la Figura 3, la cual muestra que al incrementar la dosis la respuesta inicial es rápida, pero a mayores dosis los incrementos en la respuesta son más moderados y tienden a ser asintóticos (Valle y Lucas, 2000).



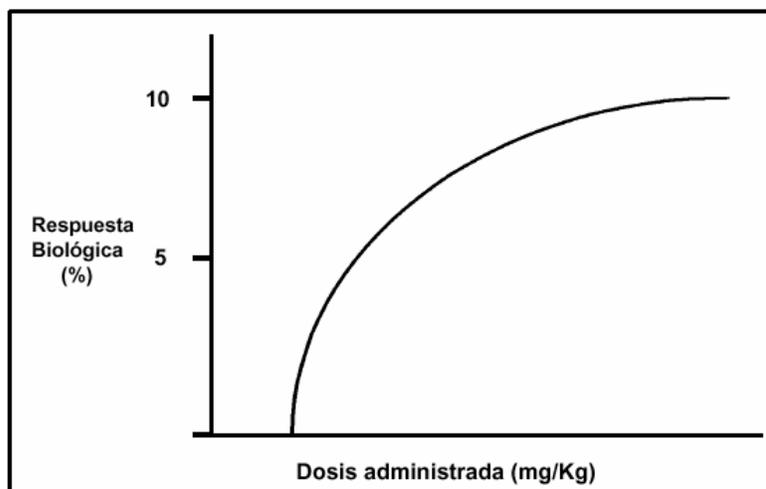


Figura 3. Curva dosis-respuesta sin ninguna transformación estadística de los datos (Fuente: Valle y Lucas, 2000).

Una modificación a la relación dosis-respuesta es la transformación de las dosis a valores logarítmicos, con esto se obtiene una curva sigmoideal simétrica (Figura 4). En esta curva, la parte media es lineal y por consiguiente se tiene una mayor precisión en los cálculos por regresión. Por esta razón se decidió tomar el valor de 50% de la respuesta y la dosis correspondiente (Dosis media efectiva) para caracterizar el grado de toxicidad de una sustancia (Valle y Lucas, 2000).

Para la determinación de la dosis media efectiva (DE_{50}) y valores extremos, se realizan transformaciones en los datos para obtener una representación lineal. En un principio fue el uso de la dosis (en el eje X) transformada a logaritmo de base 10; posteriormente surgió la idea de que la respuesta (en el eje Y) de los individuos se transformara a unidades probit (probability unit, en lengua inglesa).



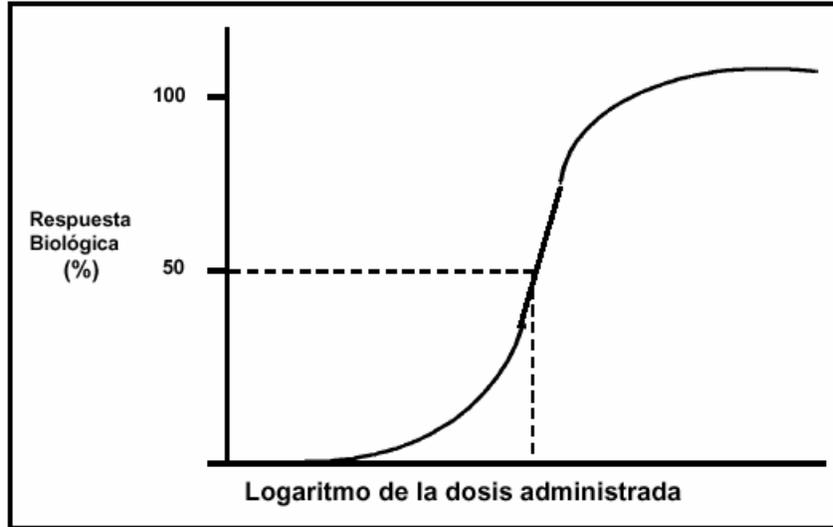


Figura 4. Curva de toxicidad en función de la dosis de un agente químico (Fuente: Valle y Lucas, 2000).

Lo anterior resultó porque la curva sigmoide es relativamente lineal entre 16% y 84% de la respuesta, lo que corresponde aproximadamente a los límites de una desviación estándar de la media de la población ($\bar{\mu} \pm \sigma$). Ya que la respuesta biológica sigue una distribución normal es posible manejar unidades de probabilidad denominadas desviaciones equivalentes normales ($DEN = \frac{\chi_i - \mu}{\sigma}$), y para evitar valores negativos se transforman los valores de la respuesta en unidades probit ($Y_i = DEN + 5$) como se puede observar en el Cuadro 1 (Valle y Lucas, 2000).



Cuadro 1. Unidades Probit obtenida a partir de los valores de la respuesta a un agente químico (Valle y Lucas, 2000).

Respuesta (%)	DEN	Unidades Probit
0.1	-3	2
2.3	-2	3
15.9	-1	4
50.0	0	5
84.1	+1	6
97.7	+2	7
99.9	+3	8

La ventaja de la transformación a unidades Probit es que la relación dosis-respuesta es lineal y por consiguiente se obtendrá una reducción en el número de individuos a ensayar para establecer el análisis de regresión (Valle y Lucas, 2000).

2.4.2. Dosis y concentración letal media.

Un parámetro para definir el grado de toxicidad de una sustancia lo constituye la dosis letal media (DL_{50}). Es la dosis a la cual se produce la muerte al 50 % (la mitad) de los individuos sujetos al estímulo. Estadísticamente se puede calcular el intervalo probable en que se presenta la DL_{50} , por medio de regresión lineal, entre el logaritmo de las dosis y las unidades Probit correspondientes a los valores de la respuesta. Por ejemplo, si la $DL_{50}=11.5$ indica que se requieren 11.5 mg de tóxico por Kg de peso para matar al 50% de la población de un grupo de ratones (Infante y Calderón, 1980; Valle y Lucas, 2000).

Cuando se habla de agentes como compuestos volátiles dispersos en la atmósfera o en agua, se acostumbra definir el grado de toxicidad de los compuestos por un índice: “la concentración letal media” (CL_{50}). Esta es la concentración del agente que se encuentra en el aire o agua (generalmente expresado en términos de ppm o $mg L^{-1}$), que causa la muerte en el 50% de los individuos de experimentación.



Cuando se reporta un CL_{50} es indispensable anotar el tiempo de exposición (Valle y Lucas, 2000).

2.5. Selección recurrente

2.5.1. Definición

La selección recurrente se define ampliamente como la selección sistemática de individuos deseables de una población, seguida de la recombinación de tales individuos para formar una nueva población. Este proceso se visualiza como un ciclo que incluye el desarrollo de la población, evaluación de los individuos de la población y la selección de los individuos superiores como progenitores para formar una nueva población para el siguiente ciclo de selección (Fehr, 1993). Con esto se logra cambiar en determinado sentido la media genotípica de una población, de una generación a la siguiente, ya que los individuos o familias seleccionadas conformarán la muestra de progenitores que se aparearán esperando que la progenie sea superior (Molina, 1992).

Un ciclo de selección es completado una vez que una nueva población ha sido formada. La población inicial que se desarrolla para un programa de selección recurrente es conocida como la población base o población del ciclo cero. La población formada después de un ciclo de selección se nombra población del ciclo uno; la población del ciclo dos se desarrolla del segundo ciclo, y así sucesivamente (Fehr, 1993).

La selección es un proceso muy antiguo y para su implementación se deben considerar dos aspectos fundamentales: 1) La selección solo actúa sobre diferencias heredables, 2) la selección no crea variabilidad sino que actúa sobre la ya existente. Al aplicar algún método de selección es requisito indispensable conocer la heredabilidad del carácter. Este rasgo determina que la selección sea eficiente y permite emplear el método idóneo de selección (Flores, 2001).



2.5.2. Importancia

El objetivo de la selección recurrente es mejorar una o dos poblaciones considerando uno o más caracteres. Las poblaciones mejoradas se usan como variedades por sí mismas, como progenitores para una variedad híbrida, y como una fuente de individuos superiores que se usan como líneas mejoradas, líneas puras, clones o progenitores para una variedad sintética (Fehr, 1993).

El progreso a través de la selección recurrente depende de la siguiente regla: cuando los fenotipos superiores son seleccionados, se espera que se hayan seleccionado los genotipos sobresalientes; es decir el fenotipo y genotipo están correlacionados en algún grado. De otro modo el progreso a través de selección sería imposible. El grado en el cual el comportamiento genotipo de los progenitores superiores se transmite a la descendencia depende de la heredabilidad de la característica bajo selección (Hallauer y Miranda, 1981). Existen varias formas para lograr progresos en el mejoramiento a través de la selección: incrementando la presión de selección, explotando la varianza aditiva, incrementando la variación genética, y controlando los efectos ambientales (Hallauer y Miranda, 1981).

Existen características que deben ser considerados como básicas en el mejoramiento de plantas, en función del arquetipo de planta que cubra las necesidades y los objetivos de un programa de fitomejoramiento. Sin embargo, además de la morfología de la planta, las características de naturaleza bioquímica, son importantes ya que forman parte de la respuesta al estrés y pueden ser usados como nuevos indicadores en el proceso de selección. Por lo anterior, es recomendable detectar e investigar a fondo los criterios de selección convenientes en el mejoramiento de las plantas (Flores, 2001). Adicionalmente, muchas de las características de las plantas que tienen importancia agronómica se debe a la acción de poligenes, por lo tanto son recomendables métodos de



genética cuantitativa para desarrollar el proceso de selección y determinar el avance genético promedio por ciclo (Vega, 1988).

2.5.3. Métodos de selección convencional

Un método genotécnico es el conjunto de técnicas de campo y de logística basadas en la teoría de uno de los sistemas de selección (Márquez, 1985). Los métodos genotécnicos se clasifican en tres grupos: selección masal, selección familiar y selección combinada (Molina, 1992; Márquez, 1985), los cuales se describen a continuación.

Selección masal. La unidad de selección es el individuo y la forma de recombinación de los individuos seleccionados origina dos modalidades; a) la recombinación ocurre con polinización libre antes de seleccionar los individuos, por lo tanto hay control solamente del progenitor femenino; y en b) donde la recombinación se realiza entre los individuos previamente seleccionados.

Selección familiar. En este tipo las unidades de selección son grupos de individuos que tienen entre ellos el mismo grado de parentesco. En el caso del maíz se tienen las siguientes variantes:

c) *Familias de medios hermanos.* Es la progenie que resulta al tomar mazorcas derivadas por polinización libre, por cruza fraternales. Los individuos tienen en común el progenitor femenino pero diferentes progenitores masculinos.

d) *Familias de hermanos completos.* Proviene del cruzamiento entre un par de plantas. La progenie tiene en común ambos progenitores.

e) *Líneas S_1 o familias de autohermanos.* Proviene de la autofecundación de las plantas.

La diferencia entre los métodos de selección familiar es el tipo de polinización controlada que se hace para recombinar los genes de las familias seleccionadas y así obtener nuevas familias.



Selección combinada. Consiste en la unión de diferentes métodos ya mencionados. De esta manera surgen 9 métodos de selección combinada: (c+a), (c+b), (d+a), (d+b), (e+a), (e+b), (c+d+a), (c+d+b) y (c+b+e+a).

En general los métodos genotécnicos convencionales divergen en la proporción de la varianza genética aditiva que abarcan por ciclo de selección (respuesta a la selección), el número de estaciones de cultivo que requieren, el tipo de familias que se seleccionan y los recursos materiales invertidos.

La selección de un método de mejoramiento debe conducirse con base a la tecnología disponible, el cultivo (tipo de reproducción, su uso y su grado de domesticación), la característica de interés (monogénico, poligénico y si esta disponible en el germoplasma sexualmente compatible), la infraestructura y las necesidades del consumidor (Cassells y Doyle, 2003).

2.5.4 Aplicación de la selección recurrente en selección *in vitro*

No obstante de que la selección *in vitro* de células en suspensión por tolerancia a la salinidad presenta varias ventajas, pocos reportes muestran que se han regenerado plantas tolerantes a partir de las células seleccionadas. Tal es el caso de la selección *in vitro* de callos, de células en suspensión y de embriones somáticos de *Vitis rupestris*, donde hubo embriones que toleraron la salinidad; sin embargo, en la etapa de regeneración no hubo éxito puesto que algunos embriones se tornaron ennegrecidos y murieron (Lebrum *et al.*, 1985). Estos cambios cualitativos de ennegrecimiento también se observaron en callos de maíz sometidos a estrés por salinidad (Urechean, 2003). Por su parte, Dracup (1991) indica que la selección *in vitro* de células por tolerancia a la salinidad ha tenido escasos éxitos ya que las plantas regeneradas no expresan esa característica *ex vitro*, aunado a varios problemas técnicos para la estimación de parámetros hídricos en las mismas.



Lebrum *et al.* (1985) criticaron la autenticidad de una tolerancia de origen genético o la ocurrencia de una adaptación fisiológica transitoria presentada en las células y embriones durante su cultivo bajo estrés. Al respecto Chadler *et al.* (1988) postulan que durante el proceso de selección de células en suspensión no existe o se pierde la capacidad de regeneración. Por ello, plantearon como alternativa la selección *in vitro* de brotes suponiendo una mayor capacidad de regeneración. Este enfoque lo aplicaron a varias especies (*Beta vulgaris*, *Nicotiana tabacum*, *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* y *Brassica napus*), usando meristemas apicales como explantes y la vía de organogénesis directa para obtener brotes adventicios, los cuales se seleccionaron en varios niveles de salinidad. La selección por tolerancia consistió en subcultivar aquellos brotes saludables y verdosos. Después de la selección se establecieron en medio de cultivo con varios niveles de salinidad (0, 70 y 140 mM de NaCl). Con excepción de *Beta vulgaris*, en las demás especies no se encontró evidencia de tolerancia, ya que los brotes presentaron menor vigor con respecto al testigo. Los investigadores indican que la ineficiencia de la selección en algunas especies podría obedecer a la baja variación genética en los brotes adventicios, lo cual indica que la variabilidad para tolerancia a la salinidad es expresada únicamente en callos y en consecuencia la tolerancia no puede obtenerse usando brotes. Por su parte, Sharry y Taxeira (2006) obtuvieron callos organogénicos de *Melia sp.* tolerantes a la salinidad, reflejado en su mayor tasa relativa de crecimiento. Explican que esa tolerancia pudo deberse a la existencia de variación genética en los explantes (cotiledones) o la ocurrencia de alguna mutación durante el cultivo.

Existen otros casos donde se combina la selección *in vitro* con la subsiguiente regeneración de plantas, así se ha logrado la generación de plantas de arroz resistentes a concentraciones tóxicas de aluminio en el medio de cultivo. Por otro lado, se observó la aparición de plantas resistentes a partir de callos de variedades susceptibles mantenidos en medio de cultivo sin aluminio. En otro caso ocurrió la obtención de resistencia a *Fusarium oxysporum* en clavel.



Cultivando callos derivados de segmentos internodales de dos cultivares susceptibles durante dos ciclos de selección. El 32 % de las plantas regeneradas presentó considerable resistencia al patógeno en experimentos de campo (Cardone *et al.*, 2004).

En ambos casos la obtención de resistencia fue posible porque ésta característica existía en la población original (entonces el cultivo serviría sólo para recuperar los genotipos útiles), o bien, surgió por variación somaclonal durante el proceso de cultivo (Cardone *et al.*, 2004).

En otras investigaciones se ha usado el PEG durante la selección *in vitro* de alfalfa. Dragiiska *et al.*, (1996) tomaron explantes de plántulas de alfalfa cultivadas *in vitro* promoviendo la embriogénesis indirecta en presencia de PEG (10 %). Los embriones desarrollados se seleccionaron y cultivaron sin agente estresante hasta regenerar plantas. En el segundo ciclo de selección se tomaron explantes de las plantas regeneradas y luego se indujo la embriogénesis en presencia del agente osmótico; nuevamente los embriones desarrollados se cultivaron en medio de cultivo sin estrés osmótico donde se maduraron y se regeneraron plántulas. Se repitió lo anterior con las plantas regeneradas para completar un tercer ciclo de selección. Finalmente se obtuvieron cuatro plantas y para corroborar su tolerancia se sumergió su sistema radical en una solución acuosa con 15 % de PEG. En esta fase se observó que las plantas seleccionadas *in vitro* presentaron mayor biomasa, longitud del tallo, número de nudos y longitud de los entrenudos con respecto a las plantas de la población original.

Por otra parte se ha hecho selección *in vitro* de células de chile variedad Tampiqueño-74 cultivados en medio líquido con 15 % de PEG-8000. Hubo dos clones celulares seleccionados por su capacidad de crecer en esa concentración y posteriormente se sometieron a mayores niveles de estrés (20 % y 25 %). Se observó que los clones tolerantes tuvieron mayor crecimiento en 5 % y 10 % de PEG con respecto al testigo (0 %), pero con mayor estrés (15 % a 30 %) el



crecimiento disminuyó, en mayor medida en las células originales. Sin embargo, la regeneración no fue exitosa (Santos y Ochoa, 1994).

También se ha hecho la selección *in vitro* de callos de trigo en presencia de sal (10 g L⁻¹ de NaCl) en el medio de cultivo sólido. Las plantas regeneradas se cultivaron y sus semillas se sembraron *in vitro* con diferentes niveles de salinidad. Las plántulas del material seleccionado presentaron mayor longitud de raíz y de coleóptilo con respecto al material original (no seleccionado *in vitro*) en los mayores niveles de salinidad (20 y 30 g L⁻¹). La evaluación en madurez fisiológica no arrojó diferencias significantes en cuanto a la longitud y número de granos por espiga y altura de planta (Zair *et al.*, 2003); es decir, la tolerancia a la salinidad no implicó una reducción en los componentes del rendimiento de grano. Esto lo demostró Abdel-Ghany (2004) al determinar que las variedades de trigo cultivadas *in vitro* y sobresalientes bajo estrés osmótico, no necesariamente tuvieron el mejor rendimiento de grano en campo.

2.6. Usos de la variación somaclonal en la selección *in vitro*

2.6.1. Introducción

A pesar del éxito obtenido por los programas del fitomejoramiento convencional, especialmente tras la aplicación de nuevas herramientas de selección y ampliación de la base genética disponible para la misma, han surgido algunos límites bien definidos, a saber (Benítez, 2005):

- ✓ La imposibilidad de realizar la manipulación dirigida de la secuencias de ADN
- ✓ La imposibilidad de evitar la co-trasferencia de genes ligados al gen que confiere la característica de interés bajo selección, dando lugar a características fenotípicas indeseadas (pleiotropismos)
- ✓ Un tiempo prolongado necesario para la incorporación de los genes



de interés, la eliminación de genes responsables de efectos pleiotrópicos y la obtención final de una variedad aceptable.

2.6.2. Características de la variación somaclonal

Cuando se trata de una regeneración vegetativa, las plantas regeneradas a partir de explantes diploides deberían ser idénticas a la planta madre. No obstante, esto no es siempre así. Se ha observado entre las plantas regeneradas una variación, que afecta negativamente al productor comercial puesto que este busca la uniformidad, pero afecta positivamente al fitomejorador ya que puede conseguir variantes cuyas características esenciales conviene conservar (Cubero, 2003).

El cultivo *in vitro* por si mismo puede ser estresante para las células vegetales e involucra procesos mutagénicos durante el establecimiento del explante, la inducción de callo, la formación de embriones y la regeneración de plantas. Por esta vía es posible obtener variación, útil en el mejoramiento vegetal, denominada variación somaclonal o somatoclinal, la cual involucra cambios en las plantas regeneradas que son transmitidos a la progenie. Asimismo cabe citar la ocurrencia *in vitro* de interacciones no específicas que no generan variación estable y transmisible, pero que conducen a cambios en la expresión génica. Dichos cambios, denominados epigenéticos, son también considerados por algunos autores como variación somaclonal mientras que otros sólo incluyen los cambios estables (Cardone *et al.*, 2004)

Entre los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal están las alteraciones en el cariotipo, mutaciones puntuales, recombinación somática e intercambio de cromátidas hermanas, rearrreglos génicos somáticos, transposones, amplificación y/o metilación del ADN, y cambios en el ADN de los organelos. Por ello, aunque los caracteres morfológicos son sencillos de evaluar, muchos aspectos de la variación suceden sin manifestarse en cambios morfológicos evidentes (Cardone *et al.*, 2004).



Si bien desde el punto de vista práctico la variación somaclonal no resulta conveniente en todos los casos, debido a que no es posible predecir ni dirigir el tipo de variación y es necesario trabajar con grandes poblaciones de plantas, es entender el mecanismo para evitarla en casos donde se quiere fidelidad genética, como en la micropropagación, la conservación de germoplasma y la transformación de plantas. No obstante en algunos casos, puede representar una fuente rápida y fácilmente accesible de variación para utilizarse en programas de mejoramiento, especialmente para especies con sistemas genéticos limitados y/o de base genética estrecha (Cardone *et al.*, 2004).

2.6.3. Factores relacionados con la generación de variación somaclonal

La aparición de la variación somaclonal depende de varios factores, entre los que se han citado (Cardone *et al.*, 2004):

Genotipo. En general se asume que la frecuencia de cambios dependerá de variaciones preexistentes en el genotipo y de las interacciones que surgen entre el genotipo y el proceso de cultivo.

Nivel de ploidía. Los poliploides, con más de dos juegos completos de cromosomas, toleran la ganancia o pérdida de cromosomas, pudiendo así cumplir con los requisitos para la regeneración. En los diploides, la pérdida o la alteración de cromosomas que llevan genes vitales impedirán la regeneración de las plantas, llegando con éxito a esta etapa sólo aquellos explantes que tengan su complemento cromosómico completo.

Explante. Las quimeras son mosaicos genéticos. Esto significa que dentro de una misma planta existen células con diferente constitución genética, lo cual se debe a una serie de cambios producidos en el ADN nuclear de ciertos tipos celulares. Si estos tejidos se utilizan como explantes y sus células son inducidas a dividirse y rediferenciarse, las diferentes líneas celulares podrían originar a plantas genéticamente diferentes. Por lo tanto, la utilización de explantes con tejidos



quiméricos preexistentes puede resultar en una fuente extra de variación. Sin embargo, la recuperación de quimeras a partir de explantes no quiméricos es un fenómeno frecuente que puede ocurrir a partir de procesos organogénicos.

Vía de regeneración. En especies de los géneros *Pennisetum*, *Panicum*, y *Lolium* la variación observada en cultivos embriogénicos es relativamente menor que la que aparece en cultivos organogénicos. Esto probablemente se debe a la gran presión de selección impuesta en la formación de los embriones, mayor que la requerida en la formación de brotes. Se postula que el gran número de genes requeridos para la iniciación y maduración de embriones cigóticos y somáticos impediría la acumulación de mutaciones deletéreas. Sin embargo, se ha observado variantes en plantas de café, apio y caña de azúcar regeneradas a través de embriogénesis somática.

La mayor parte de la variación obtenida *in vitro* parece provenir de la fase de callo. La iniciación de un callo puede ser análoga a la respuesta de las plantas a heridas, dando se activan transposones y estimulan enzimas y productos específicos que se inducen también en situaciones de estrés. Cuando comienza la división celular a partir de tejidos diferenciados, que dará origen a un callo, se incrementa el riesgo de inestabilidad cromosómica. La variación que ocurre en los números cromosómicos en la primera fase de la inducción del callo sería el resultado de fragmentación nuclear seguida por mitosis de los fragmentos nucleares, combinada con la mitosis normal de los núcleos intactos (núcleos euploides).

Medio de cultivo. El estado físico del medio de cultivo también influye en el nivel de variación obtenida. Un mismo explante puede tener diferente comportamiento si se cultiva en medio sólido o en medio líquido.

Las fitohormonas, principalmente el 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) también pueden ser inductores de inestabilidad, ya que ejercen profundos efectos sobre la respiración celular, el consumo de azúcares y en el control de la división celular. Por ello se especula acerca de su participación indirecta en la inducción



de cambios en el metabolismo celular y tisular de plantas creciendo *in vitro*. Aparentemente el 2, 4-D involucra un incremento sustancial en la transcripción que puede alterar la estructura de la cromatina, por lo que se sugiere que induce desdiferenciación y este proceso sería el generador de los cambios.

El 2,4-D, el AIA (ácido indolacético) y el ANA (ácido naftalenacético) son responsables de los incrementos en la metilación de la citosina que tiene lugar durante el cultivo *in vitro*. Los sectores en el ADN, donde ocurre la metilación se consideran puntos probables de mutación, ya que la desaminación de una 5-metil citosina resulta en un cambio de la base de citosina a timina. Las auxinas tienen mayor correlación con el porcentaje de 5-metil citosina. Las citocininas no tienen efecto en este sentido.

En papa el cambio en la composición de las fitohormonas durante el crecimiento del callo la iniciación de los vástagos, se relaciona con elevados niveles de variación genética. Estos datos sugieren que la fase de callo es un período sensible en el cual la manipulación hormonal afecta la estabilidad de las plantas regeneradas.

Otro factor a considerar es la deficiencia de oxígeno que se genera durante el curso del cultivo. El estrés por falta de oxígeno en las células de la superficie del callo es diferente al de aquellas células que se encuentran situadas profundamente en la masa del mismo. La anaerobiosis resultaría en la producción de etanol, el cual podría comportarse como un mutágeno. Un efecto similar lo tienen los metabolitos producidos por las propias células.

La edad del cultivo es otro factor que afecta el nivel de variación, ya que aumenta la proporción de variantes en cultivos envejecidos y también en plantas obtenidas a través de varios subcultivos. Esto se ha observado en ajo, maíz, avena, tabaco, triticale y pasto ray triploide. La variación puede minimizarse realizando subcultivos frecuentes de explantes no envejecidos. Sin embargo, otros trabajos indican que las variaciones se producen al azar en los diferentes subcultivos, no habiendo una relación lineal entre el número de subcultivos y la cantidad de



variación obtenida en plantas micropropagadas. La variación en este caso se ha detectado por marcadores mediante RAPD a lo largo de diez subcultivos.

La deficiencia o exceso de minerales también afecta la estabilidad genética *in vitro*. Las deficiencias o excesos de azufre, fósforo, nitrógeno, calcio y magnesio pueden resultar en cambios genómicos.

Es evidente que los mecanismos que operan en la inducción de variación son numerosos, diversos, y probablemente actúan simultáneamente, conduciendo a cambios en caracteres cuali y cuantitativos. Detectar y analizar las modificaciones genómicas generadas por cultivo *in vitro* reviste interés desde un punto de vista práctico, ya que las mismas pueden ser fuente de material para seleccionar caracteres de interés, y desde un punto de vista teórico, ya que permiten realizar estudios básicos acerca de la variación y el posible control de la misma. La ocurrencia de variación somaclonal puede detectarse con marcadores fenotípicos, bioquímicos y moleculares (Cardone *et al.*, 2004).

2.6.4. Variación somaclonal y su aplicación en el mejoramiento genético

Los cambios resultantes de la variación somaclonal son generalmente indeseables, pero la aparición ocasional de caracteres que representan una ventaja desde el punto de vista agronómico permite utilizar este fenómeno en programas de fitomejoramiento; es decir, la variación somaclonal proveería una fuente adicional de variabilidad genética, utilizable en programas convencionales de mejoramiento. Se ha utilizado en algunos casos para conferir caracteres deseables a cultivares de importancia económica, entre los que se incluyen la resistencia a enfermedades, la tolerancia a suelos ácidos y la salinidad (Cardone *et al.*, 2004).

Algunas de las ventajas que presenta la variación somaclonal pueden resumirse de la siguiente manera (Cardone *et al.*, 2004):

- ✓ Es relativamente poco costoso generarla.



✓ Constituye una forma rápida de generar variación genética, particularmente para cultivos con base genética estrecha y que son difíciles de mejorar a través de técnicas tradicionales.

✓ Es factible de aplicarse para mejorar especies de propagación sexual y vegetativa.

✓ Las tasas de mutación son relativamente altas si se comparan con las tasas de mutaciones espontáneas.

✓ El conocimiento de las condiciones que generan inestabilidad genética durante el cultivo *in vitro* permitiría utilizar el fenómeno como estrategia de mejoramiento o permitiría eludirlo en aquellos casos en que se requiera estabilidad genética, como en la micropropagación, la conservación de germoplasma y la transformación genética.

✓ El nivel de cambios indeseables es menor que cuando se utilizan mutágenos químicos o físicos, ya que con la variación somaclonal la mayoría de los cambios deletéreos producidos son eliminados en la etapa de regeneración.

Entre las desventajas cabe mencionar (Cardone *et al.*, 2004):

✓ En algunos casos, las variantes somaclonales tienen poca importancia práctica.

✓ Existe escasa regeneración de plantas en cultivos de largo plazo. Generalmente en estos casos existe pérdida de la capacidad morfogénica.

✓ La regeneración está limitada a genotipos específicos que pueden no ser de mucho interés para los mejoradores.

✓ Algunos somaclones son inestables (originados por variación epigenética).

✓ Algunos presentan alteraciones no deseables como aneuploidía, esterilidad, etc.

En general, los fitomejoradores buscan en los somaclones caracteres de importancia práctica. La estrategia es utilizar cultivares altamente adaptados



para modificar algunos caracteres, ya que resulta más sencillo mejorar selectivamente una variedad que crear una nueva (Cardone *et al.*, 2004).

2.7. Características de la selección *in vitro*

La selección *in vitro* implica aplicar un agente selectivo (patógeno, tratamiento químico o físico) directamente al explante cultivado, consiguiendo así la resistencia con la regeneración de plantas (Gunn y Day, 1986). Sin embargo, es factible realizar selección *in vitro* sin necesidad de regeneración, bajo la hipótesis de que las plantas de las que se han obtenido los explantes se comportarán de la misma forma en presencia del mismo agente. Si así fuera, esto es, si ocurriera alta correlación entre el comportamiento del explante *in vitro* y el comportamiento de la planta *in vivo*, se facilitaría enormemente la labor de selección por resistencia a todo tipo de estrés. En muchos casos la regeneración no ha sido posible o no se han conseguido materiales de interés práctico. También se han registrado casos de falta de correlación entre la resistencia del explante en el medio de cultivo y la resistencia de la planta regenerada (Cubero, 2003).

El método general de selección *in vitro* consiste en lo siguiente: cultivar explantes de distintos genotipos y observar el comportamiento de los callos frente al agente selectivo, en condiciones de laboratorio. Una vez seleccionados los genotipos resistentes se procede a la regeneración de las plantas, que son analizadas para rectificar la expresión de la resistencia a nivel de campo y luego se introducen en el programa de mejoramiento. Sin embargo, la selección puede llevarse a cabo mediante dos modalidades (Cardone *et al.*, 2004):

a) Selección directa en un solo paso, donde el agente de selección es utilizado en variadas concentraciones a la vez. Este método es simple y efectivo, ya que las células sensibles al agente morirían, permitiendo el crecimiento de las tolerantes. Sin embargo, elevados niveles de estrés serían deletéreos a nivel celular, eliminando materiales que tal vez, con un mayor nivel de diferenciación tisular hubiesen sido capaces de regenerar plantas tolerantes.



b) Selección en varios pasos, donde la concentración del agente selectivo es gradualmente incrementada a través de subcultivos sucesivos y frecuentes.

La selección de un método dependerá de un monitoreo preliminar que proporcione una indicación acerca de la reacción del tejido vegetal a las concentraciones letales y sub-letales del agente selectivo (Cardone *et al.*, 2004).

No obstante de los beneficios y logros obtenidos con la selección convencional a nivel de campo, la selección de los genotipos adecuados es más fácil con el cultivo de tejidos de vegetales *in vitro*. En el campo, la aplicación uniforme del estrés deseado es difícil y los recursos invertidos son mayores. Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, pueden ser una herramienta eficiente para el fitomejorador al lograr una selección en forma rápida de los genotipos deseados. Sin embargo, las bases fisiológicas a nivel celular y de la planta, a la tolerancia al estrés están pobremente entendidas y complicadas (Nabors, 1992).

Por medio del cultivo *in vitro* de células vegetales, se ha logrado investigar procesos celulares involucrados en las respuestas al estrés por déficit hídrico. Procesos por los cuales permiten incrementar la supervivencia y/o crecimiento de las células bajo tales condiciones (Hasegawa *et al.*, 1984).

En particular el uso del cultivo *in vitro* de células ofrece ventajas en los estudios de estrés hídrico, tales como (Hasegawa *et al.*, 1984):

- 1) permite estudiar las respuestas al estrés que operaron a nivel celular,
- 2) provee una oportunidad de controlar el ambiente físico-químico, lo cual es difícil en estudios con plantas completas,
- 3) las células cultivadas en medio líquido son moderadamente uniformes ontogénicamente y tienen alta capacidad de reproducción,



4) las células se exponen uniformemente a los cambios hídricos, y pueden exponerse en forma constante,

5) la medición del potencial hídrico y sus componentes se puede realizar fácilmente en una muestra celular,

6) la población celular cultivada muestra cambios fisiológicos y bioquímicos, en respuesta al estrés hídrico,

7) las líneas celulares varían en tolerancia al estrés y pueden aislarse para su comparación experimental.

Una de las principales ventajas del cultivo *in vitro* es la posibilidad de obtener líneas celulares que muestran varios grados de tolerancia al estrés hídrico. No obstante la mayor desventaja es que no se trabaja con plantas completas. Sin embargo, el uso de esta técnica permite estudiar las respuestas celulares al déficit hídrico y obtener información que se puede aplicar al entendimiento de las respuestas de plantas completas; así como conocer procesos que permiten incrementar la supervivencia y/o crecimiento de las células bajo tales condiciones (Hasegawa *et al.*, 1984),

Los métodos de evaluación y selección *in vitro* tienen varias ventajas importantes con respecto a los equivalentes *in vivo*: ellos usualmente se aplican en cualquier época del año, permiten mantener un control de las condiciones ambientales de prueba, evitan varios riesgos comunes en campo o en invernadero, y pueden reducir la cantidad de espacio ocupado por cada ensayo (Gunn y Day, 1986).

2.8. Aspectos moleculares de la tolerancia al estrés osmótico

2.8.1 Herramientas genéticas moleculares para el estudio de genes

La resistencia a la sequía es un fenómeno complejo y su definición esta basada en el rendimiento o sobrevivencia relativos de un genotipo, en comparación con otros



genotipos sujetos a la misma sequía (Nguyen, 2000; Zarco *et al.*, 2005). El progreso de la selección del rendimiento y su estabilidad bajo condiciones de humedad limitada ha sido frenado por la baja heredabilidad del mismo, particularmente en sequía, y por la interacción genotipo x ambiente. Como una alternativa a la selección directa del rendimiento bajo condiciones de sequía, se han considerado características morfo-fisiológicas correlacionadas genéticamente con el rendimiento además de su alta heredabilidad. Desafortunadamente solo un número reducido de características morfo-fisiológicas reúnen estos requisitos, por tal razón existen pocos casos exitosos reportados sobre el incremento del rendimiento bajo sequía aplicando selección indirecta (Tuberosa *et al.*, 2002).

Además, la mayoría de las características de importancia agronómica son complejas y están reguladas por varios genes, siendo el rendimiento el más poligénico y complejo. También la regulación de las respuestas de la planta al estrés es aún más compleja. A pesar de que se ha alcanzado un progreso significativo a través del mejoramiento convencional, se dice que el progreso es lento, consume tiempo y tiene bajo potencial para mayores avances (Ribaut *et al.*, 2002).

En suma, los métodos tradicionales usados para investigar el control genético de caracteres cuantitativos son insuficientes para obtener información sobre (Ribaut *et al.*, 2002):

- ✓ Las regiones del cromosoma que regulan la variación de cada característica
- ✓ Los efectos simultáneos de cada región del cromosoma sobre otras características y las bases genéticas (pleiotropía o ligamiento) de tales efectos
- ✓ La interpretación de posibles relaciones causa-efecto entre características.



No obstante, existen herramientas moleculares factibles de integrarse con el mejoramiento convencional y con la fisiología para acelerar el entendimiento básico de la tolerancia a la sequía en plantas y el desarrollo de mejores variedades (Nguyen, 2000). Bajo el entendido de que el mejoramiento para caracteres que muestran variación continua es arduo y el método a usar esta en función de la heredabilidad, es decir la porción de variación que se debe a los genes, la detección de QTLs (Quantitative Trait Loci) que controlan el carácter de interés y que estén asociados a marcadores fácilmente distinguibles, permitirán eludir el efecto ambiental aumentando la eficiencia de la selección (Nuez y Carrillo, 2000).

Los marcadores genéticos han hecho posible determinar regiones del genoma (QTL) que contribuyen en la variación de características de importancia agronómica (Dudley, 1993; Charcosset y Moreau, 2004), y también permiten escudriñar los efectos de un mismo QTL sobre otras características y sobre el rendimiento (Tuberosa *et al.*, 2002).

Un avance en la genética es el mapeo de QTLs relacionadas con el comportamiento y con el rendimiento en condiciones de sequía. En consecuencia, el enfoque genómico brinda la oportunidad para aislar y entender los QTLs que condicionan la adaptación al estrés. Dada la complejidad de la tolerancia a la sequía, en la mayoría de los cultivos la selección de QTLs por si misma es infructuosa (por su poca estabilidad a través de ambientes). De aquí surge la estrategia de especificar los QTL's de interés mediante marcadores (Nguyen, 2000; Ribaut *et al.*, 2000).

Un marcador genético es cualquier diferencia fenotípica entre poblaciones controlada genéticamente. Por tanto, es un locus marcador comúnmente polimórfico (variante) utilizado en el análisis genético que permite marcar el locus que controla la diferencia fenotípica o para marcar otro locus próximo que controla algún carácter de interés (Nuez y Carrillo, 2000).



Un marcador genético deseable debe mostrar una variación experimentalmente detectable entre los individuos de la población, de herencia mendeliana no epistática (sin interacción con otros genes), insensible a los efectos ambientales, codominante, de rápido análisis y de posible detección en las etapas tempranas de desarrollo de la planta (Picca *et al.*, 2004).

Existen varios tipos de marcadores genéticos: morfológicos, isoenzimas, proteínas y de ADN o moleculares (Picca *et al.*, 2004), los que a continuación se expresan:

Marcadores morfológicos. Son características fenotípicas de fácil identificación visual. Entre sus principales limitaciones se encuentran (Cubero, 2003; Picca *et al.*, 2004):

1. Número reducido de marcadores disponibles en cada población
2. Bajo nivel de polimorfismo
3. Algunos producen alteraciones fenotípicas que dificultan el desarrollo de la planta
4. Varios están bajo control poligénico
5. Algunos se expresan en la etapa adulta de la planta, lo cual prolonga el tiempo de evaluación en los programas de mejoramiento
6. Casi nunca muestran codominancia y con cierta frecuencia son pleiotrópicos, esto es, afectan a más de una función al mismo tiempo.

Las isoenzimas. Son las diferentes formas moleculares de una enzima, que poseen una actividad catalítica común, es decir actúa sobre el mismo sustrato. Su aplicación en la construcción de mapas genéticos se ha visto limitada por lo siguiente (Picca *et al.*, 2004):

7. El número de marcadores izoenzimáticos disponibles, en general es menor a cincuenta
8. Su reducido polimorfismo, de dos a cuatro alelos
9. Las formas enzimáticas extraídas de hoja o raíz presentan variaciones en relación a las condiciones ambientales de desarrollo y a la edad del tejido, lo cual afecta la repetición fiel de los zimogramas.



Marcadores proteicos. Corresponden a proteínas de reserva en las semillas. En los cereales las prolaminas y glutelinas están codificadas por varios genes, los cuales durante la evolución han presentado duplicaciones, translocaciones, inserción de transposones y otros arreglos cromosómicos. Estos cambios genéticos han generado un alto nivel de polimorfismo proteico entre especies, así como entre variedades dentro de la misma especie. La concentración de proteínas varía según la especie y con el manejo del cultivo en campo. El análisis genético de cruzamientos ha demostrado que la variación en el patrón de proteínas es debido a la existencia de variantes alélicas en cada locus. Como marcadores han servido para detectar correlación con variables de calidad industrial (Picca *et al.*, 2004).

Marcadores de ADN o marcadores moleculares. Están constituidos por fragmentos de ADN que permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia de bases entre individuos, modifiquen éstos o no su fenotipo. (Picca *et al.*, 2004). Las ventajas principales que tienen estos marcadores sobre los demás son (Cubero, 2003):

1. Es posible detectar variaciones con mínimas cantidades de material de muestra
2. No afectan al fenotipo, es decir son totalmente neutros
3. Pueden detectarse en cualquier etapa del desarrollo, incluyendo el mismo embrión
4. Se distribuyen en todo el genoma
5. La mayoría son codominantes
6. No muestran ni epistasis ni pleiotropía
7. El número de variaciones (polimorfismos) a que dan lugar es enorme

Entre las desventajas esta la necesidad de complejos equipos de laboratorio y el elevado costo financiero para los análisis son elevados.

La aplicación de marcadores moleculares en el fitomejoramiento se divide en varias categorías (Dudley, 1993; Ribaut *et al.*, 2002):



- Caracterización del germoplasma mediante sus huellas de ADN y para analizar la diversidad genética
- Para identificar líneas con propósitos legales
- Para facilitar la selección de progenitores
- Para controlar la pureza genética en la industria de semillas,
- Identificación y caracterización de regiones genómicas (QTLs) involucradas en la expresión de la características de interés
- Mejoramiento de cultivos a través de la selección asistida por marcadores (MAS).

Por consiguiente, la eficiencia del mejoramiento tradicional puede mejorarse con la identificación de QTLs que tienen mayores efectos en el incremento de la tolerancia al estrés mediante marcadores moleculares (Cushman, 2003).

Análisis de loci de características cuantitativas (QTLs)

Un estudio de QTLs incluye una evaluación fenotípica precisa de una población mapeada adecuadamente, su perfil molecular y un análisis estadístico para probar la asociación entre un fenotipo y un marcador. Una adecuada cobertura del genoma se alcanza con 100 a 150 loci marcadores espaciados a lo largo de los cromosomas (Tuberosa *et al.*, 2002).

La caracterización de QTLs ha sido posible al usar marcadores moleculares como RFLPs (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción), SSRs (Secuencias Simples Repetidas), AFLPs (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados) y ESTs (Secuencias Expresadas de ADNc) (Tuberosa *et al.*, 2002). Los marcadores SSR son los preferidos por razones de costo y simplicidad en comparación con los RFLPs. Además, son seguros, codominantes, abundantes y uniformemente distribuidos en los genomas vegetales (Ribaut *et al.*, 2002). El progreso reciente alcanzado en la robótica y en la miniaturización ha permitido la aplicación de nuevos marcadores (por ejemplo el Polimorfismo en un



Simple Nucleótido [SNP]) con mayor resolución haciendo posible la identificación de alelos favorables (Tuberosa *et al.*, 2002).

Una vez identificados los QTLs, los mejoradores pueden usar los marcadores moleculares como criterios de selección en vez de las complejas características fisiológicas y morfológicas, tales como el ajuste osmótico o estructura de la raíz. En el caso del maíz, se han identificado QTLs correspondientes a características relacionadas con la tolerancia a la sequía, tales como: acumulación de ABA, conductancia estomática, potencial hídrico; número, longitud y diámetro de raíces, y para la diacronía floral (ASI) (Cushman, 2003), alargamiento foliar (Tuberosa y Salvi, 2006).

A pesar de la utilidad potencial del análisis de QTLs aún tiene varias desventajas (Cushman, 2003):

1. Los QTLs identificados en una etapa de desarrollo pueden diferir de aquellos identificados en otras etapas
2. La probabilidad de éxito y precisión de mapeo de un QTL mejora al tener una población tan grande como sea posible, pero la necesidad de una gran población algunas veces restringe la sofisticación de las técnicas analíticas
3. Los QTLs de ciertas características identificados bajo condiciones controladas en invernadero, pueden dar diferentes resultados cuando las poblaciones se conducen en condiciones de campo
4. Relativamente se han identificado pocos QTLs para tolerancia a estrés ambiental, a pesar que en la realidad existen muchos genes involucrados en la tolerancia y
5. La baja resolución del mapeo en muchos casos limita la localización precisa de genes.



Selección asistida por marcadores de ADN (MAS)

La selección asistida por marcadores (MAS) depende de la generación de un mapa de ligamiento altamente saturado. Los pasos para esta selección consisten de: i) identificar la asociación entre el marcador y el QTL, ii) usar esta asociación para desarrollar líneas o poblaciones mejoradas. Existen varios métodos para identificar las asociaciones entre los marcadores y el QTL (Dudley, 1993).

Actualmente existen dos enfoques para el análisis de un QTL: la clonación posicional y el mapeo por asociación. En el primero se requiere de una población grande de líneas casi isogénicas donde un solo QTL de interés esta segregando. En este caso la progenie (más de mil individuos) presenta los eventos de la recombinación y los marcadores moleculares cercanos a la región del cromosoma de interés permiten identificar el intervalo genético que esta segregando junto con el QTL. El segundo enfoque esta basado en el desequilibrio de ligamiento, que permite establecer una asociación estadística entre la variación alélica de un locus y el valor fenotípico de una característica (Tuberosa y Salvi, 2006).

La MAS, cuando solo un reducido número de QTLs esta involucrado, es similar a la selección de características cualitativas. En este caso el uso de retrocruzas es apropiado para incorporar características controladas por algunos loci. En contraste, si la característica de interés esta controlada por un mayor número de QTL, la probabilidad de identificar un marcador ligado a todos ellos es baja. En este caso para obtener resultados favorables la recombinación entre los marcadores y el QTL necesita aproximarse a cero como sea posible (Dudley, 1993).

Desde el punto de vista económico los costos para la construcción de un mapa de ligamiento (98 mil USD) limitan la aplicación de la selección asistida por marcadores para una característica poligénica. Nuevas estrategias se tienen que evaluar, tales como la construcción de un mapa que combine la información



relacionada con los QTL y la expresión génica, además de la identificación a través de la Genómica Funcional de un conjunto de genes y rutas metabólicas involucradas en la respuesta del maíz a la sequía (Ribaut *et al.*, 2002).

Pocas aplicaciones exitosas sobre la MAS han sido descritas para el mejoramiento de características cuantitativas, debido principalmente a una débil asociación (en términos de distancia genética) entre marcadores y los QTLs y/o los altos costos financieros. Finalmente la mayor limitación para el análisis de QTLs es que éste no es ni barato ni rápido. El tiempo que transcurre desde la cruce inicial para derivar una población de mapeo hasta la identificación de los QTLs es de al menos tres años; este periodo puede extenderse hasta seis u ocho años cuando se requieren líneas altamente homocigóticas (Tuberosa *et al.*, 2002).

Sin embargo, la identificación de genes candidato por medio de QTL y el descubrimiento de su papel funcional se puede facilitar al combinar los mapas de QTLs con los mapas funcionales, con lo cual se avanzaría relativamente rápido en un programa de selección asistida por marcadores (Tuberosa y Salvi, 2006).

2.8.2 Herramientas genómicas para el estudio de genes

Existen repuestas fisiológicas, celulares y moleculares ante el estrés por sequía. Las respuestas celulares y moleculares incluyen la percepción de la señal osmótica, transducción de la señal hacia el citoplasma y después hacia el núcleo, la respectiva expresión de genes y finalmente las respuestas involucradas en la tolerancia al estrés (Shinozaki, 2003).

Cada célula esta separada del ambiente rodeante por una membrana plasmática. Esta membrana es permeable para solo algunas moléculas pequeñas de lípidos, pero es impermeable a materiales hidrosolubles como iones, proteínas y otras macromoléculas. Las respuestas de la célula se inician primariamente por la interacción del material extracelular con una proteína de la membrana. La



molécula extracelular se conoce como ligando o elicitador y la proteína de la membrana plasmática donde se une e interactúa con el elicitador se denomina receptor (Mahajan y Tuteja, 2005).

Los receptores semejantes a cinasas se encuentran en animales y plantas. Estructuralmente consisten de un dominio extracelular, un dominio transmembranal, y un dominio intracelular cinasa (Rodríguez *et al.*, 2005). El estrés se percibe por los receptores presentes en la membrana de las células, luego la señal es transducida, resultando la generación de mensajeros secundarios. Estos mensajeros, tales como fosfatos de inositol, regulan el nivel de calcio intracelular. La perturbación en el nivel de calcio es percibida por proteínas denominadas sensores de calcio. Estas proteínas inician una cascada de fosforilación e induce a los genes sensibles al estrés o a factores de transcripción que regulan a estos genes. Los cambios en la expresión génica inducidos por el estrés contribuyen en la generación de hormonas como ABA, ácido salicílico y etileno. Estas moléculas amplifican la señal inicial e inician una segunda ronda de señales que pueden seguir la misma ruta u otras. Algunas moléculas accesorias participan en la modificación o ensamble de componentes de señalización, tales como las enzimas para la miristoilación, glucosilación y ubiquitinación (Mahajan y Tuteja, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005).

Con base en el tipo de señales, Rodríguez *et al.* (2005) reconocen tres rutas de transducción de éstas: 1) rutas de señales por estrés osmótico-oxidativo, que implica la participación de cinasas MAP, la generación de enzimas y compuestos antioxidantes así como de osmolitos; 2) señales dependientes del calcio que conduce a la activación de genes (tipos DRE/CRT) que codifican para proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (proteínas LEA); y 3) señales dependientes de calcio por estrés salino, que regula la homeostasis de iones (Figura 5).



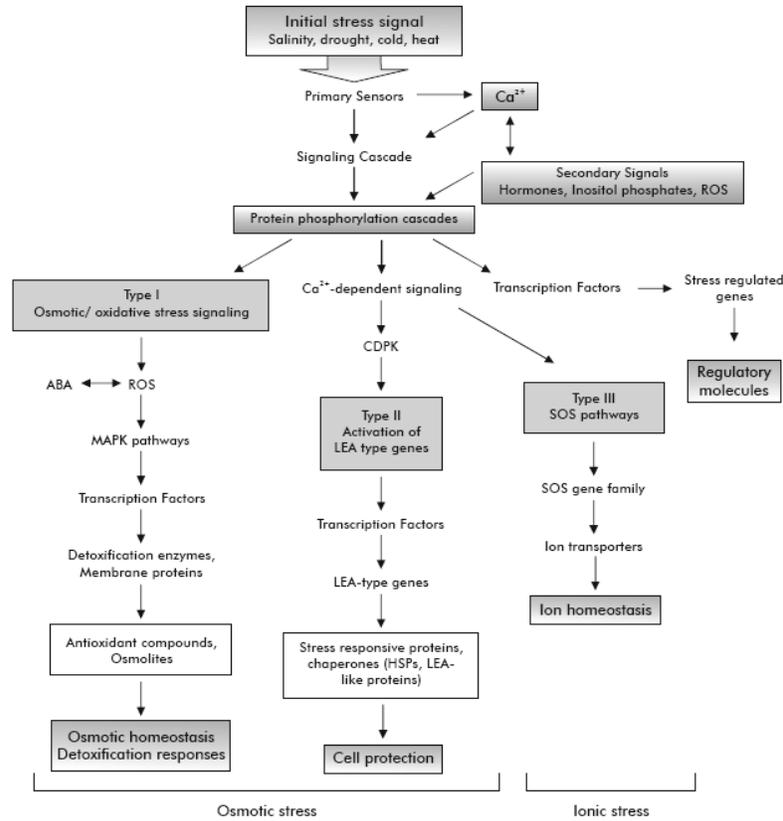


Figura 5. Esquema de rutas de transducción de señales producidas por el estrés osmótico e iónico en las plantas. Fuente: Rodríguez *et al.*, (2005).

Por otra parte, en función de la participación del ácido abscísico (ABA), existen al menos cuatro rutas de transducción de señales desde la percepción de la señal hasta la expresión de los genes: dos son dependientes del ABA (rutas I y II) y otras dos son independientes del ABA (rutas III y IV) (Figura 6) (Shinozaki y Yamaguchi, 1997; Shinozaki, 2003).



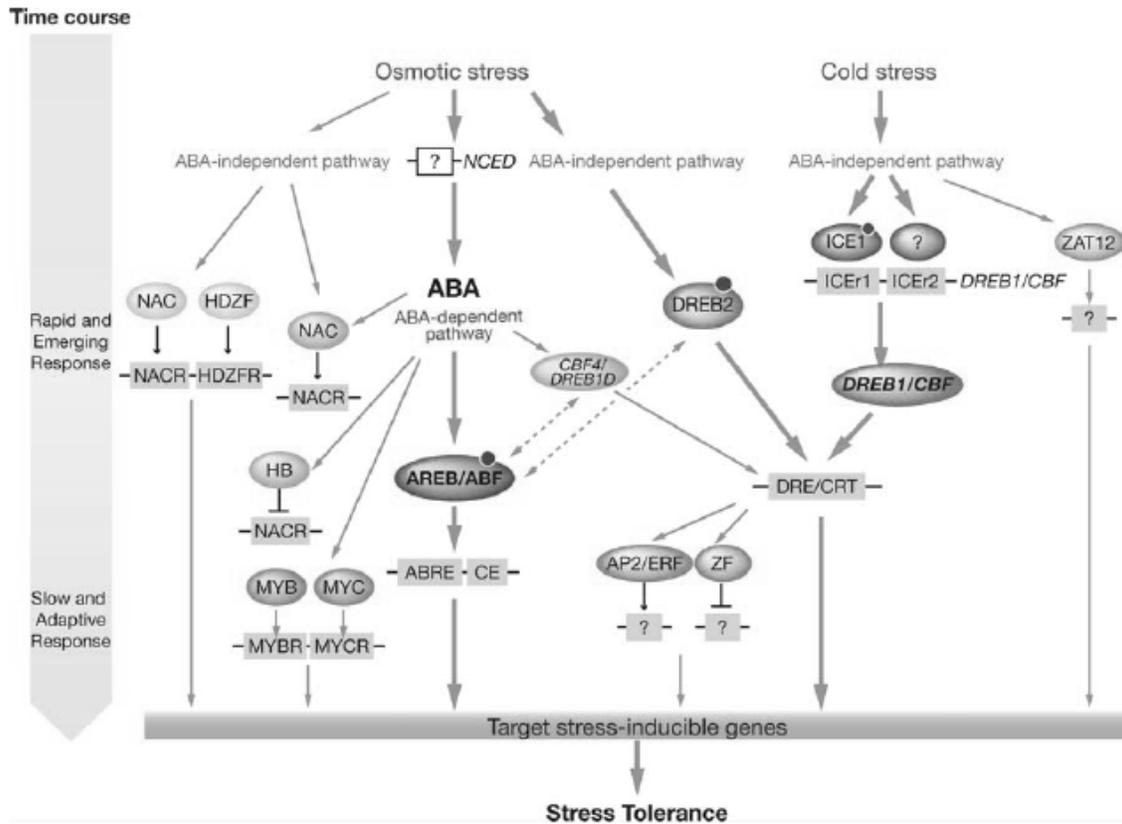


Figura 6. Redes de regulación transcripcional de los elementos cis y de factores de transcripción involucrados en la expresión de genes como respuesta al estrés osmótico y al frío en Arabidopsis. Las elipses indican factores de transcripción, los cuadros indican elementos cis. Los círculos pequeños indican la modificación de los factores de la transcripción para su activación (fosforilación). Las líneas punteadas indican la interacción entre proteínas. Fuente: Shinozaki y Shinozaki (2006).

En la ruta I es necesaria la participación de factores proteicos para la expresión de los genes inducidos por ABA; es decir, estos genes inducidos necesitan de factores de transcripción tipo MYB y MYC. En la ruta II los genes inducidos contienen elementos sensibles al ABA en su región promotora (elementos ABRE). Los elementos ABRE fueron identificados en trigo y en arroz, los cuales codifican para proteínas tipo bZIP que son factores de transcripción. En la ruta III los genes inducidos por sequía codifican algunas proteasas. Finalmente, la ruta IV



incluye elementos sensibles a la deshidratación (elementos DRE) y elementos con repeticiones (elementos CRT), los cuales son esenciales para la inducción de genes (Shinozaki, 2003).

El estudio de los perfiles de expresión de genes ha sido una herramienta para entender como los organismos responden a los cambios en el ambiente. Las plantas tienen la capacidad de regular su expresión de genes en respuesta a cambios en la temperatura, disponibilidad de agua, o por la presencia de iones deletereos (Rodríguez *et al.*, 2005).

Con la finalidad de estudiar los cambios en la expresión génica e identificar los genes involucrados en la respuesta de las plántulas de chícharo bajo estrés hídrico, se aplicó la técnica denominada Proyección Diferencial de una Biblioteca de ADNc. Las plántulas de chícharo se sometieron 24 h a tratamientos de estrés con PEG-4000 (60 mM), con NaCl (10 %) y con ABA (10 μ M). Se obtuvieron 47 clones los cuales fueron secuenciados y se dedujeron las proteínas correspondientes mediante homología. Se formaron 17 grupos de clones, siete de estos se sobre expresaron por influencia del PEG y los restantes manifestaron una reducida expresión. La mayoría de los clones expresados correspondieron a proteínas de transferencia de lípidos (LTP), con bastante homología a las de frijol (63 %). Un segundo grupo de clones fueron homólogos a las proteínas abundantes de la embriogénesis (LEA). El déficit hídrico inducido por sal y por PEG incrementaron los niveles de ARNm de los genes LTP, en cambio, el ABA no tuvo efecto sobre la transcripción (Romo *et al.*, 2001).

Otra técnica aplicada para el estudio de la expresión de genes es el Despliegue Diferencial-PCR, ya que es simple, sensible y poderosa para caracterizar el ADNc expresado en diferentes órganos de la planta. En el caso de girasol, con esta técnica se detectaron cinco clones expresados diferencialmente en respuesta a la sequía, mismos que presentaron homología con las siguientes proteínas: guanilato



kinasa, proteína ribosomal y transposasa. En total los 13 ADNc expresados se organizaron en tres grupos en base a sus patrones de expresión. El primer grupo comprendió genes cuya expresión (positiva o negativa) ocurrió en la raíz y el vástago de la planta en respuesta al estrés por sequía y por salinidad; el segundo grupo abarco aquellos genes expresados únicamente en cierto órgano y regulados solo por la sequía y no por salinidad. El tercer grupo consistió en un gen que se expreso dependiendo del órgano y del tipo de estrés. Los resultados indican que las plantas responden al estrés por sequía o por salinidad mediante diferentes rutas metabólicas (Liu y Baird, 2003).

También se ha analizado la expresión de genes de *Prunus amygdalus* mediante la técnica del polimorfismo de fragmentos de restricción amplificados derivados de ADNc, la cual permite identificar transcritos acumulados en embriones y en plántulas cultivados *in vitro* sujetos a deshidratación y al tratamiento con ABA. Cinco de los clones identificados tuvieron alta similitud con secuencias de proteínas como: transportador histidina, proteína del choque de calor clase II-lmw, acil-glicerol-fosfato transferasa, extensina y proteinasa-cisteina (Campalans *et al.*, 2001). Considerando esta misma técnica Yang *et al.* (2003) identificó fragmentos expresados en raíces seminales de arroz expuesto a 72 h de déficit hídrico. Se identificó un total de 141 fragmentos acumulados diferencialmente, de los cuales 122 tuvieron una longitud entre 100 a 600 pares de bases. 60 fragmentos tuvieron funciones agrupadas en cinco categorías: el transporte (12.3 %), metabolismo y energía (12.3 %), proteínas relacionadas con estrés y con defensa (9.4 %), organización celular y síntesis de pared (8.5 %), transducción de señales (6.6 %), reguladores de la expresión (5.7 %), transposones (2.8 %), y aquellos con función desconocida (42.5 %).

El análisis del transcriptoma usando la tecnología de microarreglos ha permitido descubrir los genes inducidos por el estrés abiótico (Shinozaki y Shinozaki, 2006). En *Arabidopsis* se han identificado 44 genes inducibles por sequía, usando



microarreglos de ADNc (Seki *et al.*, 2001). En ésta misma especie se agruparon 130 genes inducidos por el estrés, de acuerdo a sus funciones: metabolismo, energía, transcripción, crecimiento, división y síntesis de ADN, transporte celular, transducción de señales, defensa celular, homeostasis, organización celular, y otras funciones son desconocidas (Bray, 2002). También en *Arabidopsis*, se ha observado la transcripción de un grupo de 245, 54, 299 y 213 genes en respuesta al ABA, sequía, frío, y salinidad, respectivamente (Seki *et al.*, 2002).

En forma similar, para distinguir los efectos del estrés osmótico y el estrés iónico sobre la expresión génica, en hojas y raíces de cebada, se usó la tecnología de Microarreglos de ADNc. Para esto se utilizó el cultivo hidropónico de plántulas en solución de Hoagland conteniendo PEG-6000 (20 %) ó Cloruro de sodio (NaCl). Los microarreglos se prepararon usando 460 genes sensibles a la sal, obtenidos previamente con la técnica de despliegue diferencial (Differential Display). De los genes con mayor expresión 18 de ellos se regularon tanto con PEG como con el NaCl, cuatro fueron exclusivamente regulados por el estrés osmótico (PEG) y 44 fueron exclusivos para el estrés por la sal. En contraste, 16 genes fueron inhibidos por el estrés osmótico y por el NaCl, 14 se inhibieron únicamente con el osmótico y otros 14 con el NaCl. Tales diferencias en el perfil de transcripción reflejan la capacidad de adaptación de las rutas bioquímicas bajo condiciones de estrés osmótico-iónico (Ueda *et al.*, 2004)

Con la evaluación de poblaciones que presentan mejor comportamiento durante el estrés ambiental y el uso de herramientas genómicas, se espera detectar importantes redes genéticas involucradas en la tolerancia a la sequía. Se ha aplicado la técnica de microarreglos de ADNc para descubrir genes del maíz expresados en el jilote y que cambian debido al estrés hídrico durante la floración. Los segmentos de ADNc incluidos en los microarreglos correspondieron al ciclo celular, metabolismo de los carbohidratos y genes sensibles al ácido abscísico (Bruce *et al.*, 2002). En sorgo, con la misma técnica genética se encontró que el



estrés osmótico inducido por PEG (20 %) durante 27 h, promovió la expresión de 1300 genes, de los más conocidos fueron: deshidrina, proteínas abundantes en la embriogénesis tardía, glicina y prolina (Lim, 2006).

Es evidente que ya se han identificado varios genes y sistemas involucrados en la expresión de características morfológicas y parámetros fisiológicos involucrados en la tolerancia al estrés hídrico. Los genes ya conocidos juegan un papel importante en la biosíntesis de varios osmoprotectores, en la modificación de la membrana celular y algunas veces codifican enzimas que destoxifican células vegetales. Varios genes, tales como el *rd29A*, son inducidos por el sistema independiente del ABA. Este gene responde a la deshidratación y el frío similarmente. La expresión del gene *DREB1A*, bajo promotores constitutivos tales como CaMV35S, conduce a una fuerte tolerancia a estreses abióticos; sin embargo, también induce el atraso del crecimiento bajo condiciones de campo (Xiong *et al.*, 2001, y Xiong *et al.*, 2002).

En trigo, se han efectuado experimentos de transformación usando el plásmido pACH25 conteniendo el gen de reportero *gusA* y el marcador *bar*, bajo el control del promotor ubiquitina del maíz. Resultados preliminares sugieren que los genes *rd26* y *DREB1A* tienen un efecto general en la tolerancia a las condiciones de limitación hídrica. Si esta tolerancia es atribuible a la reducida evapotranspiración de las plantas transgénicas o a la regulación diferencial del estado hídrico de la célula (ajuste osmótico), entonces son necesarios mas evaluaciones fisiológicas en ambos, el testigo y las transgénicas (Pellegrineschi *et al.*, 2002).

En este sentido, el gene de la enzima aldosa reductasa (ALR) fue aislado de alfalfa y se introdujo a células en suspensión de trigo. Los callos, después de confirmarse portadores del gene, se sometieron a estrés osmótico con PEG-6000. Puesto que el sorbitol es el producto del gen, algunas líneas soportaron el estrés.



Esto permitió establecer nuevas investigaciones de tipo bioquímico y fisiológico (Pauk *et al.*, 2002).

Por otra parte, al incluir PEG en el medio de cultivo para la maduración de embriones somáticos de *Picea glauca*, se detectó que varios genes involucrados en la formación del embrión incrementarían su expresión. También se determinaron cambios en los niveles de transcripción de genes involucrados en el catabolismo de la sacarosa y asimilación de nitrógeno (Stasolla *et al.*, 2003). Esto muestra que la expresión génica se modifica por el factor ambiental estresor *in vitro*.

2.8.3. Proteínas relacionadas con la tolerancia a sequía

La falta de agua afecta la membrana alterando la estructura normal en bicapa, y se convierte en porosa cuando esta deshidratada. El estrés también altera a las proteínas de la membrana contribuyendo a la pérdida de su integridad, selectividad y actividad. Adicionalmente al daño en la membrana, las proteínas del citosol y de los organelos presentan baja actividad o pueden desnaturalizarse completamente cuando están deshidratadas. La elevada concentración de electrolitos celulares debido a la deshidratación del protoplasma también altera el metabolismo celular. Virtualmente cualquier aspecto de la fisiología de las plantas y del metabolismo celular es afectado por el estrés bajo sequía (Mahajan y Tuteja, 2005).

Se ha reportado que la tolerancia al estrés hídrico a nivel celular está dada principalmente por un grupo de proteínas las cuales tienen diferentes funciones (Pellegrineschi *et al.*, 2002). Varios genes que responden al estrés por sequía y las funciones de sus productos se han predicho en base a la homología de las secuencias con proteínas conocidas. Los productos génicos se han clasificado en dos grupos: el primer grupo incluye proteínas que probablemente funcionan en la tolerancia al estrés, tales como chaperonas, proteínas abundantes en la embriogénesis (LEA), osmotina, proteínas anticongelantes, proteínas que se



ensamblan al RNAm, enzimas para la biosíntesis de osmolitos, proteínas que conforman canales de agua, transportadores de carbohidratos y de prolina, enzimas desintoxicantes, proteasas. Las proteínas LEA, chaperonas, y las que se ensamblan al RNAm protegen a macromoléculas como enzimas, lípidos, y RNAm de la deshidratación. Prolina, glicina-betaina y carbohidratos funcionan como osmolitos y protegen a las células contra la deshidratación. Las proteínas que conforman canales y transportadores permiten el movimiento a través de la membrana plasmática para ajustar la presión osmótica bajo condiciones de estrés. Las enzimas desintoxicantes están involucradas en la protección de células contra el oxígeno activo. Las proteasas y nucleasas permiten reciclar aminoácidos y nucleótidos (Shinozaki y Yamaguchi, 1997; Shinozaki, 2003; Shinozaki y Shinozaki, 2006).

El segundo grupo, contiene factores proteicos involucrados en la regulación de la trasducción de señales y de la expresión génica que ocurre en respuesta al estrés tales como: proteínas tipo cinasas, factores de transcripción y enzimas participantes en el metabolismo de los fosfolípidos. Las cinasas y fosfatasas modifican proteínas funcionales y proteínas reguladoras implicadas en las rutas de trasducción de señales. Los fosfolípidos como inositol-1,4,5-trifosfato, diacilglicerol y ácido fosfatídico participan en el proceso de señales (Shinozaki y Yamaguchi, 1997; Shinozaki, 2003). Los factores de transcripción identificados son: proteínas marcadas con zinc, proteína cinasa SOS2; factor de transcripción bHLH, DREB1A, DREB2A; el dominio AP2/ERF de proteínas RAP2, y proteína similar al factor de crecimiento (Shinozaki y Shinozaki, 2006).

En condiciones de estrés por déficit hídrico, las plántulas de maíz manifiestan un patrón particular de expresión de proteínas. Se han identificado 78 proteínas, de las cuales 40 se sobre expresaron, diez se manifestaron exclusivamente en las plántulas estresadas y 23 tuvieron menor expresión con respecto a las plántulas con riego. Algunas de ellas son enzimas involucradas en rutas metabólicas como



la glucólisis y el ciclo de Krebs (Riccardi *et al.*, 1998). En un trabajo similar con genotipos mexicanos de maíz, como Michoacán 21 y compuesto 1-104, resultó que la expresión de proteínas se alteró con el déficit hídrico impuesto. Siete proteínas se expresaron con mayor intensidad en la raíz, ocho proteínas procedentes del tallo se manifestaron con mayor intensidad, mientras que ninguna se expresó en la hoja en tales condiciones. El peso molecular de tales proteínas varió de 20.3 a 167 kD (Espinosa *et al.*, 2001).

En otro estudio se analizó el proteoma de plántulas de maíz bajo la influencia del estrés por NaCl. Usando electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones se detectaron 510 proteínas en la raíz y 488 en vástago con el tratamiento de 100 mM de sal durante nueve días. En base a su nivel de expresión estas proteínas se agruparon en las siguientes categorías: a) proteínas involucradas en la biosíntesis y modificación de otras proteínas, b) enzimas del metabolismo del carbono y c) enzimas del metabolismo del nitrógeno. Del total sólo 14 proteínas inducidas por el estrés son ampliamente conocidas: ADN polimerasa (PM de 30.4 kDa), proteína ribosomal S4 (23.2), proteína similar al citocromo P450 (20.9), serina-treonina cinasa (46.8), adenosina cinasa (36.1), rubisco de cadena larga (52.7), rubisco de cadena corta (19.6), fructuosa-1,6-bifosfato aldolasa (41.9), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (54.2), beta-glucosidasa (58.4), unidad alfa de la V-ATPasa (55.7), metionina sintetasa (17.0), S-adenosil-metionina sintetasa (42.8), y glutamato-amonio ligasa (41.8). Con la amplia gama de proteínas separadas se llegó a concluir que la resistencia de la planta a la sal es una característica multigénica y que no existe un mecanismo de adaptación al estrés por sales en maíz (Zorb *et al.*, 2004). Existen estudios en maíz (variedad Zacatecas-58) (Morales *et al.*, 1999) que indican que la rubisco (PM de 55 kDa) manifestó mayor actividad en la lámina foliar, durante el periodo de llenado de grano, después de 23 ciclos de selección masal visual estratificada realizada bajo condiciones de sequía.



En otras especies, como *Eleusine coracana* y *Populus euphratica*, se ha utilizado el PEG como agente estresante en el estudio de la expresión de proteínas, encontrando que ocurre mayor expresión proteica cuando el estrés osmótico incide en los tejidos de las plantas (Uma *et al.*, 1995; Gu *et al.*, 2004). En contraste a nivel bioquímico se ha demostrado que la actividad enzimática para la síntesis de péptidos se ve favorecida en presencia de PEG-4000 en el medio orgánico de reacción (Hirano *et al.*, 1991).



III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en los Laboratorios de Biotecnología Agrícola y de Bioquímica del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo, Estado de México.

3.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de cuatro líneas endogámicas experimentales de maíz, LE-13, LE-16, LE-14 y LE-46, generadas en el proyecto “Formación de arquetipos de maíz” del Dr. Víctor A. González Hernández del Programa de Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad.

3.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el descrito por Murashige y Skoog (1962) (MS), (Cuadro 1 A) adicionado con sacarosa (30 g L^{-1}) y modificado de acuerdo con los tratamientos descritos en cada fase experimental. El pH se ajustó a 5.8 ± 0.1 con NaOH o HCl 1N, mediante un potenciómetro ORION modelo 420A[®]. Cuando se requirió medio sólido, se usó agar Sigma[®] a 0.6 % (p/v), el cual se disolvió en un horno de microondas TOSHIBA[®]. Se sirvieron 10 mL de medio con un dispensador Jencons-PLS[®] en tubos de ensaye de 27 cm de largo por 2 cm de diámetro. Posteriormente se esterilizaron en una autoclave vertical AESA modelo 300[®] a una temperatura de 121° C y presión de 1.5 kg cm² durante 20 min.

3.3 Condiciones ambientales de incubación

Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en un cuarto de incubación con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, proporcionada por lámparas de luz blanca fría fluorescente de 75 W, que producen una radiación fotosintéticamente activa de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con una temperatura promedio de $26 \text{ °C} \pm 2$ y humedad relativa de 30 %. Estas condiciones permanecieron fijas en todas las etapas del estudio.



3.4 ETAPA I. Organogénesis *in vitro*

3.4.1 Establecimiento del cultivo aséptico y germinación de semillas

El cultivo aséptico *in vitro* de maíz se estableció con base en los protocolos descritos por Mejía (2001) e Iracheta (2002), con las siguientes modificaciones:

✓ Una vez lavadas las semillas con detergente en polvo Roma[®] con 30 mL y desinfectadas con una mezcla de fungicida conformada por Benlate[®] (4 g L⁻¹) más Captan[®] (4 g L⁻¹), se colocaron durante 20 h en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) Merck[®] al 1 % (v/v), en vez de 14 y 16 h, para iniciar la imbibición.

✓ Se hizo una segunda desinfección bajo condiciones asépticas en la campana de flujo laminar, que consistió en: 1) Desinfección de las semillas con Benlate[®] al 0.4 %; 2) Enjuague cinco veces con agua estéril; 3) Adición de hipoclorito de sodio al 1.8% (Cloralex[®]) más bactericida comercial Microdyn[®] (plata coloidal estable al 0.35 %) al 1.5 % durante 10 min; y 4) Enjuague diez veces con agua destilada (H₂O d) estéril.

3.4.1.1 Desinfección de la semilla

Se seleccionaron semillas sanas, uniformes en tamaño y sin daño mecánico. Se colocaron en un frasco de 250 mL que contenía 30 mL de una solución acuosa con detergente en polvo Roma[®] durante 5 min; posteriormente, se enjuagaron cinco veces con agua corriente hasta retirar los residuos de jabón y una vez más se enjuagaron con agua destilada estéril; en seguida las semillas se colocaron en una solución fungicida conformada por Benlate[®] (4 g L⁻¹) más Captan[®] (4 g L⁻¹) durante 20 min, y luego se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril para eliminar el fungicida. Después las semillas se colocaron en una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) Merck[®] a 1% (v/v) durante 20 h, y finalmente se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril.



Una segunda desinfección se hizo en condiciones asépticas, en la campana de flujo laminar horizontal VECO®; para ello se colocaron las semillas en una solución de Benlate® (4 g L⁻¹) durante 30 min y se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. Posteriormente las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio a 1.8 % Cloralex® (30 % v/v) y bactericida Microdyn® (1.5 % v/v), durante 10 min. Se enjuagaron diez veces con agua destilada estéril. Se retiraron las semillas con pinzas y se colocaron sobre papel secante (Toallas Sanitas interdobladadas®) estéril para eliminar el agua.

3.4.1.2 Siembra y germinación

Las semillas esterilizadas se sembraron en tubos de ensaye de 27 cm de largo por 2 cm de diámetro que contenían 10 mL de medio de cultivo citado en el inciso 3.2. Las semillas se sumergieron con la radícula del eje embrionario hacia abajo (Figura 7). Las condiciones de incubación fueron las antes mencionadas (inciso 3.3) para germinar semillas.



Figura 7. Posición de siembra de la semilla de maíz dentro del tubo de ensaye para su germinación *in vitro*.



3.4.1.3 Variables cuantificadas

En tres experimentos consecutivos con cuatro genotipos (LE-13, LE-16, LE-14 y LE-46), a los 12 días (d) después de la siembra, se registró: a) Longitud de coleóptilo (LC, cm), medido desde el nudo coleoptilar hasta el ápice del coleóptilo; b) Altura de plántula (AP, cm) medida desde la base del coleóptilo hasta el ápice de la hoja más larga; c) Número de hojas presentes (liguladas y no liguladas) por plántula (NH); con repeticiones desde 45 hasta 135 al combinarse los datos de los tres experimentos; d) Germinación (GE, %); e) Semillas sin germinar (NG, %); f) Plántulas anormales (AN, %); y g) Contaminación por hongos y bacterias (CO, %).

Los valores porcentuales se transformaron a valores angulares (arco seno \sqrt{x}), para su análisis estadístico. El número de repeticiones fue igual al número de tres experimentos combinados, en los que los tratamientos fueron las cuatro líneas (LE-13, LE-16, LE-14 y LE-46), distribuidas en diseño completamente al azar con tres repeticiones. En todas las variables se aplicó análisis de varianza con el procedimiento GLM del programa estadístico SAS[®] Versión 8.0; la separación de medias se hizo con la prueba de Tukey. En ambos análisis se estableció un nivel de significancia de 5%.

3.4.2 Inducción de brotes

3.4.2.1 Evaluación del efecto del pH del medio de cultivo y de la posición de los explantes en el coleóptilo sobre la actividad organogénica

Se hicieron dos experimentos (primero y segundo) con las plántulas con 12 d de germinación, de los genotipos LE-13, LE-16 y LE-14. El segmento del tallo envuelto por el coleóptilo se disecó en campana de flujo laminar, y de cada tallo se tomaron en forma acrópeta, a partir del nudo coleoptilar (Figuras 8 y 9), cinco discos (explantes, según King y Shimamoto, 1983), de aproximadamente 2 mm de grosor. Los discos se sembraron en medio estéril con un soporte de papel filtro, en



un frasco de vidrio de 45 mL de capacidad conteniendo 10 mL de medio líquido constituido por el medio básico MS (1962), al cual se le adicionó 6-bencilaminopurina (BAP) (1.5 mg L^{-1}) y ácido indolacético (AIA) (1.0 mg L^{-1}). En una mitad del total de frascos el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8, en la otra mitad a 6.3, mediante adición de NaOH 1 N y HCl 1 N, es decir, se probaron dos niveles de pH.

Resultaron 6 tratamientos que se distribuyeron en arreglo factorial 3x2 en un diseño completamente al azar, considerando como factores a los genotipos y al nivel de pH (Cuadro 2). Cada frasco con cinco discos se consideró como unidad experimental y el número de repeticiones por tratamiento varió de 14 a 24, ya que se combinaron los datos de los dos experimentos. En un tercero y cuarto experimentos se comparó el efecto del genotipo y de la posición del explante, bajo un arreglo factorial 3x4, ya que se evaluaron los mismos genotipos y los cuatro explantes disecados acrópetamente en el coleóptilo.

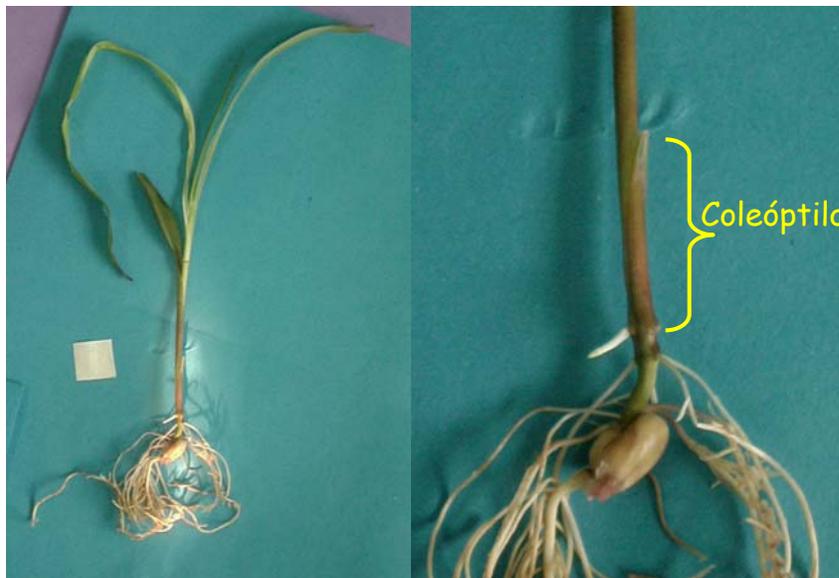


Figura 8. Plántula de maíz obtenida *in vitro* (izquierda) y segmento de tallo envuelto por el coleóptilo (derecha). El cuadro en blanco representa 1 cm^2 .

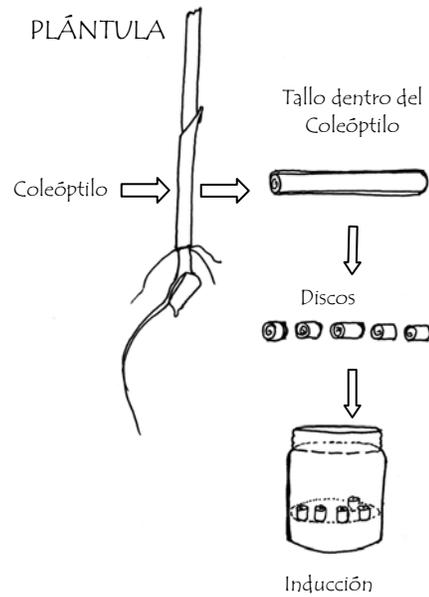


Figura 9. Esquema de la disecación de explantes disco de tallo de maíz para la inducción de brotes.

Cuadro 2. Relación de genotipos y niveles de pH evaluados en la inducción de brotes a partir de secciones de tallo.

Tratamiento (Núm.)	Genotipo	pH
1	LE-13	5.8
2	LE-13	6.3
3	LE-16	5.8
4	LE-16	6.3
5	LE-14	5.8
6	LE-14	6.3



3.4.2.2 Variables cuantificadas

En los primeros dos experimentos la variable fue la proporción de discos o explantes que brotaron (NEB) por frasco (cada uno con cinco explantes), valores que se transformaron a valores angulares (arco seno \sqrt{x}). Antes de ser sometidos a análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar y a la prueba de separación de medias de Tukey, mediante el programa PROC GLM de SAS[®] Versión 9.0. En el tercero y cuarto experimentos se consideró la proporción de explantes que brotaron (NEB) en función de su posición en el coleóptilo de la plántula. Se hizo análisis de varianza y prueba de medias de Tukey, también con el procedimiento GLM de SAS[®].

3.4.2.3 Evaluación de las variantes físicas del medio de cultivo en la inducción de brotes.

Con el mejor pH y con los dos primeros discos de tallo, que dieron la mayor capacidad de brotación en el ensayo anterior, se estableció otro experimento en el que se compararon los cuatro genotipos (LE-13, LE-16, LE-14 y LE-46) con tres factores de manejo: a) Volumen del medio de cultivo (10, 30 y 40 mL, en frascos de 45, 110 y 250 mL, respectivamente), suplementado con BAP (1.5 mg L⁻¹) y AIA (1.0 mg L⁻¹); b) Dos estados físicos del medio [sólido al que se le adicionó agar (Sigma)[®] a 0.6 % (p/v), y líquido con soporte de papel filtro]; y c) Duración del periodo de inducción de brotes (10, 15 y 20 d después de sembrar los explantes). Estos tres factores se evaluaron con el fin de optimizar el protocolo de inducción de brotes. De esta manera se generó un arreglo factorial 4x3x3x2, de 72 tratamientos (Cuadro 3). Las repeticiones por tratamiento oscilaron de 3 a 8.



Cuadro 3. Evaluación de la consistencia física del medio de cultivo, volumen del medio de cultivo y del recipiente y tiempo en la inducción de brotes de cuatro genotipos de maíz.

Tratamiento (Núm.)	Genotipo	Volumen del medio y recipiente (mL)	Consistencia física*	Tiempo de inducción (d)
1	LE-13	10/45	S	10
2	LE-13	30/110	S	10
3	LE-13	40/250	S	10
4	LE-13	10/45	L	10
5	LE-13	30/110	L	10
6	LE-13	40/250	L	10
7	LE-13	10/45	S	15
8	LE-13	30/110	S	15
9	LE-13	40/250	S	15
10	LE-13	10/45	L	15
11	LE-13	30/110	L	15
12	LE-13	40/250	L	15
13	LE-13	10/45	S	20
14	LE-13	30/110	S	20
15	LE-13	40/250	S	20
16	LE-13	10/45	L	20
17	LE-13	30/110	L	20
18	LE-13	40/250	L	20
19	LE-16	10/45	S	10
20	LE-16	30/110	S	10
21	LE-16	40/250	S	10
22	LE-16	10/45	L	10
23	LE-16	30/110	L	10
24	LE-16	40/250	L	10
25	LE-16	10/45	S	15
26	LE-16	30/110	S	15



...Continuación Cuadro 3.

Tratamiento (Núm.)	Genotipo	Volumen del medio y recipiente (mL)	Consistencia física*	Tiempo de inducción (d)
27	LE-16	40/250	S	15
28	LE-16	10/45	L	15
29	LE-16	30/110	L	15
30	LE-16	40/250	L	15
31	LE-16	10/45	S	20
32	LE-16	30/110	S	20
33	LE-16	40/250	S	20
34	LE-16	10/45	L	20
35	LE-16	30/110	L	20
36	LE-16	40/250	L	20
37	LE-14	10/45	S	10
38	LE-14	30/110	S	10
39	LE-14	40/250	S	10
40	LE-14	10/45	L	10
41	LE-14	30/110	L	10
42	LE-14	40/250	L	10
43	LE-14	10/45	S	15
44	LE-14	30/110	S	15
45	LE-14	40/250	S	15
46	LE-14	10/45	L	15
47	LE-14	30/110	L	15
48	LE-14	40/250	L	15
49	LE-14	10/45	S	20
50	LE-14	30/110	S	20
51	LE-14	40/250	S	20
52	LE-14	10/45	L	20
53	LE-14	30/110	L	20
54	LE-14	40/250	L	20



...Continuación Cuadro 3.

Tratamiento (Núm.)	Genotipo	Volumen del medio y recipiente (mL)	Consistencia física*	Tiempo de inducción (d)
55	LE-46	10/45	S	10
56	LE-46	30/110	S	10
57	LE-46	40/250	S	10
58	LE-46	10/45	L	10
59	LE-46	30/110	L	10
60	LE-46	40/250	L	10
61	LE-46	10/45	S	15
62	LE-46	30/110	S	15
63	LE-46	40/250	S	15
64	LE-46	10/45	L	15
65	LE-46	30/110	L	15
66	LE-46	40/250	L	15
67	LE-46	10/45	S	20
68	LE-46	30/110	S	20
69	LE-46	40/250	S	20
70	LE-46	10/45	L	20
71	LE-46	30/110	L	20
72	LE-46	40/250	L	20

*S= sólido; L= líquido.

3.4.2.4 Variables cuantificadas

Al finalizar cada periodo de inducción, se midió: a) Altura de los brotes (cm), y b) Número de hojas mayores a 2.5 cm de longitud, por brote. Esta variable se transformó de acuerdo con Bartlett ($\sqrt{0.5 + x}$) (1947). Los datos se analizaron bajo un diseño experimental completamente al azar. Se hizo análisis de varianza y la prueba de separación de medias de Tukey con un nivel de significancia de 5%.



3.4.3 Multiplicación y alargamiento de brotes

3.4.3.1 Medio de cultivo

El medio para multiplicación de brotes fue el MS, al cual se le adicionó BAP (1.5 mg L⁻¹), AIA (1.0 mg L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹) y agar (Sigma)[®] a 0.6 % (p/v). El pH fue de 5.8. Se sirvieron 40 mL de este medio en frascos de 250 mL.

En un primer experimento se evaluaron tres genotipos (LE-13, LE-14 y LE-16) en combinación con tres intervalos de tiempo entre subcultivos: 10, 15 y 20 d, para un total de nueve tratamientos en arreglo factorial 3x3 (Cuadro 4). El subcultivo consistió en transferir los brotes individuales \geq a 3 cm, al medio de cultivo fresco (Figura 10). Los brotes $<$ a 3 cm fueron transferidos en forma colectiva (sin desprenderlos de la masa de brotes) al nuevo medio. A partir del tercer subcultivo al medio se agregó ácido giberélico (AG₃) (1.0 mg L⁻¹) para promover el alargamiento de brotes.

Cuadro 4. Evaluación del intervalo de tiempo de subcultivo durante la multiplicación de brotes de cuatro genotipos de maíz.

Tratamiento (Núm)	Genotipo	Intervalo de subcultivo (d)
1	LE-13	10
2	LE-13	15
3	LE-13	20
4	LE-16	10
5	LE-16	15
6	LE-16	20
7	LE-14	10
8	LE-14	15
9	LE-14	20





Figura 10. División de la masa de brotes de maíz durante los subcultivos para su multiplicación vía organogénesis.

En un segundo experimento se usaron cuatro genotipos (se incorporó LE-46) cuyos brotes se subcultivaron en tres ocasiones cada 15 d, por haber sido éste el mejor intervalo.

3.4.3.2 Variables cuantificadas

Al finalizar los tres subcultivos en el primer experimento se registró: a) Número de brotes por explante (NBE); b) Número de explantes con brote (NEB); y c) Tasa de multiplicación ($NBE \times NEB$). Estas variables se transformaron según Bartlett ($\sqrt{x + 0.5}$) (1947) para su análisis estadístico. El análisis de varianza se hizo bajo un diseño experimental completamente al azar. El número de repeticiones varió de 53 hasta 85. Se efectuó la prueba de separación de medias de Tukey con un nivel de significancia de 5%.

Otras variables medidas fueron: d) Número de brotes con hojas (brotes vegetativos); e) Número de brotes con estigmas (jilotes); f) Número de explantes sin respuesta organogénica; y g) Número de brotes vivos en cada subcultivo. Para el cálculo de la proporción de brotes vivos, se consideró como 100 % al número de brotes del primer subcultivo. No se hizo análisis estadístico de los porcentajes porque sólo se tuvo un dato en este experimento.



En el segundo experimento las variables fueron: a) Altura de brote (cm); b) Número de hojas por brote; y c) Peso fresco por brote (g). Las repeticiones oscilaron entre 48 y 120, variación que dependió de la supervivencia de brotes. Se calculó la media y el error estándar por cada variable y se hizo una gráfica en Excel para presentar la relación entre el número de hojas y el peso fresco por brote.

3.5 ETAPA II. Efecto de la dosis de PEG en la multiplicación *in vitro* vía organogénesis

3.5.1 Simulación del estrés osmótico con Polietilenglicol (PEG-8000)

Se estableció un experimento basado en las condiciones óptimas para la inducción y multiplicación de brotes. Después de 45 d de multiplicación, los brotes (individuales o unidos, obtenidos en el último experimento de multiplicación) de los cuatro genotipos de maíz se transfirieron a medio de cultivo con tres concentraciones de Polietilenglicol (10, 15 y 20 %) (Sigma[®], peso molecular [PM] 8000) para la simulación de tres niveles de estrés osmótico. Se subcultivaron únicamente brotes con altura mayor o igual a 3 cm, de color verde y que presentaran láminas foliares, para así uniformar las unidades experimentales.

3.5.2 Medio de cultivo

El medio para estrés osmótico fue el MS más BAP (1.5 mg L⁻¹), AIA, (1.0 mg L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹), combinando con tres concentraciones de PEG: 10, 15 y 20 % (p/v), lo que equivale a 100, 150 y 200 g L⁻¹, más un testigo (sin PEG). El pH fue 5.8 y el estado físico del medio fue líquido, con 30 mL en frascos de 250 mL de capacidad.



3.5.3. Variables cuantificadas

Al término de tres subcultivos bajo las concentraciones del PEG, se registró el número de brotes vivos y con ese dato se calculó la mortalidad (en %) al considerar el número de brotes iniciales como 100%.

3.6 ETAPA III. Selección *in vitro* de brotes durante su multiplicación bajo estrés osmótico

3.6.1 Establecimiento del estrés osmótico

Para esta etapa se establecieron dos experimentos consecutivos con las condiciones óptimas para la inducción y multiplicación. Las semillas de los cuatro genotipos se germinaron bajo condiciones asépticas. De plántulas de 12 d de edad se disecaron los dos primeros discos de tallo (ver 3.4.2.1), y en éstos se indujo la brotación en frascos de 250 mL con 40 mL del medio MS (1962) de consistencia sólida que contenía BAP (1.5 mg L⁻¹), AIA (1.0 mg L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹) y agar (0.6 % [p/v] Sigma®), con pH de 5.8. El periodo de inducción duró 15 d. La multiplicación de brotes se hizo en el mismo medio y capacidad de frasco durante tres subcultivos, en intervalos de 15 d. En el último subcultivo se agregó AG₃ (1.0 mg L⁻¹). Posteriormente, los brotes se sometieron a estrés osmótico al añadir al medio (en estado líquido) PEG en concentraciones: 0, 10, 15 y 20 % (p/v), de modo que resultaron 16 tratamientos en arreglo factorial 4x4.

3.6.2 Duración del ciclo de selección

Un ciclo de selección consistió de un periodo necesario (en días) de exposición de los brotes de maíz al agente osmótico (PEG), que permitiera seleccionar brotes sobrevivientes con características fenotípicas favorables y considerarlos tolerantes al estrés, como se indica posteriormente. Se evaluaron tres niveles de duración del primer ciclo de selección: 10, 15 y 20 d. Con los resultados obtenidos,



se decidió utilizar la duración de 15 d para los siguientes dos ciclos de selección.

3.6.3 Criterios de selección de brotes

Se hizo la selección visual de brotes, tal como se ha hecho a partir de callos de arroz *in vitro* por Reddy y Vaidyanath (1986), quienes consideran como criterios de tolerancia al estrés osmótico: crecimiento normal del brote (alargamiento del brote), vigor (con brotes diferenciados), color verde (con clorofila) y tamaño estable de los brotes en los diferentes ciclos de selección. Aquellos brotes sin tales características no se seleccionaron y se eliminaron.

3.6.4 Caracterización de brotes

◆ En un primer experimento se midieron las siguientes características morfológicas de los brotes seleccionados: **a)** Altura de brotes (cm); **b)** Número de hojas presentes (liguladas y no liguladas); y **c)** Peso fresco (g), estimado al pesar el frasco con brotes y luego restarle el peso del frasco sin brotes. Las mediciones se hicieron en los brotes de los ciclos uno y tercero.

◆ En el segundo experimento también se midieron características fisiológicas del tejido de brotes, pero solamente del tercer ciclo de selección: **d)** Se calculó el porcentaje de agua del brote, de acuerdo con Ogawa y Yamaguchi (2006a): $([\text{Peso Fresco} - \text{Peso Seco}]/\text{Peso Fresco})$. Debido a que los brotes se encontraban en alta humedad relativa y en medio líquido, el tejido no se sometió a hidratación para obtener el porcentaje de agua en forma convencional; **e)** Estado hídrico: potencial hídrico (ψ) y potencial osmótico (ψ_{π}) y el potencial de turgencia o de presión (ψ_p) calculado mediante la diferencia $\psi_w - \psi_{\pi}$, con base en la ecuación: $\psi_w = \psi_{\pi} + \psi_p$.

Para la estimación del estado hídrico se usaron psicrómetros de termopar (C-52, Wescor, Logan, UTHA)[®], previamente calibrados con 10 soluciones molales de cloruro de sodio grado reactivo (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1.0



M) y ajustados con las ecuaciones de regresión lineal entre los valores del potencial hídrico (bares) de las soluciones salinas estándar y la señal eléctrica (μV) obtenida con el microvoltímetro de punto de rocío (HR-33T, Wescor, Logan, UTHA)[®] (Figura 11).

Los valores de potencial hídrico se midieron en un disco obtenido de las brácteas de los brotes, de 0.5 cm de diámetro y 1 mm de grosor, que se colocó en una cámara del psicrómetro. Al cabo de 3 h se efectuó la lectura de la señal eléctrica para calcular luego el valor del ψ_w . Posteriormente el mismo tejido se congeló con nitrógeno líquido (N_2) por 15 s e inmediatamente se introdujo nuevamente a la misma cámara para obtener la lectura de la señal eléctrica y obtener así el valor del ψ_π . También se midió el ψ_w del medio de cultivo, tomando una gota con pipeta Pasteur colocada sobre un círculo de papel filtro ($\theta = 0.5$ cm) y haciendo el mismo procedimiento.



Figura 11. Microvoltímetro de punto de rocío (HR-33T, Wescor, Logan, UTHA)[®].

Con los valores del potencial osmótico, peso fresco y peso seco, se calculó el ajuste osmótico total (AOT, en bar) y sus componentes: efecto de los solutos (AOS, en bar) y el efecto de los polímeros de la pared celular (AOP, en bar), adaptando las fórmulas usadas por Martínez *et al.* (2004):



$$\text{AOT} = \Psi_{\pi} \text{ testigo sin PEG} - \Psi_{\pi} \text{ tratamiento con PEG},$$

$$\text{AOP} = \left[\frac{(\text{PF/PS})_{\text{testigo sin PEG}} - (\text{PF/PS})_{\text{tratamiento con PEG}}}{[(\text{PF/PS})_{\text{testigo sin PEG}} \times (\text{AOT})]} \right],$$

$$[(\text{PF/PS})_{\text{testigo sin PEG}} \times (\text{AOT})]$$

$$\text{AOS} = \text{AOT} - \text{AOP}.$$

f) Como parte de las características de los brotes (3.6.4) también se cuantificó el contenido total de proteína soluble por brote correspondiente a los ciclos de selección uno y tres, como sigue:

1) Preparación de extractos para cuantificación y electroforesis de proteína

Muestra de tejido. Al final del primero, segundo y tercer ciclo de selección de brotes (75 d, 90 d y 105 d después de la inducción, respectivamente), se tomaron al azar dos frascos con brotes de cada tratamiento (cuatro genotipos x cuatro concentraciones de PEG) para el análisis de proteínas. Bajo condiciones asépticas en la campana de flujo laminar, se pesó de 0.5 a 1 g de tejido foliar (brácteas) por brote, el tejido se introdujo en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, previamente esterilizados, y se congelaron en nitrógeno (N₂) líquido. De esta manera se tuvieron 32 tubos con tejido por cada ciclo de selección. Después, los tubos se transfirieron a un ultra-congelador a -80° C hasta su análisis.

Buffer de extracción. Se preparó el buffer para la extracción de proteína soluble del tejido, conformado por Tris-HCl (20 mM) y NaCl (0.5 M). Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH (1 N) y HCl (1 N). Esta solución se conservó en frasco color ámbar y en refrigeración a 4 °C.

Buffer de muestra. Se preparó como se señaló en el Cuadro 2 A (Ver Apéndice).

Extracción de proteína. La muestra de tejido (previamente pesada) se colocó en un mortero de porcelana, previamente enfriado a 4 °C, y se le adicionó 0.1 g de arena de mar (MERCK®) y 0.10 g de polivinil pirrolidona (PVP, SIGMA®);



inmediatamente después se añadió 0.5 mL de buffer de extracción. Se maceró el tejido hasta lograr una masa fina fluida la cual se introdujo en un tubo Eppendorf esterilizado. Se procedió a centrifugar la muestra molida a 14,000 rpm y 4 °C durante 5 min. Se tomaron 100 µL del sobrenadante crudo de cada uno de los 96 tubos (32 por ciclo x 3 ciclos).

Los tubos con el sobrenadante crudo, correspondientes a la primera repetición (48 tubos) se almacenaron en congelación a -40 °C, y luego fueron utilizados para determinar la concentración total de proteína por medio del ensayo de Bradford (1976).

A los tubos con 100 µL de sobrenadante de la segunda repetición se les agregaron 100 µL de Buffer de muestra y se desnaturalizaron al calentarlos en agua hirviente (100 °C) durante 3 min; inmediatamente después se congelaron a -40 °C para usarse en la separación de proteínas (SDS-PAGE), de acuerdo con las instrucciones de BIO-RAD®.

2) Cuantificación de proteína total con el Ensayo de Bradford

Determinación de la curva patrón. Se usó agua destilada (d)-desionizada (d), albúmina de suero bovino (BSA, SIGMA®) como patrón proteico (0.25 µg µL⁻¹ de agua) y el reactivo de Bradford (BIO-RAD®). Con esta concentración de proteína se preparó una curva de calibración de 0-15.0 µg mL⁻¹ (Cuadro 3 A).

Para determinar la absorbancia se usó un espectrofotómetro UV-Visible (VARIAN® modelo Carry Win 50) que conserva en la memoria la ecuación de regresión (concentración de proteína-absorbancia a 595 nm) y determina automáticamente la concentración de proteína de los extractos correspondientes a los tratamientos.

Lectura de absorbancia. Los extractos conservados en congelación se descongelaron, y centrifugaron a 14,000 rpm y 4 °C por 3 min. De cada uno de



ellos se tomó (por duplicado) una alícuota de 5 μL y se colocó en otro tubo Eppendorf adicionando 795 μL de agua destilada más 200 μL de reactivo de Bradford (BIO-RAD[®]); el tubo se agitó en un vórtex. Se hicieron dos repeticiones por tubo. Después de 5 min se vació la mezcla en celdas para obtener la lectura de absorbancia, a 595 nm. Las lecturas del espectrofotómetro fueron en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

La cantidad de proteína por unidad de volumen se convirtió en $\mu\text{g g}^{-1}$ y luego este valor se representó en por ciento. De este modo se tuvieron 64 lecturas (4 genotipos x 4 niveles de PEG [incluyendo el testigo] x 2 ciclos de selección [el primero y el tercero] x 2 repeticiones). Se hizo análisis de varianza del arreglo factorial, 4 genotipos x 4 niveles de estrés osmótico dando 32 tratamientos, bajo un diseño completamente al azar, por cada ciclo de selección (1^{ero} y 3^{ero}).

Durante la optimización del protocolo de extracción de proteínas solubles se usaron muestras del segundo ciclo de selección. Dado que se agotaron algunas muestras, no se consideró al segundo ciclo en los análisis estadísticos.

3) Separación de proteínas con el sistema de Laemmli

Para el desarrollo de la electroforesis de proteína, se siguieron las instrucciones de manual correspondiente al equipo Mini-PROTEAN[®] 3 Cell (BIO-RAD[®]). Los geles fueron de 1 mm de espesor y volumen de 5.6 mL. Para hacerlos se prepararon las soluciones que se citan en los Cuadros 4 A y 5 A.

◆ **Electroforesis.** Se armó la cámara de electroforesis (modelo Mini Protean[®] 3-Cell Serie 525BR, 056900) y se adicionó 0.5 L de buffer de corrida (Cuadro 6 A). La corrida se efectuó a 100 V y 30 mA constantes durante 3 h por gel. Los tubos con las muestras desnaturalizadas se descongelaron y se centrifugaron a 14,000 rpm y 4 °C por 3 min. Posteriormente, con una Jeringa Hamilton[®] de 100 μL de capacidad se midió el volumen de extracto (de 10 a 30 μL ; dependiendo de los tratamientos) de modo que contuviera a 40 μg de proteína, y se depositaron en cada uno de los pozos del gel apilador. Se usó un marcador de



proteína de amplio rango con pesos moleculares desde 6.5 a 175 KDa (Bio Labs-P7708S, Broad range)[®] depositando 12 µL en un pozo de cada gel. En total se hicieron 12 geles en los que se distribuyeron los diferentes tratamientos (Cuadro 7 A).

◆ **Tinción del gel.** Una vez terminada la electroforesis de proteínas, el gel se colocó en un recipiente de plástico (12 x 8 x 5 cm) donde se le añadió la solución de fijado, la cual consistió de 40% de metanol y 7% de ácido acético, hasta cubrirlo completamente. Se dejó en agitación a 20 rpm durante 0.5 h. Posteriormente se retiró la solución de fijado para agregarle inmediatamente el buffer de tinción (Cuadro 8 A) hasta inundar el gel. Se dejó agitando a 20 rpm durante 20 min.

◆ **Destinción del gel.** Después de teñir el gel se retiró el buffer de tinción para agregarle Buffer de desteñido (metanol al 20 %) hasta inundar. Se dejó desteñir durante 8 h.

◆ **Imágenes digitales de geles.** Se tomaron fotografías de los geles en el transiluminador (UVP- Canon TV200M)[®]. El aparato se ajustó para que la imagen digital del gel fuera fotografiado en color azul de Comassie y bajo luz blanca. Se compararon cualitativamente los patrones de bandeo para cada genotipo por ciclo de selección y por dosis de PEG.

g) Cuantificación de prolina soluble en brotes de las líneas LE-13 y LE-16 en su tercer ciclo de selección

Se consideraron sólo estas dos líneas porque resultaron contrastantes en sus variables morfológicas y fisiológicas. Los análisis se hicieron de la siguiente manera:

1) Preparación de extractos para cuantificación de prolina con el Ensayo de Bates (1973)

Muestra de tejido. Se tomaron al azar de 2 a 3 brotes de las líneas LE-13 y LE-16 del tercer ciclo de selección, en cada nivel de estrés osmótico (0, 10, 15 y 20 %



de PEG). Se pesó de 0.5 a 1 g de tejido foliar (brácteas) por brote, se introdujo en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, previamente esterilizados, los cuales se congelaron en nitrógeno (N₂) líquido. Después, los tubos se transfirieron a un ultra-congelador a -80 °C hasta su análisis.

Extracción de prolina. La muestra de tejido (previamente pesada) se colocó en un mortero de porcelana, previamente enfriado a 4 °C; de inmediato se le añadió 10 mL de ácido sulfosalicílico al 3 % (Cuadro 9 A). Se maceró con arena de mar [0.1 g de arena de mar (MERCK®)] hasta lograr una masa fina fluida la cual se filtró con papel Whatman No. 5. El papel se colocó en un embudo de vidrio y luego se humedeció con ácido sulfosalicílico al 3 %, antes de verter el macerado. Del extracto filtrado se tomó una alícuota de 2 mL, a la que se agregaron 2 mL de solución de ninhidrina ácida (Cuadro 10 A) + 2 mL de ácido acético glacial. Las muestras se agitaron en el Vórtex. Posteriormente se colocaron en baño María a 90 °C durante 1 h. En seguida, a cada tubo con la muestra se le agregó 4 mL de tolueno bajo la campana de extracción de aire, en seguida se enfrió en baño de hielo durante 15 min; se esperó a que se separaran las dos fases y se tomó la fase orgánica superior del tubo.

2) Cuantificación de prolina total

Determinación de la curva patrón. Se prepararon 100 mL de solución estándar de L-prolina (SIGMA®) en concentración 0.004 M, en ácido sulfosalicílico al 3%. Con esta solución se hicieron diluciones en 10 tubos con ácido sulfosalicílico al 3 %, para tener concentraciones desde 8 hasta 800 nmol de prolina (Cuadro 11 A). El blanco se manejó igual que las muestras, el cual se preparó con 2 mL de ácido sulfosalicílico, 2 mL de ninhidrina y 2 mL de ácido acético glacial.

Lectura de absorbancia. Para determinarla se usó un espectrofotómetro UV PYE UNICAM® modelo SP8-100 a una longitud de onda de 520 nm.



Primero se ajustó la absorbancia a cero con el blanco, luego se obtuvo la absorbancia de las diluciones en celdas de cuarzo. Con los datos se obtuvo la línea de regresión de la absorbancia sobre la concentración de prolina.

En el mismo espectrofotómetro se obtuvo la absorbancia de las muestras y se usó la ecuación de regresión para estimar el contenido de prolina en nmol mL^{-1} . Esta variable se transformó luego a $\mu\text{mol g}^{-1}$ de PF.

3.6.5 Análisis de variables

En el primer experimento las variables morfológicas de los brotes del primero y tercero ciclos de selección, se analizaron en un arreglo factorial $4 \times 4 \times 2$ (genotipos \times niveles de PEG \times ciclos), bajo un diseño completamente al azar.

En las variables fisiológicas del segundo experimento, la acumulación de biomasa, porcentaje de agua (transformada a valores angulares), el potencial hídrico y sus componentes, se analizaron bajo diseño completamente al azar con arreglo factorial 4×4 (4 genotipos y 4 niveles de PEG) con 16 tratamientos. El ajuste osmótico total se analizó con el mismo diseño experimental, pero el arreglo factorial resultó 4×3 (4 genotipos \times 3 niveles de PEG [10, 15 y 20 %]).

La cantidad de proteína por unidad de volumen se convirtió a mg g^{-1} de peso fresco. Se tuvieron 32 tratamientos resultantes del arreglo factorial de 4 genotipos \times 4 niveles de PEG [incluyendo el testigo] \times 2 ciclos de selección [el primero y el tercero]. Se hizo análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar con dos repeticiones. En el análisis estadístico no se involucró el segundo ciclo de selección porque durante la optimización del protocolo de extracción de proteínas solubles se agotaron algunas muestras.

Los geles se analizaron visualmente, determinando la presencia y ausencia de bandas proteicas de acuerdo con su peso molecular aproximado, en función del nivel de estrés osmótico en cada genotipo.

Este análisis se hizo para cada genotipo por ciclo de selección y por dosis de PEG.



El contenido de prolina en los brotes de las líneas LE-13 y LE-16 se analizaron gráficamente con los promedios y el error estándar en cada nivel de estrés osmótico.

3.6.6 Enraizamiento *in vitro* de brotes seleccionados

Se promovió el enraizamiento de los brotes seleccionados en frascos de 250 mL de capacidad conteniendo 40 mL de medio MS y pH de 5.8. Se establecieron cuatro ensayos sucesivos con brotes seleccionados en los experimentos de la etapa III, para evaluar concentraciones de auxinas, de sacarosa y estados físicos del medio, cuyos tratamientos se detallan en los Cuadros 5, 6, 7 y 8.

Cuadro 5. Ensayo uno de rizogénesis de brotes seleccionados en la etapa III bajo estrés osmótico.

Tratamiento	Genotipo	Medio MS de consistencia líquida
1	LE-13	MS + ANA (5 mg L ⁻¹) + Sacarosa (30 g L ⁻¹)
2	LE-13	MS + ANA (0 mg L ⁻¹) + Sacarosa (0 g L ⁻¹)
3	LE-16	MS + ANA (5 mg L ⁻¹) + Sacarosa (30 g L ⁻¹)
4	LE-16	MS + ANA (0 mg L ⁻¹) + Sacarosa (0 g L ⁻¹)
5	LE-14	MS + ANA (5 mg L ⁻¹) + Sacarosa (30 g L ⁻¹)
6	LE-14	MS + ANA (0 mg L ⁻¹) + Sacarosa (0 g L ⁻¹)
7	LE-46	MS + ANA (5 mg L ⁻¹) + Sacarosa (30 g L ⁻¹)
8	LE-46	MS + ANA (0 mg L ⁻¹) + Sacarosa (0 g L ⁻¹)

MS= Murashige y Skoog (1962); ANA= Ácido Naftalenacético.



Cuadro 6. Ensayo dos de rizogénesis de brotes seleccionados en la etapa III bajo estrés osmótico.

Tratamiento	Genotipo	Medio MS de consistencia líquida
1	LE-13	MS + AIB (2.5 mg L ⁻¹) + Sacarosa (30 g L ⁻¹)
2	LE-13	MS + AIB (0 mg L ⁻¹) + Sacarosa (0 g L ⁻¹)
3	LE-16	MS + AIB (2.5 mg L ⁻¹) + Sacarosa (30 g L ⁻¹)
4	LE-16	MS + AIB (0 mg L ⁻¹) + Sacarosa (0 g L ⁻¹)
5	LE-14	MS + AIB (2.5 mg L ⁻¹) + Sacarosa (30 g L ⁻¹)
6	LE-14	MS + AIB (0 mg L ⁻¹) + Sacarosa (0 g L ⁻¹)
7	LE-46	MS + AIB (2.5 mg L ⁻¹) + Sacarosa (30 g L ⁻¹)
8	LE-46	MS + AIB (0 mg L ⁻¹) + Sacarosa (0 g L ⁻¹)

MS= Murashige y Skoog (1962); AIB= Ácido Indolbutírico.

Cuadro 7. Ensayo tres de rizogénesis de brotes seleccionados bajo estrés osmótico.

Tratamiento (Núm)	Genotipo	Consistencia física/concentración de medio MS	AIB (mg L ⁻¹)
1	LE-13	SOL /100%	0.0
2	LE-13	SEM/100%	0.0
3	LE-13	SOL / 50%	0.0
4	LE-13	SEM/ 50%	0.0
5	LE-13	SOL /100%	2.5
6	LE-13	SEM/100%	2.5
7	LE-13	SOL / 50%	2.5
8	LE-13	SEM/ 50%	2.5
9	LE-16	SOL /100%	0.0



...Continuación Cuadro 7.

Tratamiento (Núm)	Genotipo	Consistencia física/concentración de medio MS	AIB (mg L ⁻¹)
10	LE-16	SEM/100%	0.0
11	LE-16	SOL / 50%	0.0
12	LE-16	SEM/ 50%	0.0
13	LE-16	SOL /100%	2.5
14	LE-16	SEM/100%	2.5
15	LE-16	SOL / 50%	2.5
16	LE-16	SEM/ 50%	2.5
17	LE-14	SOL /100%	0.0
18	LE-14	SEM/100%	0.0
19	LE-14	SOL / 50%	0.0
20	LE-14	SEM/ 50%	0.0
21	LE-14	SOL /100%	2.5
22	LE-14	SEM/100%	2.5
23	LE-14	SOL / 50%	2.5
24	LE-14	SEM/ 50%	2.5
25	LE-46	SOL /100%	0.0
26	LE-46	SEM/100%	0.0



...Continuación Cuadro 7.

Tratamiento (Núm)	Genotipo	Consistencia física/concentración de medio MS	AIB (mg L ⁻¹)
27	LE-46	SOL / 50%	0.0
28	LE-46	SEM/ 50%	0.0
29	LE-46	SOL /100%	2.5
30	LE-46	SEM/100%	2.5
31	LE-46	SOL / 50%	2.5
32	LE-46	SEM/ 50%	2.5

SOL= Medio en estado físico sólido con 6 g L⁻¹ de agar Sigma®; SEM= Medio en estado físico semisólido con 3.5 g L⁻¹ de agar Sigma®; 100 % = Sales del MS 1X; 50 % = Sales del MS 0.5X

Finalmente, para rizogénesis los brotes se evaluaron en diferentes concentraciones de sacarosa de medio MS (1962) en estado sólido (con agar Sigma® al 0.6 % p/v) sin hormonas (Cuadro 8).

3.6.6.1 Variables cuantificadas

Sólo hubo rizogénesis en el último ensayo y éste fue el único que se analizó gráficamente en el porcentaje de brotes con raíz. Se elaboró una gráfica para representar la relación entre el porcentaje de enraizamiento y el nivel de estrés osmótico mediante la hoja de cálculo Excel®. No fue posible hacer análisis de varianza por falta de repeticiones en varios tratamientos, incluyendo el testigo, ya que sólo se obtuvo un dato en este ensayo.



Cuadro 8. Ensayo cuatro de rizogénesis de brotes seleccionados en la etapa III bajo estrés osmótico.

Tratamiento (Núm.)	Genotipo	Medio de cultivo
1	LE-13	MS + Sacarosa (0 g L ⁻¹)
2	LE-13	MS + Sacarosa (30 g L ⁻¹)
3	LE-13	MS + Sacarosa (50 g L ⁻¹)
4	LE-16	MS + Sacarosa (0 g L ⁻¹)
5	LE-16	MS + Sacarosa (30 g L ⁻¹)
6	LE-16	MS + Sacarosa (50 g L ⁻¹)
7	LE-14	MS + Sacarosa (0 g L ⁻¹)
8	LE-14	MS + Sacarosa (30 g L ⁻¹)
9	LE-14	MS + Sacarosa (50 g L ⁻¹)
10	LE-46	MS + Sacarosa (0 g L ⁻¹)
11	LE-46	MS + Sacarosa (30 g L ⁻¹)
12	LE-46	MS + Sacarosa (50 g L ⁻¹)

MS= Murashige y Skoog (1962).

3.6.7 Aclimatación de plantas

Los frascos conteniendo las plántulas con raíz se introdujeron a una cámara de incubación (Biotrenette mark III[®], 120 V, 50/60 Hz y 6 A. Melrose Park, Illinois, USA) con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad, a 26 ± 2 °C. Después de 5 d las plántulas se sacaron del frasco para enjuagarlas con agua destilada estéril y eliminar el resto de agar. Luego se trataron con una solución de Benlate[®] (4 g L⁻¹) por 5 min. Enseguida se transplantaron en vasos de unicel No. 12 con sustrato esterilizado (Agrolita [mineral estéril inorgánico de origen volcánico]-Peat Moss



[musgo canadiense estéril, pH de 3.5 a 4.0, materia orgánica de 95%, cenizas <5%, absorción de agua por 12 veces su peso en seco]), mezclados en proporción 1:1.

Las plantas se mantuvieron cubiertas con bolsas de polietileno traslúcidas durante una semana, para conservar la humedad relativa y permitir la fotosíntesis. Al iniciar la segunda semana, se hizo un orificio en la esquina superior. En la tercera semana, se hizo un segundo orificio en la otra esquina. Al término de la tercera semana se retiró la bolsa.

3.6.7.1 Variable cuantificada

Se consideró el número de plantas sobrevivientes por genotipo. Sin embargo, todas las plantas murieron en la tercera semana de aclimatación. Se tomaron fotografías digitales para ilustrar el evento.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ETAPA I. Organogénesis *in vitro*

4.1.1. Cultivo aséptico y germinación de semillas

Para el análisis estadístico de varianza de la germinación *in vitro* se combinaron los datos de tres experimentos consecutivos para generar repeticiones de las variables ésta expresada en porcentaje. No hubo diferencia entre genotipos en cuanto a la capacidad de germinación de las semillas, ni en la cantidad de semillas sin germinar, contaminadas y plántulas anormales. En contraste, el efecto del genotipo fue significativo sobre las características morfológicas de las plántulas normales de 12 d de edad (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores de F del análisis de varianza de la germinación y características de las plántulas obtenidas *in vitro*, por efecto del genotipo. Datos combinados de tres experimentos.

Factor	GE	NG	AN	CO	LC	AP	NH
Genotipo	1.53 ns	0.19 ns	1.44 ns	0.19 ns	11.1 **	18.3 **	29.8 **

GE= germinación (valor angular) NG= granos sin germinar (valor angular); AN= plántulas anormales (valor angular); CO= contaminación por microbios (valor angular); LC= longitud del coleoptilo (cm); AP= altura de la plántula (cm); NH= número de hojas presentes. **= Significancia a 1 % de error; ns= no significativo.

En el vigor de las plántulas normales que se desarrollaron de las semillas (Figura 12), los genotipos LE-13 y LE-14 fueron los mejores en número de hojas (liguladas y no liguladas). El genotipo LE-16 presentó las plántulas con mayor longitud de coleóptilo pero la menor altura total y menor número de hojas. El LE-46 superó a los demás genotipos en altura de las plántulas (Cuadro 10).





Figura 12. Plántulas de maíz germinadas *in vitro* con desarrollo normal.

Cuadro 10. Promedio de germinación de semillas y de características de las plántulas obtenidas *in vitro*. Tres experimentos.

GEN	LC (cm)	AP (cm)	NH (núm)	Valores porcentuales			
				GE	NG	AN	CO
LE-13	2.53 b	21.4 ab	3.8 a	85.3	11.8	4.2	19.8
LE-16	2.92 a	17.5 c	2.9 c	79.7	19.6	0.78	16.9
LE-14	2.53 b	19.9 bc	3.8 a	81.5	13.5	8.3	12.5
LE-46	2.36 b	24.1 a	3.3 b	95.7	4.2	1.2	6.3
DSH	0.36	3.2	0.35	ns	ns	ns	ns

LC= longitud del coleoptilo (cm); NH= número de hojas presentes (liguladas y no liguladas); AP= altura de la plántula (cm); GE= germinación NG= granos sin germinar; AN= plántulas anormales; CO= contaminación por bacterias y/o hongos; ns= no significativo. Letras iguales en una columna indican promedios estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

El porcentaje de germinación osciló entre 79.7 % y 95.7 %, el de semillas no germinadas entre 4.2 % y 19.6 %, y el de plántulas anormales entre 0.8 % y 8.3 %. Independientemente de las semillas que germinaron, el porcentaje de contaminación osciló entre 6.3% y 19.8 %.

La germinación de la semilla en sentido estricto se define como la secuencia de eventos fisiológicos que ocurren hasta la emergencia de la radícula. Después desencadenan los eventos postgerminativos, como movilización de reservas, cambios hormonales y establecimiento de la plántula (Nonogaki, 2006). En este contexto, las diferencias genotípicas observadas en esta investigación, ocurrieron en los eventos postgerminativos reflejados en diferencias del vigor de las plántulas.

Dado que las condiciones *in vitro* son óptimas para la germinación, se infiere que las semillas que no germinaron probablemente no tenían viabilidad. Entre los factores fisiológicos que conducen a la pérdida de germinación, viabilidad y vigor es el envejecimiento natural de las semillas, lo cual depende del genotipo y del ambiente (Cruz *et al.*, 2003; Fragoso *et al.*, 2006). Por otra parte, a pesar de haber llevado a cabo el protocolo de desinfección de semillas, algunas mostraron la presencia de hongos y bacterias durante la germinación.

En este estudio no se evaluó la germinación de la semilla sometida a estrés osmótico, porque no fue un objetivo planteado. Sin embargo, se sabe que el proceso de germinación del grano de arroz se inhibe con el incremento de polietilenglicol de 0 % a 24.7 % en solución acuosa (Alam *et al.*, 2003).

4.1.2. Inducción de brotes

4.1.2.1. Efecto del a) pH y de b) la posición de los explantes sobre la capacidad organogénica

a) pH del medio de cultivo

Un método de micropropagación implica la propagación por yemas axilares o apicales, explantes que incluyen un meristemo que origina un nuevo brote. Un segundo método consiste en la inducción de brotes o pre-embriones adventicios en tejidos que no son meristemáticos, en el que se pueden observar dos formas de



organogénesis: la directa cuando los brotes surgen directamente del tejido del explante sin formar previamente callo, y la indirecta cuando la regeneración de brotes se obtiene después de una etapa de callo (Thiart, 2003).

El proceso organogénico inicia con cambios en células del parénquima, las cuales se dividen para producir una masa globular de células o meristemoide y éstas pueden dar origen a un brote o a un primordio de raíz. En contraste, la embriogénesis somática da origen a una estructura bipolar, es decir un eje con meristemo apical y radical (Ahmed *et al.*, 2001). De esta última vía también existen dos tipos, la directa y la indirecta, lo cual depende si el explante pasa o no por la fase de callo (Eudes *et al.*, 2003).

La multiplicación *in vitro* de maíz se ha hecho con diferentes tejidos como explantes, como: embriones maduros e inmaduros, espigas, anteras, microsporas, mesocótilos, nudos coleoptilares, glumas de la espiguilla, partes basales de las hojas (Li *et al.*, 2002), jilotes, meristemo apical del vástago y las yemas axilares (Walden *et al.*, 1989).

En este trabajo se evaluó la inducción de organogénesis en secciones del tallo envuelto por el coleóptilo, la cual fue influenciada significativamente por el genotipo y por la interacción genotipo x pH. El pH por sí solo no tuvo efecto significativo (Cuadro 11). Los resultados surgieron de dos experimentos sucesivos que se analizaron en forma constante.

Cuadro 11. Valores de F del análisis de varianza del número de explantes con brotes (NEB) por efecto del genotipo, pH y la interacción. Datos combinados de dos experimentos.

Efecto	NEB (arco seno \sqrt{x})
Genotipo	8.6 **
pH del medio de cultivo	2.14 ns
Genotipo x pH	6.7 **

**= Significancia a 1 % de error; ns= no significativo.



Según la interacción genotipo x pH, el mayor número de explantes con brotes ocurrió en el genotipo LE-13 en pH de 6.3 (58 %) y en el genotipo LE-16 en pH de 5.8 (43 %). El resto de los tratamientos fueron estadísticamente iguales, y el genotipo LE-14 resultó insensible al pH del medio de cultivo (Cuadro 12).

En otro estudio, Iracheta *et al.* (2003) evaluaron la organogénesis en cuanto al número de explantes con brotes y número de brotes por explante, y el mejor genotipo fue LE-13 en comparación con LE-14 y LE-16 para la inducción de brotes.

Cuadro 12. Medias del número de explantes con brotes (NEB) por efecto combinado el genotipo y pH del medio de cultivo. Datos de dos experimentos.

Genotipo	pH	NEB		Frascos con 5 explantes (repeticiones)
		Frecuencia (%)	Valores angulares (arco seno \sqrt{x})	
LE-13	5.8	39	0.67 b	24
	6.3	58	0.90 a	24
LE-16	5.8	43	0.71 ab	17
	6.3	34	0.62 b	15
LE-14	5.8	31	0.58 b	14
	6.3	34	0.61 b	17
DSH	-	-	0.19	-

DSH = diferencia mínima significativa a 5 % de error. Letras iguales en una columna indican promedios estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

El pH tiene influencia en la cinética de absorción de auxinas disueltas en el medio de cultivo por los explantes. Por ejemplo, en estudios efectuados con secciones en forma de disco, disecadas del coleóptilo de maíz, indican que al disminuir el pH de 8.0 a 3.5 aumenta la absorción del ácido indolacético en el tejido (Edwards y Goldsmith, 1980); es decir, con pH ácido se absorbe más AIA. Esto parece explicar la sensibilidad de los genotipos LE-13 y LE-16 al pH.

La organogénesis también es influenciada por las fitohormonas adicionadas al medio de cultivo, ya que el medio de inducción contenía mayor cantidad de citocininas con respecto a las auxinas; al respecto, Yamaguchi *et al.* (2003) indican que con una alta proporción de auxina con respecto a la citocinina, se



induce usualmente la formación de raíces, en el caso contrario se promueve la formación de brotes. Una relación balanceada de tales fitohormonas promueve una proliferación celular desorganizada que es la formación de callo.

En el cultivo *in vitro* de explantes de soya el incremento de pH de 5.7 a 7.9 en el medio de cultivo no tuvo efecto en la inducción de embriogénesis (Hofmann *et al.*, 2004), mientras que en plántulas de trigo el mejor pH fue de 4 para alargar raíces, y hubo variación entre genotipos (De Oliveira *et al.*, 2004). Por ello en este trabajo se podría postular que algunos genotipos son sensibles al pH por cambios en la absorción de AIA.

b) Posición de los explantes en el coleóptilo

En dos experimentos se comparó el efecto del genotipo y de la posición del explante en el nudo coleoptilar, sobre la capacidad de brotación (Cuadro 13). Se detectó efecto significativo de la posición del explante, ya que los derivados de los segmentos más cercanos a la base fueron los que presentaron alta capacidad de brotación, 65 % y 76 % (Cuadro 14). Esta capacidad disminuyó conforme el explante se obtuvo de una parte más alejada de la base del coleóptilo. Los explantes que no brotaron comúnmente tenían hojas inmaduras enrolladas (Figura 13).

Cuadro 13. Valores de F para la frecuencia de explantes que mostraron actividad organogénica en función de su posición en el coleóptilo de la plántula donadora. Datos de un tercero y cuarto experimentos.

Efecto	Valores de F del Análisis de Varianza	
	Frecuencia relativa	Frecuencia (arco seno \sqrt{x})
Genotipo (G)	2.2 ns	2.2 ns
Posición (P)	34.6 **	29.5 **
G x P	0.1 ns	0.2 ns

**= Significancia a 1 % de error: ns= no significativo.



Cuadro 14. Frecuencias de explantes con actividad organogénica en función de su posición en el coleóptilo de la plántula. Valores de un tercero y cuarto experimentos.

Posición (Orden acrópeto)	Explantes que brotaron	
	Frecuencia (%)	Valores angulares (arco seno \sqrt{x})
I	76	1.07 a
II	65	0.95 a
III	24	0.50 b
IV	8	0.23 c
DSH	-	0.26

DSH = diferencia mínima significativa a 5 % de error. Letras iguales en una columna indican promedios estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

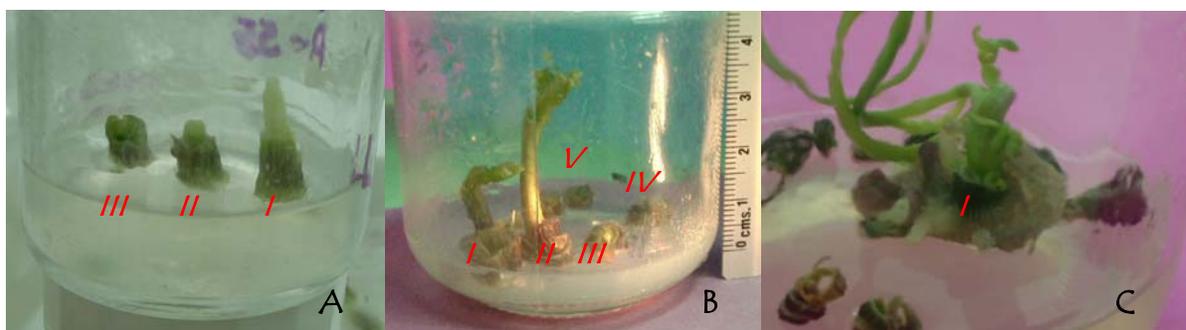


Figura 13. Inducción de organogénesis de maíz en explantes disecados del nudo coleoptilar (discos I al V). A) Organogénesis en los tres primeros explantes conservando su posición acrópeta sobre el medio de cultivo; B) Organogénesis en cinco explantes acomodados en forma circular sobre el medio de cultivo; C) Acercamiento de la organogénesis en el explante de la primera posición.

Raman *et al.* (1980) cultivaron *in vitro* yemas axilares de los 10 primeros nudos del tallo de plántulas de maíz; observaron que las 3 primeras yemas dieron origen a plantas sólo con espigas, las yemas de los nudos 4 al 7 desarrollaron plantas sólo con espigas y algunas normales (con espigas y jilotes), mientras que las yemas de los nudos 8 al 10 produjeron plantas sólo con jilotes y algunas normales. Es factible deducir entonces que la capacidad organogénica de los explantes usados en el presente trabajo estuvo en función de su posición o ubicación, quizás porque los explantes basales tenían yemas axilares y más proporción de tejido meristemático que los explantes superiores. Según Iracheta *et al.* (2003), 99 % de

los brotes se desarrollaron a partir de los primeros 4 mm basales del coleóptilo (4 discos basales), porque estos explantes eran anatómicamente diferentes a los que no mostraron actividad organogénica.

En forma similar, Tiel *et al.* (2006) encontraron que los dos primeros explantes, tomados en orden acrópeto de plántulas de caña de azúcar, presentaron la mayor capacidad organogénica, capacidad que disminuyó en sentido acrópeto; además detectaron diferencias entre genotipos, principalmente en el número de brotes por explante.

4.1.2.2. Efecto de variantes físicas del medio de cultivo en la inducción de brotes

En este experimento se evaluaron los factores: genotipo, intervalo en días (d) para la fase de inducción de brotes, volumen del frasco de cultivo y consistencia física del medio de cultivo (Figura 14). En la variable altura del brote, solamente tuvieron efecto significativo el genotipo, la consistencia del medio y la interacción genotipo x intervalo, mientras que el volumen del frasco no tuvo efecto alguno. El número de hojas no cambió significativamente por influencia de los factores involucrados (Cuadro 15).

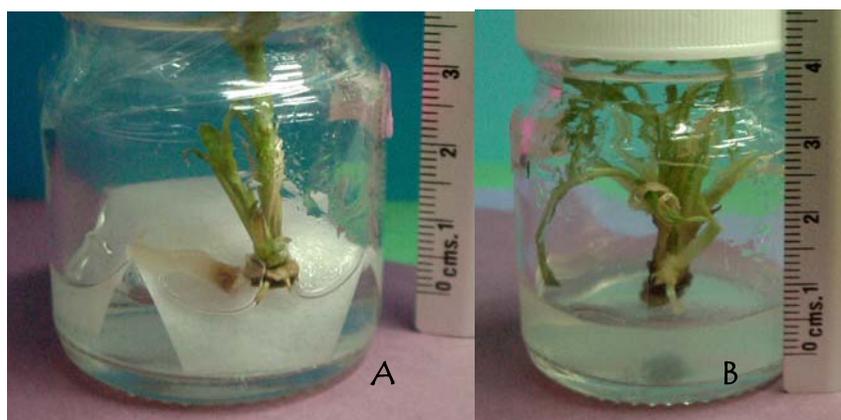


Figura 14. Inducción de organogénesis de maíz a partir del disco I del nudo coleóptilar: A) Medio líquido con plataforma, B) Medio sólido.



Cuadro 15. Valores de F del análisis de varianza de la altura y número de hojas por brote por efecto del genotipo, intervalo de inducción, volumen del frasco, consistencia del medio de cultivo y sus interacciones. Datos del primer experimento.

Efecto	Altura del brote (cm)	Número de hojas (Transformación de Bartlett)
Genotipo (G)	3.35 *	0.70 ns
Intervalo (I)	1.18 ns	0.34 ns
Volumen (V)	0.27 ns	1.35 ns
Consistencia (C)	6.98 **	0.12 ns
G x I	2.58 *	2.71 ns
G x V	0.96 ns	0.71 ns
G x C	1.73 ns	1.88 ns
I x V	0.78 ns	0.67 ns
I x C	1.24 ns	0.01 ns
V x C	0.09 ns	0.01 ns
G x I x V	1.00 ns	1.40 ns
G x I x C	1.44 ns	0.74 ns
I x V x C	1.11 ns	2.15 ns
G x I x V x C	0.72 ns	0.79 ns

**= Significancia a 1 % de error; * = significancia a 5 % de error; ns= no significativo.

Para analizar la interacción genotipo x intervalo, el Cuadro 16 muestra que los genotipos LE-13 y LE-16 con 15 d, y el genotipo LE-14 con 10 d manifestaron la mayor altura del brote. El genotipo LE-46 no interaccionó con el intervalo, dando valores estadísticamente iguales en ambos intervalos. Por consiguiente, se infiere que para los cuatro genotipos evaluados el mejor intervalo para la inducción de brotes grandes se ubicó entre 10 d y 15 d, con base en la altura del brote, ya que el número de hojas no se alteró significativamente.



Cuadro 16. Medias de altura y número de hojas por brote por efecto significativo de la interacción genotipo x intervalo. Datos del primer experimento.

Genotipo	Intervalo (d)	Altura del brote (cm)	Repeticiones (Núm)
LE-13	10	5.5 ab	29
	15	6.1 a	20
	20	5.7 ab	20
<i>Promedio</i>		5.8 a	
LE-16	10	4.4 ab	20
	15	6.0 a	18
	20	2.2 b	15
<i>Promedio</i>		4.2 b	
LE-14	10	6.0 a	18
	15	4.2 ab	21
	20	4.2 ab	16
<i>Promedio</i>		4.8 b	
LE-46	10	4.2 ab	22
	15	4.0 ab	19
	20	5.7 ab	27
<i>Promedio</i>		4.6 b	
DSH	-	3.6	-

DSH = Diferencia mínima significativa a 5 % de error. Medias en la columna con la misma letra indican promedios iguales estadísticamente (Tukey, 0.05).

También en maíz, Li *et al.* (2002) encontraron que el intervalo para alcanzar el 100 % de explantes con actividad organogénica osciló entre 15 y 20 d, dependiendo del genotipo; una característica de sus brotes fue que al menos 50 % de sus células estaban en la fase G₁ del ciclo celular.

Con respecto a la consistencia del medio, la sólida brindó mejores resultados al compararla con la líquida en cuanto a la altura del brote (Cuadro 17), pero no hubo efecto de este factor en el número de hojas. Según Iracheta *et al.* (2003), la



consistencia semisólida y líquida con plataforma no tuvo efecto significativo en inducción de brotes. En medio líquido sin plataforma el explante no manifestó organogénesis, pero fue el medio que más favoreció la viabilidad del explante. Estos autores no examinaron el efecto del medio sólido. En tabaco la embriogénesis a partir del cultivo de anteras también se vio influenciada por la consistencia del medio de cultivo, ya que el medio sólido se relacionó con mayor mortalidad de embriones que en el medio líquido, lo cual se le atribuyó a sustancias inhibitorias o impurezas presentes en el agar (Kohlenbach y Wernicke, 1978).

Cuadro 17. Medias de la altura de los brotes por efecto de la consistencia física del medio de cultivo. Datos del primer experimento.

Consistencia	Altura del brote (cm)	Repeticiones
Líquida con plataforma	4.20 b	127
Sólida	5.70 a	118
DSH	0.86	-

DSH = diferencia mínima significativa a 5 % de error. Medias en la columna con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey, 0.05).

Los resultados de estos experimentos indicaron que la inducción de organogénesis de maíz *in vitro* resultó mejor al usar: los dos primeros explantes basales del tallo comprendido dentro del coleóptilo, medio sólido con pH de 5.8, en frascos de 250 mL que contenían 45 mL de medio de cultivo, y con un intervalo de subcultivo de 15 d. Por ello estas características constituyeron el protocolo para el establecimiento de los siguientes experimentos en este trabajo.

4.1.3. Multiplicación y alargamiento de brotes

Con el protocolo optimizado para la inducción de brotes se establecieron otros experimentos con tres genotipos, con el propósito de evaluar diversos factores que afectan la multiplicación *in vitro*, durante tres subcultivos, con base en el número



de explantes que desarrollan brotes (NEB) y el número de brotes por explante (NBE).

En esta fase no se varió la consistencia del medio multiplicación puesto que Iracheta *et al.* (2003) encontraron que en cinco de los ocho genotipos evaluados no hubo efecto significativo de la consistencia del medio de cultivo sobre la tasa de multiplicación de brotes determinada después de tres subcultivos.

El análisis de varianza del primer experimento de esta fase del trabajo reveló que el intervalo entre subcultivos fue el único factor con influencia significativa sobre el NEB (Cuadro 18). El factor genotipo y su interacción con el intervalo no tuvieron efecto significativo.

Cuadro 18. Valores de F del análisis de varianza del número de explantes con brotes, número de brotes por explante y de la tasa de multiplicación, por efecto del genotipo e intervalo entre subcultivos. Resultados del primer experimento.

Efecto	Variables con transformación de Bartlett		
	NEB	NBE	NEB x NBE
Genotipo (G)	0.86 ns	0.92 ns	0.92 ns
Intervalo (I)	4.24 *	2.43 ns	2.43 ns
G x I	1.75 ns	2.11 ns	2.11 ns

NEB= Número de explantes con brotes; NBE= Número de brotes con explantes; NEB x NBE= tasa de multiplicación; * = significancia a 5 % de error; ns= no significativo.

Mediante la prueba de medias se determinó que el mejor intervalo entre subcultivos fue el de 15 d para optimizar el número de explantes con brotes (83 %). El número de brotes por explante fue igual estadísticamente entre intervalos, el cual varió entre 0.16 a 0.50 brotes; es decir, de cada 100 explantes solamente 16 a 50 desarrollaron un brote adventicio o axilar (Cuadro 19).



Según Iracheta *et al.* (2003), la multiplicación de brotes *in vitro* se debe en mayor medida al desarrollo de brotes axilares que al desarrollo de brotes adventicios a partir de células de la corteza del tallo de los explantes.

Li *et al.* (2002) reportaron que en maíz la producción de brotes por explante se relaciona con la altura de las plántulas donadoras, pues una altura de 5 cm fue la idónea para la inducción de brotes durante un intervalo de 28 d. Consideraron como brote a las estructuras con hojas de al menos 2 cm de longitud. También observaron que al menos 50 % de las células del meristemo apical de estas plántulas estaban en la fase G1 del ciclo de división celular, lo cual estuvo relacionado con su mayor capacidad organogénica. En el trabajo de este tema, las plántulas donadoras tenían mayor altura y, por consiguiente, se puede inferir que por ello presentaron menor capacidad organogénica.

Cuadro 19. Medias del número de explantes con brotes por efecto significativo del intervalo entre subcultivos, y del número de brotes por explante. Con datos del primer experimento.

Intervalo (d)	NEB (Transformación de Bartlett)	Valores no transformados		Repeticiones
		NEB (Frecuencia relativa)	NBE (Núm)	
10	1.109 ab	0.77	0.176	85
15	1.141 a	0.83	0.500	53
20	1.039 b	0.64	0.169	56
DSH	0.093	-	-	

NEB= Número de explantes con brotes; NBE= Número de brotes con explantes; DSH = diferencia mínima significativa a 5 % de error. Medias en la columna con la misma letra indican promedios iguales estadísticamente (Tukey, 0.05).

Por otro lado, Sticklen y Oraby (2005) indicaron que el desarrollo de brotes adventicios y axilares está en función de la concentración de bencilaminopurina (BAP) y de 2,4-D en el medio de cultivo; de esta manera, en concentraciones bajas de BAP (2.2 a 4.4 mM) se promueve una mayor frecuencia de brotes axilares mientras que la combinación de alta concentración de BAP (8.8 a 17.6 mM) con



baja cantidad de 2,4-D (2.25 mM) promueve mayor abundancia de brotes adventicios.

En este trabajo no se consideró variar las concentraciones de las fitohormonas puesto que se partió de las concentraciones óptimas determinadas por Iracheta *et al.* (2003). En consecuencia, es más probable que la edad de las plántulas aquí usadas haya influido en la multiplicación. En adición, se observó que después de tres subcultivos, los brotes multiplicados desarrollaron varias estructuras morfológicamente distintas (Cuadro 20).

Cuadro 20. Respuestas organogénicas de los brotes después de tres subcultivos de multiplicación. Evaluación de tres genotipos del primer experimento.

Intervalo (d)	Respuestas organogénicas de los brotes (%)	
	Vegetativos	Reproductivos
10	68.8	31.3
15	69.1	30.9
20	50.0	50.0

Se distinguieron dos tipos de estructuras: los brotes vegetativos que formaron solamente hojas (Figura 15), y los reproductivos que diferenciaron jilotes con estigmas y ovarios, y algunos brotes sólo produjeron raíces (Figura 16). En los intervalos de 10 d y 15 d se presentó alta frecuencia de explantes con brotes vegetativos y baja frecuencia de explantes con brotes reproductivos. Con los subcultivos hechos cada 20 d se observó mayor frecuencia de explantes con brotes reproductivos.

Similarmente, Iracheta *et al.* (2003) reportaron la expresión de inflorescencias femeninas durante la multiplicación de brotes mediante la vía organogénica. También Zhong *et al.* (1992) reportaron la diferenciación de estructuras reproductivas femeninas en brotes durante la fase de multiplicación, pues después de cuatro subcultivos (espaciados cada 28 d) se diferenció un jilote en extremo apical del brote, y una vez que enraizaron se trasplantaron en



invernadero donde se desarrollaron como plantas anormales (mostraron la mutación denominada “mazorca apical”). También Pérez *et al.* (1993b) indicaron que las plantas regeneradas a través de embriogénesis somática mostraron anomalías morfológicas, como achaparramiento, ahijamiento y ausencia de espigas.

Otros investigadores han señalado que el desarrollo de estructuras reproductivas en los brotes de maíz depende del tiempo de cultivo en presencia de citocininas; es decir, a menor tiempo de exposición del explante a las citocininas el porcentaje de estructuras reproductivas disminuye, y viceversa. El uso de un periodo de inducción de 14 d fue suficiente para detectar expresión de estructuras reproductivas (Li *et al.*, 2002). En el presente estudio se verificó que con subcultivos de 10 d se desarrollaron brotes vegetativos en mayor frecuencia, en comparación con los reproductivos.

Sticklen y Oraby (2005) consideraron que el meristemo apical del vástago del maíz cultivado *in vitro* es morfológicamente sensible, ya que los brotes desarrollados pueden convertirse en estructuras reproductivas, o los explantes derivados de estructuras reproductivas pueden originar brotes vegetativos. Esto explica en parte, la presencia tanto de brotes reproductivos como vegetativos en la fase de multiplicación establecida en este estudio.

En este trabajo también se registró la muerte de brotes vegetativos y reproductivos durante los tres subcultivos de multiplicación (Cuadro 21). Al considerar el número inicial de brotes del primer subcultivo como 100 %, se observaron cambios en sobrevivencia en los subcultivos subsecuentes. El porcentaje de brotes vivos alcanzó un valor máximo del primero al segundo subcultivo, y luego disminuyó del segundo al tercero. El incremento en la sobrevivencia estuvo relacionado con la proliferación de brotes en los explantes, mientras que la disminución se debió a la mortalidad. Sólo en el intervalo de 15 d hubo una ganancia de 26.3 % en sobrevivencia al final de los subcultivos.





Figura 15. Brotes vegetativos de maíces, caracterizados por el desarrollo de hojas. A) Brotes normales y B) Brotes con hojas vitrificadas y blanquecinas.



Figura 16. Organogénesis de estructuras reproductivas en brotes durante la fase de multiplicación. A) Explante con numerosos brotes vegetativos; B) Emisión de estructuras blanquecinas sin hojas; C) Estructuras que se observan una vez que se eliminan las hojas de los brotes; D) Estructura similar a jilotes con estilo-estigmas; E) Desarrollo avanzado de ovarios y estilos del jilote; F) Pares de espiguillas dispuestas en el jilote.

Cuadro 21. Porcentaje de brotes vivos durante tres subcultivos consecutivos hechos a diferentes intervalos de tiempo. Evaluación de tres genotipos del primer experimento.

Intervalo (d)	Proporción de brotes vivos por ciclo de subcultivo (%)		
	Subcultivo 1	Subcultivo 2	Subcultivo 3
10	100	+ 5.41	-16.22
15	100	+73.68	+26.32
20	100	+73.33	- 3.33

Los datos de los Cuadros 20 y 21 no se analizaron estadísticamente porque sólo se obtuvo un valor porcentual por cada tratamiento en el primer experimento, sin haber repeticiones que permitieran hacer el análisis de varianza. Pero, la notoria ventaja de los subcultivos hechos cada 15 d en el número de explantes con brotes y su sobrevivencia (Cuadros 19 y 21), indujo a hacer un segundo experimento en el que se compararon cuatro genotipos para caracterizar morfológicamente los brotes subcultivándolos en tres ocasiones.

Con este segundo experimento resultó evidente que la altura y el número de hojas por brote guardan correlación positiva entre sí, y que los brotes más altos y con más hojas no necesariamente tuvieron la mayor biomasa (Cuadro 22, Figura 17). Posiblemente esto se deba a que existieron brotes que no desarrollaron hojas y mantuvieron una altura menor a 3 cm, los cuales se consideraron en la determinación de biomasa.

Cuadro 22. Características morfológicas de brotes obtenidos por tres subcultivos hechos cada 15 d. Valores del segundo experimento.

Genotipo	Altura (cm)	Brotes (Núm)	Hojas (Núm)	Brotes (Núm)	Peso por brote (g)	Brotes (Núm)
LE-13	10.63±0.47	82	13.70±1.05	81	3.13±0.23	118
LE-14	9.63±0.63	48	10.58±1.28	48	4.14±0.34	83
LE-46	7.70±0.32	97	7.76±0.85	97	5.05±0.35	120
LE-16	5.79±0.40	82	2.68±0.62	79	5.00±0.39	107

± Error estándar



No obstante, se identificaron dos grupos de genotipos: LE-13 y LE-14 fueron los más altos, con más hojas y menos peso, mientras que LE-16 y LE-46 resultaron compactos y de mayor peso. Iracheta *et al.* (2003) también observaron que el genotipo LE-13 mostró mayor altura de brotes que el LE-16.

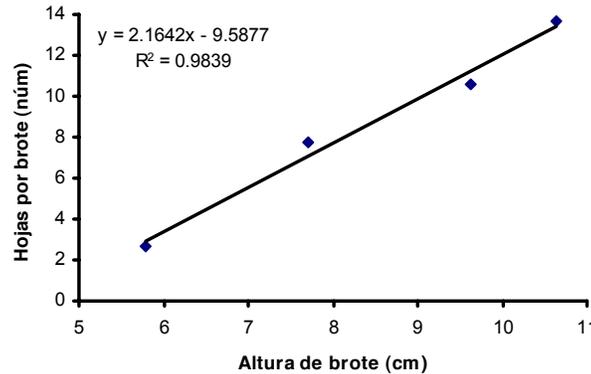


Figura 17. Relación entre el número de hojas y altura de brote, medidos después de tres subcultivos de multiplicación hechos cada 15 d.

4.2. ETAPA II. Selección *in vitro* de brotes durante la multiplicación bajo estrés osmótico

Algunos autores sostienen que los embriones inmaduros de maíz son los más usados como explantes para la obtención de callo embriogénico, ya que otros tejidos tienen una baja o nula frecuencia de regeneración de plantas o alta influencia del genotipo (Earle y Kuehnle, 1990; Abumhadi *et al.*, 2005).

También se ha señalado (Li *et al.*, 2002; Abumhadi *et al.*, 2005; Sticklen y Oraby, 2005) que un sistema eficiente de cultivo *in vitro* de tejidos con fines de mejoramiento genético debe ser independiente del genotipo; estos autores afirman que el uso de embriones inmaduros de maíz para la inducción de callo tipo II (friable y embriogénico) es altamente dependiente del genotipo, manifiesta variación somaclonal en las plantas regeneradas, y que la producción de callos requiere considerables recursos y esfuerzo para mantener las plantas donadoras. Una alternativa consiste en usar el meristemo apical como explante, obtenido de



plántulas cultivadas *in vitro*, ya que la regeneración es menos dependiente del genotipo, y el meristemo es un explante óptimo para la transformación genética del maíz. Con este tipo de explante se han evaluado algunas vías de multiplicación *in vitro* de maíz: la organogénesis directa e indirecta y la embriogénesis (Zhong *et al.*, 1992).

En este contexto, en esta fase del trabajo se indujo organogénesis directa de cuatro líneas de maíz a partir de secciones del coleóptilo como explantes, y luego se hizo selección *in vitro* de brotes por tolerancia al estrés osmótico simulado con PEG disuelto en el medio de cultivo.

4.2.1. Caracterización morfológica de brotes seleccionados *in vitro* en varios niveles de estrés osmótico

Se establecieron dos experimentos con el protocolo optimizado durante la inducción y la multiplicación de brotes. En esta última fase se hicieron tres ciclos de selección *in vitro* en varios niveles de estrés osmótico (0, 10, 15 y 20 % de PEG) en medio líquido. En el primer experimento se cuantificaron características morfológicas de los brotes (altura, número de hojas y biomasa fresca) del primer y tercer ciclo de selección.

Se descubrió que el factor genotipo tuvo efecto significativo sobre las características morfológicas del brote, mientras que el estrés osmótico sólo tuvo influencia en la biomasa. Los ciclos de selección produjeron diferencias en altura y peso fresco por brote (Cuadro 23).

La interacción genotipo x PEG influyó sobre la altura y número de hojas, la interacción genotipo x ciclo en el número de hojas y el peso, mientras que la interacción PEG x ciclo sólo tuvo impacto en la biomasa por brote. La interacción genotipo x PEG x ciclo no fue significativa para ninguna característica.



Cuadro 23. Valores de F del análisis de varianza de características morfológicas de los brotes, por efecto del genotipo, del estrés osmótico con PEG y del ciclo de selección. Datos del primer experimento.

Factor	Valores de F del Análisis de Varianza		
	Altura (cm)	Hojas (Núm)	Peso fresco (g)
Genotipo (G)	53.59 **	36.85 **	6.66 **
PEG (P)	0.41 ns	1.17 ns	5.75 **
Ciclo (C)	12.84 **	1.05 ns	41.38 **
G x P	2.38 *	2.77 **	1.24 ns
G x C	1.68 ns	8.06 **	4.95 **
P x C	2.12 ns	1.24 ns	4.55 **
G x P x C	1.26 ns	1.06 ns	1.31 ns

**= Significancia a 1 % de error; * = significancia a 5 % de error; ns= no significativo

Genotipo y la interacción genotipo x PEG

Los cuatro genotipos presentaron el siguiente gradiente significativo ($P \leq 0.05$) en altura de brote y número de hojas: LE-13 = LE-14 > LE-46 = LE-16 (Cuadro 24). En LE-46 la altura y el número de hojas del brote aumentaron en 10 % con el tratamiento de 20 % de PEG, en comparación con el testigo sin PEG. Lo contrario ocurrió en LE-16 en el que la altura se redujo con 20 % PEG en comparación con el testigo, pero aumentó en número de hojas. Sin embargo, en LE-13 y LE-14 la altura y el número de hojas no cambiaron por efecto del estrés osmótico, en relación con el testigo.

En ningún genotipo, el peso fresco por brote resultó afectado por el mayor nivel de estrés osmótico (20 % de PEG). Solamente los brotes de LE-16 tuvieron mayor peso con 10 y 15 % de PEG.



Cuadro 24. Medias de las características morfológicas de brotes vivos por efecto de la interacción genotipo x PEG. Datos del primer experimento.

Genotipo	PEG (%)	Altura (cm)	Hojas (Núm)	Peso fresco (g)
LE-13	0	12.9 a	9.6 ab	3.2 ab
	10	11.4 ab	8.3 abcd	3.3 ab
	15	11.1 ab	9.2 ab	3.0 ab
	20	11.6 ab	9.2 ab	2.8 ab
LE-14	0	10.2 ab	9.3 ab	3.4 ab
	10	11.3 ab	8.4 abcd	5.0 a
	15	12.1 ab	8.8 abc	3.8 ab
	20	11.0 ab	10.7 ab	3.2 ab
LE-16	0	6.2 de	4.0 def	2.5 ab
	10	6.3 de	2.2 f	3.5 ab
	15	6.8 cde	4.2 def	3.9 ab
	20	5.7 e	4.6 ef	2.4 ab
LE-46	0	6.7 cde	6.6 bcde	3.2 ab
	10	9.1 bcd	11.3 a	4.9 a
	15	9.5 bc	8.4 abcd	3.4 ab
	20	9.4 bc	8.8 abc	3.7 ab
DSH		3.0	4.2	2.3

DSH = diferencia mínima significativa a 5 % de error. Medias en la columna con la misma letra indican promedios iguales estadísticamente (Tukey 0.05).

Los resultados destacan que las únicas diferencias obtenidas fueron causadas por efecto del genotipo. En cambio, Brown *et al.* (1979), al evaluar segmentos de tallo de *Nicotiana tabacum* como explantes, para organogénesis indirecta en respuesta al estrés osmótico causado por sacarosa, observaron que el peso fresco y seco por callo, así como el número de brotes producidos presentaron una mayor expresión con cierto nivel de estrés osmótico, que en el testigo sin estrés. Similarmente, los brotes de jitomate cultivados en medio sólido con 35 mM de cloruro de sodio presentaron mayor biomasa que los brotes cultivados sin sal o con respecto a otras concentraciones mayores (Cano *et al.*, 1998). También Van der Weele *et al.* (2000) reportaron que la biomasa de la raíz de plántulas de *Arabidopsis* presentó una cinética parabólica conforme aumentó el estrés osmótico, pero la biomasa del vástago disminuyó linealmente.



La respuesta de la biomasa de callos de *Helianthus annuus* dependió del grado de tolerancia de sus células, puesto que el peso fresco del clon sensible a la salinidad disminuyó conforme aumentó la concentración de sal (de 0 hasta 300 mM), mientras que los clones tolerantes incrementaron su biomasa hasta alcanzar un valor máximo entre 50 y 100 mM para después disminuir (Santos *et al.*, 2000). Estos resultados confirman que la interacción del genotipo x nivel de estrés tiene un efecto relevante en el peso fresco del callo. Sin embargo, en este estudio la biomasa del brote fue poco alterada por efecto de la interacción genotipo x nivel de PEG.

Interacción genotipo x ciclo

Los genotipos LE-13 y LE-14 no cambiaron su número de hojas después de tres ciclos de selección *in vitro* aunque, la altura por brote disminuyó y el peso aumentó significativamente (Cuadro 25). El genotipo LE-16 tuvo menos hojas que los otros tres genotipos, y no cambió su altura ni su peso a través de los ciclos, mientras que LE-46 aumentó su peso sin cambiar su número de hojas ni la altura del brote. Por sus características morfológicas sobresalieron los genotipos LE-13 y LE-14 después de la selección *in vitro*.

Cuadro 25. Medias de las características morfológicas de los brotes por efecto de la interacción genotipo x ciclo de selección. Datos de un primer experimento.

Genotipo	Ciclo	Altura del brote (cm)	Hojas (Núm)	Peso fresco (g)
LE-13	1	12.6 a	9.5 a	2.5 c
	3	11.2 ab	8.8 a	3.7 bc
LE-14	1	11.7 ab	8.7 a	3.1 c
	3	9.9 bc	10.8 a	4.8 ab
LE-16	1	6.6 d	5.6 b	2.9 c
	3	5.8 d	1.7 c	3.2 c
LE-46	1	8.9 c	8.3 a	2.8 c
	3	8.9 c	9.8 a	5.3 a
DSH		1.9	2.7	1.4

DSH = diferencia mínima significativa a 5 % de error. Medias en la columna con la misma letra indican promedios iguales estadísticamente (Tukey, 0.05).



También Maiti *et al.* (1996) detectaron variación entre genotipos de maíz en respuesta a estrés por sequía y salinidad, pues algunos fueron tolerantes solamente a la sequía, otros a la salinidad y algunos toleraron ambos tipos de estrés.

Lupotto *et al.* (1989) reportaron que al hacer selección *in vitro* de callos de maíz por tolerancia al cloruro de sodio adicionado al medio de cultivo sólido (de 0 hasta 300 mM) a lo largo de tres subcultivos, el peso del callo disminuyó conforme aumentó la salinidad pero los callos tolerantes tuvieron mayor crecimiento que el testigo; las plántulas regeneradas se cultivaron y las semillas F₂ se evaluaron durante su germinación en presencia de sales, y se descubrió que algunas plántulas mantuvieron su tolerancia *ex vitro*. En otra investigación se compararon los callos embriogénicos cultivados en medio sólido, derivados de líneas tolerante y sensible a la salinidad, y la línea tolerante resultó con mayor contenido de espermidina, mayor actividad de la enzima arginina descarboxilasa y la mas baja actividad de la enzima ornitina descarboxilasa; en todos los genotipos hubo disminución del crecimiento del callo conforme incrementó el contenido de sal pero, la línea tolerante presentó la menor disminución (Willadino *et al.*, 1996). También se han detectado diferencias genotípicas en *Eleusine coracana* a tolerancia al estrés osmótico por PEG, cuyas raíces sintetizaron proteínas desde 23 a 72 kDa (Uma *et al.*, 1995).

Interacción PEG x ciclo de selección

El vigor de los brotes cultivados *in vitro* no resultó afectado por el ciclo de selección, ya que no hubo diferencias estadísticas entre el primer y el tercer ciclo, en los cuatro niveles de estrés osmótico inducido por PEG (0, 10, 15 y 20 %), cuando el vigor se midió en altura y número de hojas del brote (Cuadro 26). El peso fresco resultó reducido solamente en el tercer subcultivo en 20 % de PEG.

En callos de papa cultivados en varios niveles de salinidad durante 10 subcultivos, se encontró que la variación disminuyó conforme avanzaron los subcultivos, y que en el peso de callos en cada nivel de salinidad cambió a medida



que aumentaron los subcultivos (Ochatt *et al.*, 1999); es decir, en papa hubo interacción importante entre el nivel de estrés y el ciclo de subcultivo.

Cuadro 26. Medias de las características morfológicas por brote dado el efecto de la interacción PEG x ciclo de selección. Datos de un primer experimento.

PEG (%)	Ciclo	Altura del brote (cm)	Hojas (Núm)	Peso fresco (g)
0	1	8.6 ab	7.4	2.3 d
	3	10.5 a	8.4	3.1 bcd
10	1	9.9 ab	7.5	4.1 b
	3	8.8 ab	7.0	4.0 bc
15	1	10.1 ab	8.1	3.1 bcd
	3	10.0 ab	8.6	2.6 cd
20	1	8.8 ab	7.7	5.7 a
	3	8.4 b	8.4	3.6 bcd
DSH		2.1	2.8 ns	1.3

DSH = diferencia mínima significativa a 5 % de error; ns= no significativo. Medias en la columna con la misma letra indican promedios iguales estadísticamente (Tukey, 0.05).

Juárez y Carrillo (2003) mostraron que la biomasa de callos de caña de azúcar se redujo con respecto al testigo, por efecto de cloruro de sodio, de manera que, en el tercer subcultivo registraron la mayor reducción en las mayores concentraciones de la sal (1 y 1.2%); éste resultado evidencia el efecto de la interacción del nivel de estrés salino con el ciclo de subcultivo. Por su parte, Mercado *et al.* (2000) cultivaron brotes de *Lycopersicon esculentum* en diferentes niveles de salinidad, y encontraron que en el cuarto subcultivo hubo disminución en longitud y número de hojas por brote al aumentar la salinidad, con respecto al testigo sin sal.

En *Atriplex halimus* el estrés hídrico tuvo un efecto negativo en la altura y biomasa de las plantas, pero sin disminuir el número de hojas (Martínez *et al.*, 2004); esto señaló que la diferenciación celular es más tolerante a la deshidratación que el crecimiento celular.

En el presente trabajo fue evidente la diferencia entre genotipos en respuesta a los niveles de estrés inducido con PEG durante tres ciclos sucesivos de selección *in vitro*. Las líneas LE-13 y LE-14 fueron las más sobresalientes en sus



características morfológicas bajo condiciones de estrés osmótico. En condiciones de campo y con base al rendimiento por hectárea y a su índice de tolerancia a la sequía, Zarco *et al.* (2005) determinaron que las mejores líneas fueron LE-14 y LE-16, mientras que LE-13 fue la inferior.

De estos trabajos se infiere que la disminución del peso por efecto del estrés osmótico depende del genotipo, y que hay una asociación de la tolerancia con el mantenimiento del crecimiento.

La variación morfológica que presentaron los brotes durante el proceso de selección *in vitro* bajo estrés osmótico, se ilustra en la figura 18; en esta figura se aprecian brotes reproductivos y vegetativos, así como el efecto del estrés en la senescencia foliar.





Figura 18. Variación morfológica y senescencia foliar en brotes crecidos en condiciones de estrés osmótico durante su multiplicación *in vitro*. (A y B) Brotes reproductivos; (C y D) Brotes vegetativos; (E y F) Brotes vegetativos con senescencia foliar.

4.2.2. Caracterización fisiológica de brotes seleccionados *in vitro* bajo estrés osmótico

Se ha corroborado que el estrés osmótico causado por PEG y el estrés osmótico iónico provocado por cloruro de sodio producen diferente efecto en las plantas, a nivel de expresión génica (Ueda *et al.*, 2004) y a nivel fisiológico (Nagy y Galiba, 1995), pero también tienen efectos comunes.

4.2.2.1 Contenido relativo de agua en brotes del tercer ciclo de selección

Con base en las condiciones óptimas para inducción y multiplicación de brotes, antes determinados, se estableció un segundo experimento de selección *in vitro* bajo estrés osmótico en el que se midieron variables fisiológicas como contenido relativo de agua por brote, a partir del peso fresco y seco.

Según los análisis de varianza del peso y contenido de agua en los brotes, después de tres ciclos de selección (Cuadro 27) tales variables fisiológicas no se afectaron significativamente por la acción de la interacción genotipo x PEG, aunque el peso fresco varió significativamente entre genotipos y entre niveles de estrés osmótico, y el peso seco sólo cambió por efecto del genotipo. El contenido relativo de agua dependió únicamente del nivel de estrés osmótico.

Cuadro 27. Valores de F del análisis de varianza de la acumulación de biomasa y de agua en brotes de genotipos seleccionados *in vitro* por tres ciclos bajo estrés osmótico. Datos del segundo experimento.

Factor	Peso (g)		Contenido relativo de agua	
	Fresco	Seco	Valores angulares	%
Genotipo (G)	9.64 **	7.16 **	0.43 ns	0.35
PEG	5.16 **	0.24 ns	7.95 **	6.79
G x PEG	1.04 ns	0.54 ns	0.70 ns	0.76

**= Significancia a 1 % de error: ns= no significativo.



Entre los genotipos, LE-16 y LE-14 tuvieron los valores más altos en peso (fresco y seco) por brote, mientras que su contenido relativo de agua no cambió y sólo varió entre 84.1 % y 86.8 %, como se muestra en el Cuadro 28.

Cuadro 28. Acumulación de biomasa y contenido de agua de brotes del tercer ciclo de selección. Datos del segundo experimento.

Genotipo	Peso (g)		Contenido relativo de agua (%)
	Fresco	Seco	
LE-16	4.648 a	0.523 ab	86.8
LE-14	4.402 a	0.587 a	86.0
LE-13	1.961 b	0.283 c	84.1
LE-46	2.897 b	0.345 c	84.1
DSH	1.461	0.197	5.7 ns

DSH = diferencia mínima significativa a 5 % de error. Medias en la columna con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey, 0.05), ns = no significativo.

Al analizar el efecto del estrés osmótico inducido por PEG, se encontró que el peso seco no cambió significativamente al aumentar el estrés osmótico, pero la biomasa fresca sí se redujo (Figura 19); el estrés osmótico también causó disminución del contenido de agua por brote.



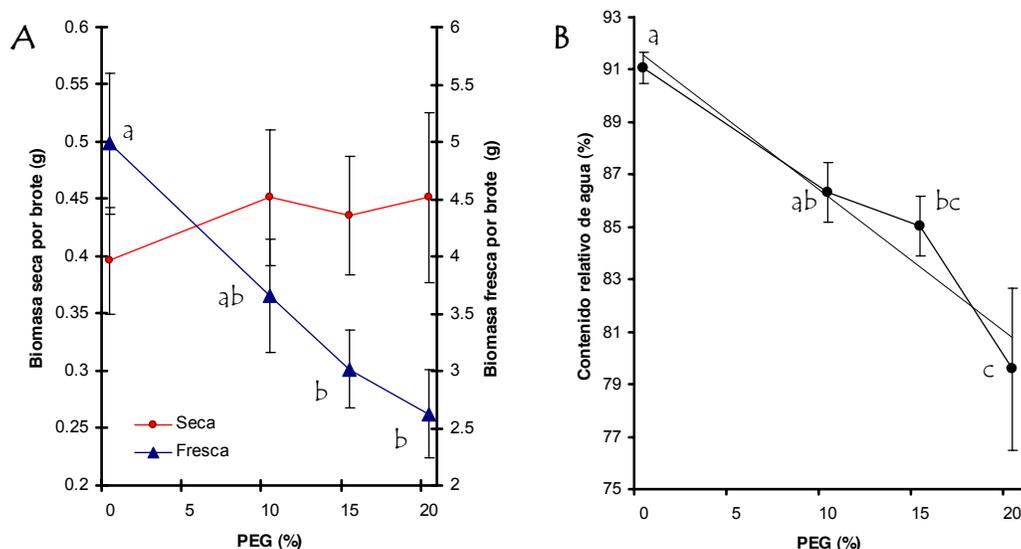


Figura 19. A) Cambios en la acumulación de biomasa y B) Contenido de agua por brote en función del nivel de estrés osmótico del medio de cultivo, después de tres ciclos de selección. Las barras verticales en las líneas corresponden a los errores estándares. Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

Otros investigadores han reportado efectos negativos del estrés osmótico en la acumulación de biomasa fresca en tejidos cultivados *in vitro*, asociados con acumulación de prolina y alteración del transporte de agua.

En cultivo de células *in vitro* de *Glycyrrhiza uralensis* crecidas en medio líquido con 10 % de PEG-8000, el contenido relativo de agua y el peso fresco disminuyeron, mientras que el contenido de malonil dialdehído incrementó significativamente (Ming *et al.*, 2003). Similares resultados se reportaron en callos de arroz cultivados *in vitro* en medio líquido conteniendo PEG-8000 (de 0 hasta 30 g L⁻¹), donde el peso fresco, la tasa relativa de crecimiento y el contenido relativo de agua en los callos disminuyeron; por el contrario, el contenido de prolina aumentó progresivamente y mostró una relación negativa con el contenido de agua (Al-Bahrany, 2002). Lutts *et al.* (1996) reportaron datos similares en callos de arroz, en cuanto a la tasa relativa de crecimiento y contenido de prolina, al evaluar varios tipos de sales y manitol como agentes osmóticos; además,



encontraron efectos significativos del genotipo, agente estresante y de la duración e intensidad del estrés, sobre el contenido de prolina y potencial osmótico del callo.

Errabii *et al.* (2006) observaron disminución progresiva de la tasa relativa de crecimiento, contenido de agua, y de las concentraciones de potasio y calcio, junto con un aumento en la concentración de prolina, en callos de caña de azúcar cultivados durante un mes bajo estrés osmótico (hasta 1.08 MPa) usando manitol como osmolito. En contraste, al cultivar células de *Populus euphratica* bajo estrés osmótico con PEG-6000, Gu *et al.* (2004) detectaron la mayor tasa de crecimiento en la concentración de 15 %, en comparación con los de 0 % y 25 %.

Al cultivar callos de sorgo bajo estrés osmótico con PEG-8000 disuelto en medio líquido en concentraciones de 0 hasta 25 %, Bhaskaran *et al.* (1985) lograron reducir el potencial hídrico del medio hasta -16.2 bar con la mayor concentración de PEG, se aumentó el contenido de prolina y se redujo drásticamente el peso fresco del callo, mientras que el peso seco fue más estable. Estos mismos autores observaron que el contenido de carbohidratos presentó variaciones conforme disminuyó el potencial hídrico, pero sin tener alguna relación con el estrés osmótico (Newton *et al.*, 1986).

Al cultivar las células de tabaco *in vitro* con varios agentes osmóticos (manitol, sorbitol y PEG-8000), Reisen *et al.* (2005) observaron que el número de vacuolas permaneció constante, pero la superficie del tonoplasto aumentó y presentó una forma plegada por efecto de manitol y sorbitol. Con tales cambios se infirió que el transporte de agua con iones se optimizó entre el citosol y la vacuola. En contraste, con PEG (10 %) se formaron estructuras esféricas y vesículas de forma tubular hacia el interior de la vacuola, por lo que había mayor cantidad de acuaporinas con respecto al tonoplasto normal y habría mayor intercambio de agua o un ajuste osmótico más rápido. Además, se encontró una correlación entre la fluorescencia del tonoplasto en condiciones de estrés con la cantidad de proteínas. En maíz se ha demostrado que las acuaporinas abundan en las



vacuolas de las células meristemáticas ubicadas en la punta de raíces, primordios foliares e inflorescencias en desarrollo (Chaumont *et al.*, 1998). Estas investigaciones evidencian a los mecanismos metabólicos que se activan en el tejido sometido a estrés osmótico mediante PEG.

4.2.2.2. Potencial hídrico y sus componentes

Al evaluar los cambios del estado hídrico de los brotes después de tres ciclos de selección bajo estrés osmótico, se encontró que el PEG y la interacción genotipo x PEG tuvieron efecto significativo sobre el potencial osmótico, el potencial hídrico del tejido foliar y sobre el ajuste osmótico total, pero no tuvieron efecto sobre el potencial de presión (Cuadro 29). El genotipo sólo tuvo influencia significativa sobre el ajuste osmótico total.

Los promedios de la interacción genotipo x PEG para potencial hídrico y sus componentes se muestran en el Cuadro 30. El potencial de presión de turgencia del tejido osciló entre 3.4 y 11.1 bar, pero sin diferencias significativas. Los potenciales hídrico y osmótico variaron significativamente entre genotipos dentro de cada nivel de PEG.

Cuadro 29. Valores de F del análisis de varianza del potencial hídrico, sus componentes y el ajuste osmótico total en brotes seleccionados *in vitro* bajo estrés osmótico. Valores del segundo experimento.

Factor	Potencial (bar)			Ajuste osmótico total (bar)
	Hídrico	Presión de turgencia	Osmótico	
Genotipo (G)	1.27 ns	1.04 ns	1.75 ns	7.79 **
PEG	36.46 **	2.13 ns	41.38 **	10.98 **
G x PEG	2.64 **	1.85 ns	2.85 **	2.48 *

**= Significancia a 1 % de error; * = significancia a 5 % de error; ns= no significativo.



Cuadro 30. Medias del potencial hídrico y sus componentes en el tejido foliar de brotes seleccionados en función de la interacción genotipo x PEG. Resultados de un segundo experimento.

PEG (%)	Genotipo	Potencial (bar)				
		Hídrico		Osmótico	Presión de turgencia	
0	LE-13	-5.1	a	-8.6	a	3.5
	LE-14	-5.6	ab	-12.8	ab	7.1
	LE-16	-4.4	a	-8.9	a	4.5
	LE-46	-6.2	ab	-11.7	ab	5.5
10	LE-13	-10.4	abc	-17.8	abc	7.4
	LE-14	-12.7	abcd	-17.3	ab	4.6
	LE-16	-11.7	abc	-20.4	bcd	8.7
	LE-46	-15.2	bcde	-21.0	bcd	5.9
15	LE-13	-17.4	cde	-28.5	cd	11.1
	LE-14	-14.2	abcde	-20.8	bcd	6.6
	LE-16	-12.5	abcd	-20.2	bcd	7.7
	LE-46	-14.1	abcde	-18.2	abc	4.1
20	LE-13	-23.1	e	-31.0	d	7.9
	LE-14	-23.9	e	-29.5	d	5.6
	LE-16	-21.6	de	-30.0	d	8.5
	LE-46	-14.0	abcd	-22.0	bcd	8.0
DSH		10.0		11.1		7.9 ns

DSH = diferencia mínima significativa a 5 % de error; ns= no significativo. Medias en la columna con la misma letra indican promedios iguales estadísticamente (Tukey 0.05).

Una ilustración gráfica de los datos del potencial hídrico y sus componentes se muestra en la Figura 20, donde es evidente que el potencial osmótico de los brotes del genotipo LE-13 descendió progresivamente hasta -30.1 bar conforme se incrementó el nivel de PEG. El genotipo LE-14 presentó valores iguales estadísticamente (-12.7 bar a 17.2 bar) entre 0 y 10 % de PEG, para después descender con mayor concentración del agente osmótico. El genotipo LE-16 mostró valores estadísticamente iguales entre 10 y 15 % de PEG, en el rango de -20.1 a -20.4 bar, para luego descender al incrementarse el estrés (-30 bar). De todos los genotipos, LE-46 fue el que mostró menor disminución en el potencial osmótico con 20 % de PEG (-22 bar).



La Figura 20 también muestra que el potencial hídrico del tejido foliar de los genotipos LE-13, LE-14 y LE-16 mostraron un descenso progresivo conforme aumentó la concentración de PEG, mientras que el genotipo LE-46 mostró una dinámica diferente de manera que la diferencia entre el testigo y el nivel de 20 % de PEG fue la menor (-7.8 bar). Estos resultados evidencian que existe variación de respuesta entre genotipos bajo condiciones de estrés *in vitro*.

Ming *et al.* (2003) cultivaron células de *Glycyrrhiza uralensis* en medio de cultivo líquido con PEG-8000, y encontraron que el potencial osmótico disminuyó a través del tiempo y alcanzó su mayor decremento a los 7 d (-1.9 MPa) y luego se recuperó ligeramente (a -1.6 MPa) a los 10 d; en esta condición las células presentaron mayor actividad de las enzimas catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa, lo que indica que el estrés osmótico provocó estrés oxidativo.

En forma semejante, Santos y Ochoa (1994) determinaron en clones celulares de chile cultivados con 20 y 25% de PEG, que el potencial osmótico disminuyó entre -1.2 MPa y -2.2 MPa, dependiendo del clon; a los 18 d las células tolerantes al estrés osmótico acumularon más sodio, potasio, prolina y glicina betaína, que las células no seleccionadas. Por su parte Ben (1987), en clones celulares de dos especies de cítricos sometidos a estrés inducido con PEG (PM. de 6000-8000), encontró que el peso fresco disminuyó progresivamente conforme se abatió el potencial osmótico del medio de cultivo (de -0.4 hasta -1.0 MPa), con efectos más severos en las células susceptibles (no seleccionadas), con magnitudes diferentes entre las dos especies.

En *Olea europea*, el estrés salino y osmótico inducido en el medio de cultivo con cloruro de sodio y sorbitol, redujo el potencial osmótico de brotes, callos y células en suspensión; en los brotes el estrés redujo la producción de biomasa y la capacidad de enraizamiento cuando las concentraciones fueron mayores que 75 mM (Shibli y Juboory, 2002).



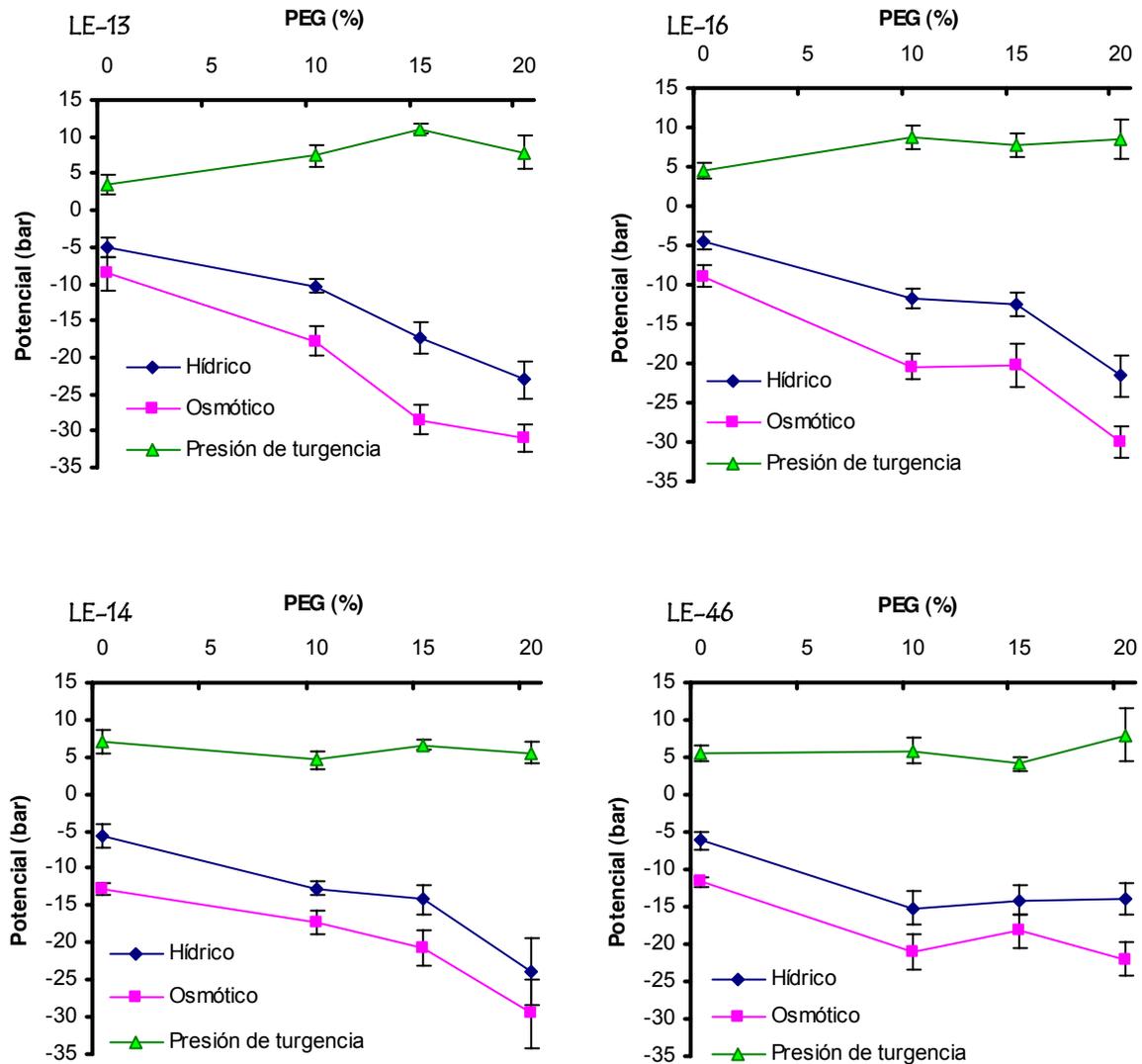


Figura 20. Potencial hídrico del tejido foliar de brotes de cuatro genotipos de maíz seleccionados durante tres ciclos *in vitro*, en respuesta a los niveles de PEG.

Las plántulas de aguacate cultivadas *in vitro* en medio sólido en presencia de cloruro de sodio y cloruro de calcio, redujeron sus potenciales hídrico y osmótico conforme se incrementó la concentración de las sales; en el tallo el potencial hídrico fue de -15 bar con la máxima concentración de sales (1%), mientras que en la raíz fue de -5 bar; luego, con el tiempo el potencial osmótico del tallo disminuyó hasta -22 bar y en la raíz hasta -10 bar, pero el potencial de presión no se afectó significativamente (González *et al.*, 2003). En un estudio con *Atriplex halimus*, en



el que se usó únicamente cloruro de calcio en el medio de cultivo (de 0% a 20%), se observó una disminución lineal del potencial hídrico de -1.4 MPa a -32 MPa. (Nedjimi *et al.*, 2006); similar tendencia la presentó el potencial hídrico en callo de *Brassica napus* conforme se incrementó la concentración de manitol en el medio de cultivo de 0 a 450 mM (Chadler y Thorpe, 1987).

En el presente estudio se encontró que el potencial hídrico del medio de cultivo descendió conforme incrementó la concentración de PEG (Figura 21), lo que demuestra que el potencial del medio de cultivo está correlacionado con el potencial hídrico y osmótico del tejido cultivado (Chadler y Thorpe, 1987), aunque no se haya reducido el potencial de turgencia.

Los potenciales hídrico y osmótico de los brotes decrecieron conforme se redujo el contenido relativo de agua de los brotes (Figura 22), lo que indica que estos fueron perdiendo la capacidad de absorber agua al aumentar el nivel de estrés.

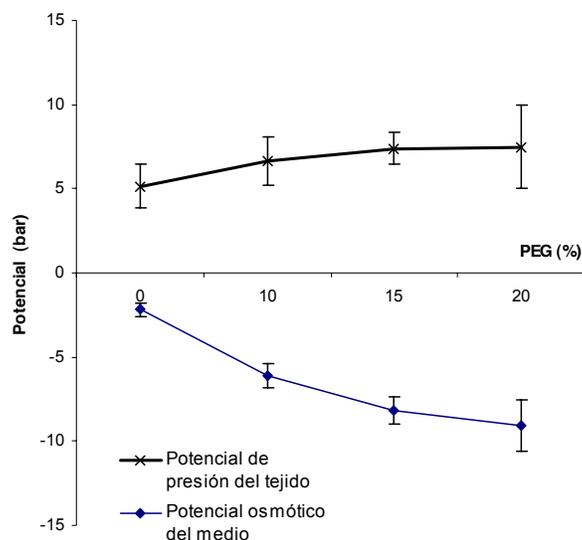


Figura 21. Potencial de presión de turgencia del tejido foliar de brotes seleccionados en tres ciclos bajo estrés osmótico con PEG, y potencial hídrico del medio de cultivo líquido. Las barras verticales en las líneas corresponden al error estándar.



La relación entre el potencial hídrico y el contenido relativo de agua resultó ser prácticamente lineal, como también reportaron Dumont *et al.* (1996) en el intervalo de 100 % a 80 % de contenido relativo de agua, en callos embriogénicos de tres especies de coníferas sometidos a estrés osmótico con PEG-1450.

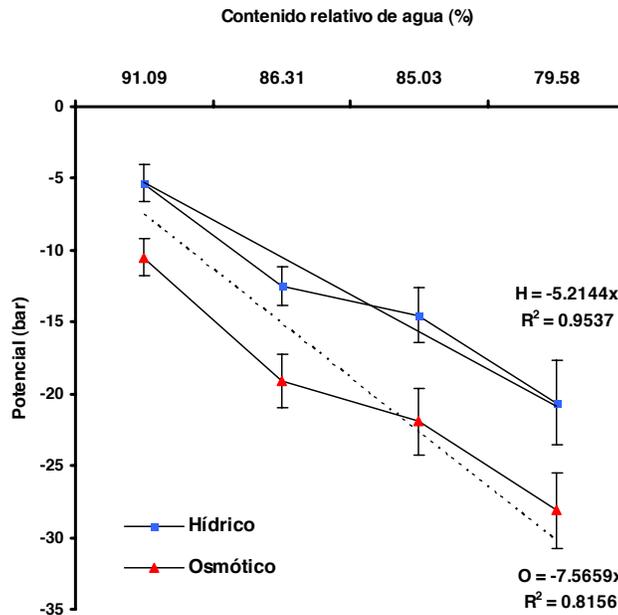


Figura 22. Relación entre el contenido relativo de agua y los potenciales hídrico y osmótico de brotes de maíz, cultivados en varios niveles de PEG. Segundo experimento.

La mayoría de estudios sobre estrés osmótico inducido con PEG se han realizado *in vivo*, más que *in vitro*. En campo los órganos de la planta de maíz tienen diferente grado de tolerancia al estrés; así, raíz, hoja, jilote y tallo detienen su crecimiento cuando su potencial hídrico interno alcanza valores de -1.4, -1.0, -0.75 y -0.50 MPa (Westgate y Boyer, 1985). En maíz, la tasa de alargamiento del vástago se reduce en mayor magnitud al disminuir el potencial hídrico del sustrato de -0.03 a -0.75 MPa, en comparación con el sistema radical que mantiene su crecimiento aún cuando el potencial disminuye hasta -1.6 MPa (Sharp *et al.*, 2004). En el presente trabajo los valores del potencial hídrico más bajos en



el tejido foliar se presentaron principalmente con 20 % de PEG (de -1.3 a -2.3 MPa), lo que explica el porque el crecimiento de los brotes se vio alterado en tales condiciones.

En campo, además de las diferencias genotípicas, la respuesta fisiológica de las plantas no es la misma si el estrés incide en etapa vegetativa o en la reproductiva; comúnmente, la etapa reproductiva es la más sensible al déficit hídrico, de manera que el rendimiento de grano se ve más afectado (Atteya, 2003). El mismo autor determinó que durante una semana de estrés hubo disminución del contenido relativo de agua de los potenciales hídrico y osmótico en la hoja bandera de maíz; tanto en la etapa vegetativa como en la reproductiva, la sequía produjo un abatimiento en la conductancia estomática, en la tasa fotosintética y en el rendimiento de grano, respecto a las plantas con riego; las plantas estresadas de la variedad de mejor comportamiento presentaron un contenido relativo de agua entre 63 y 70 %, potencial hídrico de -2.8 a -0.77 MPa y osmótico de -2.05 a -1.15 MPa. Resultados similares se obtuvieron (Siddique *et al.*; (2000) en trigo, donde los potenciales (hídrico y osmótico), el contenido relativo de agua y la tasa fotosintética disminuyeron por el estrés, mientras que la temperatura foliar mostró un incremento. Según Ogawa *et al.* (2005) las plántulas de maíz cultivados con 10 % de PEG (-0.21 MPa) disminuyeron el contenido relativo de agua del vástago y del sistema radical; mientras que el peso seco del vástago y su contenido de carbono permanecieron sin cambio, pero bajo su contenido de nitrógeno. El peso seco de la raíz y su contenido de carbono aumentaron con el estrés mientras que el de nitrógeno permaneció igual. Posiblemente la distribución y acumulación de carbohidratos del vástago hacia el sistema radical permitió contrarrestar los efectos del estrés osmótico (Ogawa *et al.*, 2005). La disminución del contenido de nitrógeno tal vez obedezca a una reducida actividad de la enzima Nitrato Reductasa en la raíz y en el vástago, como ha ocurrido en arroz bajo condiciones similares de estrés (Pandey y Agarwal, 1998). Posteriores estudios hechos por Ogawa y Yamauchi (2006a) sobre la fisiología de la raíz del



maíz bajo estrés osmótico en una solución nutritiva con PEG (0, 5, 20 y 30 %), encontraron que la primera respuesta de la raíz fue la reducción en su tasa de alargamiento hasta cero, ocurriendo al minuto con 30 % de PEG. Posteriormente, a través de 24 h de tratamiento la raíz y las hojas manifestaron una reducción en el contenido relativo de agua con 20 % y 30 % de PEG. Similar comportamiento lo presento el potencial hídrico y sus componentes.

Por otra parte, Chazen y Neumann, (1994) analizaron el efecto de soluciones nutritivas con PEG-6000 a un potencial de -0.5 MPa sobre la tasa de alargamiento de la hoja de plántulas de maíz. Al exponer la raíz al estrés osmótico, ocurrió la disminución abrupta del alargamiento de la hoja (de 17 a 5 $\mu\text{m min}^{-1}$). Durante este periodo la hoja disminuyó su potencial osmótico de -1.05 a -1.30 MPa. Al extraer las plántulas después de 5 h de estrés las hojas recuperaron su tasa de crecimiento. También Nulsen y Thurtell (1980) sometieron plántulas de maíz a estrés osmótico (-0.18 MPa) con PEG-6000 en soluciones nutritivas durante 2 h, registrando una disminución temporal del potencial hídrico de las hojas (-0.55 MPa), ya que después el potencial regresó a los valores iniciales. Similarmente, Lu y Neumann (1998) cultivaron plántulas de maíz en una solución con potencial hídrico de -0.4 MPa, durante 24 h. Las hojas presentaron una reducción en su tasa de crecimiento (mm día^{-1}), menor extensibilidad ($\mu\text{m min}^{-1} \text{g}^{-1}$) y un bajo número y tamaño de las células. Sin embargo, el potencial osmótico no se redujo significativamente, indicando que la primera respuesta al estrés osmótico fue el ajuste en la extensibilidad de las paredes celulares. En otro trabajo Chazen y Neumann (1994) analizaron la relación entre raíz y vástago durante el estrés osmótico. Después de inactivar la raíz por congelamiento sometieron las plántulas a una solución con PEG-6000 y la respuesta inmediata de las hojas fue la reducción de su tasa de crecimiento. Eso indicó que las raíces muertas no transmitieron señales hormonales o eléctricas, las cuales fueron innecesarias para que la hoja respondiera al estrés. Los autores concluyeron que el endurecimiento de las paredes celulares de la hoja



es el evento primario que ocurre en el sistema de respuestas en plántulas bajo estrés, resaltando la mayor importancia de las señales hidráulicas en comparación con las señales hormonales. Sin embargo, en otro estudio, Jiang y Zhang (2002) cortaron el sistema radical de las plántulas y después las sometieron a estrés osmótico (-0.7 MPa) con una solución de PEG-6000. Durante el periodo de 24 h fue notoria la reducción en 14.2 % del contenido relativo de agua en las hojas, pero a la vez incrementó el contenido de ABA; luego aumentaron las moléculas reactivas de oxígeno (O_2^- y de H_2O_2) aunado a la mayor actividad de enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidasa, catalasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa). En este caso fue importante una señal hormonal.

Por otro lado, Jía *et al.* (2001) trataron de explicar los cambios hormonales y su relación con las señales hidráulicas. Usaron fragmentos foliares (2.5 cm^2) y puntas de raíces (de 1.0 a 1.2 cm) de plántulas de maíz y las incubaron en soluciones con PEG-6000 (0, 5, 10, 15, 20 y 25 %). En la raíz la concentración de ABA aumentó hasta 15 % de PEG, permaneciendo estable con mayor estrés; en cambio, en la hoja el ABA aumentó con 25 % de PEG, mientras que su peso fresco disminuyó con 20 % y 25 % de PEG. La acumulación de ABA en la hoja se relacionó más con la disminución del volumen celular que con el potencial osmótico. Los autores postularon la existencia de una relación indirecta entre el ABA y el potencial osmótico a través de un mecanismo intermedio que podría ser la reducción del volumen celular por la acción del citoesqueleto. Al respecto, Hohl y Schopfer (1991) usaron segmentos de tallo del coleóptilo de maíz sujetos a estrés osmótico con manitol por 8 h. La biomasa de los segmentos se redujo progresivamente con un potencial hídrico superior a -4 bar y la longitud se redujo a -5 bar, indicando que el tejido sufrió una contracción celular, aun cuando los segmentos se incubaron en presencia de ácido indolacético.

Según Blancaflor y Hasenstein (1995) el estrés osmótico inhibe el crecimiento de la raíz y a nivel anatómico se ha observado una orientación irregular de los



microtúbulos responsables del arreglo de las fibras de la pared celular en la zona de alargamiento; es decir, al inhibirse el crecimiento, ocurre un desorden del citoesqueleto. Con relación al crecimiento de la raíz, Materechera *et al.* (1992) estudiaron varias especies de monocotiledóneas, encontrando que al someterse a estrés osmótico con PEG-20000 disminuye su tasa relativa de alargamiento y su tasa relativa de engrosamiento.

En adición, Wakabayashi *et al.* (1997) cultivó plántulas de trigo bajo estrés con PEG-4000 a un potencial osmótico de -0.61 MPa. Con el estrés se redujo el crecimiento en longitud del coleóptilo; sin embargo, la extensibilidad de las paredes celulares fue mayor en las plántulas estresadas que en las plántulas testigo. Los análisis químicos indicaron que el contenido de celulosa por unidad de longitud disminuyó, mientras que el contenido de hemicelulosa no cambió; también disminuyó la cantidad de ácido ferúlico, de ácido diferúlico y se detectó menor actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa y tirosina amonio liasa. Entonces, el estrés causó menor actividad de enzimas relacionadas con la biosíntesis de la pared celular, lo que se reflejó en un ablandamiento y adelgazamiento de paredes permitiendo conservar la extensibilidad del coleóptilo aun cuando el crecimiento fue nulo.

Todos estos trabajos hechos *in vivo* indican que la reducción del crecimiento y del volumen celular es la primera respuesta al estrés osmótico inducido por PEG, seguido de cambios en la estructura química de la pared celular, en el potencial osmótico y emisión de señales hormonales.

Con estos antecedentes, es posible deducir que los brotes de maíz expuestos a estrés osmótico por tres ciclos de selección tuvieron cambios en el volumen de sus células y una detención en el crecimiento por las señales hidráulicas; sin embargo, la morfogénesis no se alteró porque las señales hormonales implicadas en el desarrollo de brotes actuaron en forma independiente.



4.2.2.2.1 Ajuste osmótico y sus componentes

Los genotipos LE-13 y LE-16 presentaron el mayor ajuste osmótico, con 22.3 y 21.1 bar, respectivamente, al ser cultivados con 20 % de PEG (Cuadro 31). Sin embargo, la naturaleza de su ajuste osmótico fue diferente en cuanto a la contribución proporcional de polímeros insolubles y de solutos.

Cuadro 31. Datos estimados del ajuste osmótico total y sus componentes (efecto de polímeros y de solutos) en los brotes de maíz en respuesta a la interacción genotipo x PEG. Valores del segundo experimento.

Genotipo	PEG (%)	Ajuste osmótico (bar)			Contribución al total (%)	
		Total	Polímeros	Solutos	Polímeros	Solutos
LE-13	10	9.1 bcd	3.4	5.7	37.3	62.7
	15	19.8 abc	6.4	13.4	32.3	67.7
	20	22.3 a	8.7	13.6	39.0	61.0
LE-46	10	10.5 abcd	3.0	7.5	28.9	71.1
	15	8.0 cd	3.0	5.0	38.1	61.9
	20	8.7 cd	3.2	5.4	37.3	62.7
LE-16	10	11.5 abcd	4.3	7.1	37.9	62.1
	15	11.2 abcd	5.7	5.5	50.7	49.3
	20	21.1 ab	14.4	6.7	68.3	31.7
LE-14	10	4.4 d	1.6	2.8	36.7	63.3
	15	8.0 cd	4.0	3.9	50.9	49.1
	20	16.6 abc	9.7	6.9	58.3	41.7
DSH		12.0	-	-	-	-

DSH = diferencia mínima significativa a 5 % de error. Medias en la columna con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey, 0.05).

En *Lycopersicon* se han logrado líneas celulares resistentes al estrés osmótico (Ψ_{π} = -26 bar) impuesto por PEG-6000, debido a la capacidad de ajuste osmótico de las células (Bressan *et al.*, 1981, 1982; Handa y Bressan, 1982).

El sistema radical del maíz desarrollado bajo estrés hídrico presenta ajuste osmótico, proceso que puede resultar de dos mecanismos; el primero es un incremento en la tasa neta de acumulación de moléculas osmóticas (que incluyen



efectos en síntesis, absorción, catabolismo, importación y utilización de solutos) (Sharp *et al.*, 2004); el segundo implica un aumento de concentración simple o pasiva de solutos, debido a: 1) deshidratación del tejido al bajar el contenido de agua por unidad de peso seco; 2) reducción del volumen del tejido; 3) endurecimiento celular que cambia la elasticidad del tejido; y 4) cambio en la distribución relativa del agua entre el simplasto y apoplasto (Sharp *et al.*, 2004).

Si al rehidratar el tejido se registrara un decremento del potencial osmótico, esto indicaría una acumulación pasiva de solutos debida a la reducción del volumen celular como resultado de la acumulación de polímeros insolubles y no a la deshidratación. Sin embargo, este tipo de ajuste osmótico es insuficiente para mantener la presión de turgencia en raíces sometidos a estrés hídrico severo (-1.6 MPa) y se recurre a la síntesis de proteínas como expansinas y otras enzimas necesarias para el ablandamiento de la pared celular que permita el crecimiento (Sharp *et al.*, 2004).

En la presente investigación los cálculos de los componentes del potencial osmótico se hicieron sin rehidratar el tejido del brote, al suponer que en condiciones *in vitro* el tejido está hidratado por la alta humedad relativa contenida en el frasco, dado que los recipientes de cultivo sellados impiden el libre intercambio de gases con el aire (Jackson, 2003). De esta forma se encontró que en los genotipos LE-13 y LE-46 el ajuste osmótico se debió en más de 60 % a la acumulación de solutos, mientras que en LE-16 y LE-14 el efecto de los polímeros contribuyó con más de 50 % al ajuste osmótico total, principalmente en los niveles más altos de estrés osmótico (15 y 20 % de PEG).

En raíces de plántulas de maíz sometidas a estrés por 20 min, la reducción del potencial osmótico se debió en 46 % a la deshidratación celular y en 54 % a la biosíntesis o importación de solutos en las células. A las 12 h de estrés, la disminución del potencial osmótico se debió en 7 % a la deshidratación y en 93 % a la acumulación de solutos compatibles (Ogawa y Yamauchi, 2006a). Las concentraciones del ión potasio aumentaron minutos después de iniciar el estrés,



y entre los aminoácidos que se acumularon inmediatamente fueron ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina y treonina. Entre 2 y 6 h después (14 a 20 h) se acumularon serina y alanina, mientras que prolina y azúcares reductores se acumularon hasta 12 h y 24 h después. En el mayor nivel de estrés osmótico (-0.9 MPa) los aminoácidos que más abundaron en la raíz fueron asparagina y alanina. En general, con 30 % de PEG la raíz acumuló mayor cantidad de solutos (principalmente aminoácidos) en comparación con las hojas (donde la mayoría fueron azúcares reductores) (Ogawa y Yamauchi, 2006b).

En la presente investigación el tipo de ajuste osmótico varió entre genotipos, porque algunos tendieron a acumular solutos activamente mientras que otros usaron pasivamente los polímeros de la pared celular.

En plantas de sorgo sometidas a estrés por déficit hídrico, la concentración pasiva de solutos por deshidratación contribuyó con 47 a 50 % al potencial osmótico del tejido. La reducción del volumen celular por la acumulación de polímeros insolubles contribuyó con menos de 8 % y la acumulación activa de solutos participó con 42 a 45 % (Girma y Krieg, 1992). En *Atriplex halimus* se confirmó un efecto negativo del estrés hídrico sobre el contenido relativo de agua, sin que haya habido cambios importantes en los contenidos de prolina y de almidón, pero sí aumentaron los contenidos de glicina-betaína y azúcares solubles; en el ajuste osmótico total se observó la mayor ventaja en la variedad tolerante debido a la participación equitativa de la acumulación activa de solutos y la de polímeros insolubles como hemicelulosa y celulosa (de la pared celular), mientras que en la variedad sensible el ajuste osmótico se debió en su mayoría a la acumulación activa de solutos (Martínez *et al.*, 2004).

En el presente trabajo las líneas LE-14 y LE-16 fueron las que presentaron mayor influencia de los polímeros insolubles en el ajuste osmótico y también son consideradas tolerantes a la sequía a nivel de campo, mientras que LE-13 mostró mayor participación de la acumulación activa de solutos y se considera una línea intolerante a la sequía en campo, de acuerdo con Zarco *et al.* (2005). Esto significa



que es posible determinar la tolerancia a la sequía mediante ensayos conducidos *in vitro*, donde se examine el ajuste osmótico debido a la acumulación de polímeros en la pared celular.

En variedades de trigo el estado hídrico de la hoja bandera y su ajuste osmótico correlacionaron negativamente con el rendimiento bajo estrés hídrico, por lo que Ortíz *et al.* (2003) consideraron que tales respuestas fisiológicas no serían de utilidad para seleccionar genotipos de mayor rendimiento en condiciones de estrés hídrico. No obstante, estudios posteriores de los mismos autores afirmaron lo contrario (Silva *et al.*, 2007), puesto que el ajuste osmótico medido en campo se correlacionó con el rendimiento de grano de trigo.

También variedades de garbanzo con alto ajuste osmótico (0.37 a 0.71 MPa) presentaron mayor rendimiento de semilla, además de tener valores superiores en su estado hídrico. En este caso, el ajuste osmótico tuvo influencia en: contenido de agua de las hojas, sobrevivencia y, mantenimiento del crecimiento y de las actividades metabólicas, lo que resultó en mayor productividad del cultivo (Moinuddin y Chopra, 2004).

En la Figura 23 se muestra un aspecto general de los brotes cultivados *in vitro* bajo estrés osmótico. Se observa que en todos los niveles de estrés osmótico algunos brotes desarrollaron un enraizamiento profuso, mientras que en otros brotes hubo senescencia foliar.





Figura 23. Brotes de maíz cultivados en diferentes niveles de estrés osmótico simulado con PEG-8000 (de 0 % hasta 20 %).

4.2.2.3. Proteína soluble total y prolina soluble en tres ciclos de selección *in vitro* de maíz bajo estrés osmótico

Contenido de proteína soluble en el tejido foliar

El análisis de varianza del contenido total de proteína soluble en el tejido foliar de los brotes después de tres ciclos de selección *in vitro*, bajo varios niveles de estrés osmótico, permitió detectar que los factores genotipo (G), PEG (P), ciclo de selección (C) y las interacciones influyeron significativamente en esta variable, en



el siguiente orden de importancia (magnitud): $G > P \times C > G \times P = G \times C > P = G \times P \times C > C$ (Cuadro 32).

Cuadro 32. Valores de F del análisis de varianza del contenido de proteína soluble en brotes del primero y tercero ciclos de selección *in vitro*. Con datos del primero y segundo experimentos.

Factor	Valor de F
Genotipo (G)	1418.7 **
PEG (P)	19.5 **
Ciclo (C)	7.3 *
G x P	28.5 **
G x C	27.7 **
P x C	89.0 **
G x P x C	6.4 *

**= Significancia a 1 % de error; * = significancia a 5 % de error

El efecto más notorio fue que el genotipo LE-13 presentó 64 % menos proteína soluble en el tejido foliar que los demás genotipos, en los dos ciclos de selección y en todos los niveles de estrés osmótico (Cuadro 33).

Con base en la magnitud de F del análisis de varianza y en los promedios del contenido de proteína soluble, se infiere que el genotipo fue LE-13 fue significativamente inferior, en al menos 64 %, al resto de los genotipos entre los cuales hubo pocas diferencias.

No hubo diferencias en cada genotipo entre los ciclos de selección, aunque en promedio de todos los genotipos el contenido de proteína bajo en 2.5 % al pasar del ciclo 1 al ciclo 3.

Entre los niveles de PEG el contenido de proteína se elevó en 7 % al pasar del nivel 0 % al nivel de 15 %, pero al pasar al nivel 20 % disminuyó al nivel inicial.

Analizando la interacción P x C, se encontró que en el primer ciclo de selección el contenido de proteína aumentó en 30 % con un nivel de 15 % de PEG y luego disminuyó un 9 % con 20 % de PEG. En el tercer ciclo, el contenido de proteína inicial fue superior en 22 % con respecto al primer ciclo, y fue disminuyendo conforme aumentó el estrés.



Los siguientes factores importantes fueron las interacciones G x P y G x C, en donde destaca que solamente la línea LE-46 redujo consistentemente su proteína foliar al aumentar el estrés osmótico de 0 a 20 % de PEG, mientras que las otras tres líneas presentaron cambios menos notorios. Al comparar los ciclos, casi todas las líneas mostraron disminuciones de la proteína foliar, excepto LE-16 la cual presentó un incremento.

Si bien la interacción G x C x P también tuvo efecto significativo en la proteína foliar, el efecto fue de baja magnitud y de menor importancia.

Estos resultados muestran que las dos líneas tolerantes a sequía en campo (*in vivo*), LE-14 y LE-16, se distinguen por tener altos contenidos de proteína soluble en sus hojas, contenido que no se abate bajo estrés osmótico *in vitro*. En cambio, LE-13 que se comportó susceptible en campo tiene contenidos muy bajos de proteína soluble, y la línea LE-46 lo redujo a menos de 5.0 mg g⁻¹ al acentuarse el estrés osmótico.

En otro estudio Jyoti *et al.* (1990) encontraron que las plántulas de maíz crecidas *in vitro* bajo estrés osmótico con PEG-6000 a concentraciones de 2.5 y 5 %, hubo aumentos en la raíz y mesocótilo de los contenidos de almidón y de azúcares solubles, pero los contenidos de proteína soluble y prolina soluble permanecieron sin cambio importante. En plántulas de maíz cuyo sistema radical fue amputado, la inducción de estrés osmótico (-0.7 MPa) con PEG durante 24 h tampoco tuvo efecto en el contenido de proteína soluble de las hojas, pero sí aumentó la actividad de varias enzimas antioxidantes (Jiang y Zhang, 2002).

En hojas de caña de azúcar deshidratadas a la intemperie, el contenido total de proteínas disminuyó a la par con el contenido relativo de agua (Peláez *et al.*, 1987). También en musgos (*Tortula ruralis* y *Hygrohypnum luridum*) sometidos a estrés osmótico con PEG-6000, el contenido de proteínas disminuyó conforme decreció el potencial hídrico de -5 a -60 bar (Dhindsa y Bewley, 1977).



Cuadro 33. Contenido total de proteína soluble en brotes de maíz correspondientes al primero y tercero ciclos de selección *in vitro* bajo estrés osmótico inducido con PEG (PM. 8000).

Genotipo	Ciclo	PEG (%)	Proteína (mg g ⁻¹ de PF)	Promedios		
				Ciclos	Genotipos	
LE-13	1	0.0	1.980	f	2.5	
	1	10	1.916	f		
	1	15	3.900	e		
	1	20	2.225	f		
	3	0.0	2.170	f	2.10	
	3	10	1.744	f		
	3	15	2.100	f		
	3	20	2.400	f		
LE-46	1	0.0	5.275	bcd	5.60	
	1	10	5.806	abc		
	1	15	5.876	abc		
	1	20	5.466	abc		
	3	0.0	6.430	ab	5.38	
	3	10	5.702	abc		
	3	15	5.322	abcd		
	3	20	4.083	de		
LE-16	1	0.0	3.786	e	5.10	
	1	10	5.322	abcd		
	1	15	5.580	abc		
	1	20	5.713	abc		
	3	0.0	5.843	abc	5.67	
	3	10	6.037	abc		
	3	15	6.057	abc		
	3	20	4.746	cde		
LE-14	1	0.0	5.690	abc	6.22	
	1	10	6.292	ab		
	1	15	6.399	ab		
	1	20	6.516	ab		
	3	0.0	5.998	abc	5.79	
	3	10	6.626	a		
	3	15	4.791	cde		
	3	20	5.750	abc		
DSH			1.340		6.00	

DSH = diferencia mínima significativa a 5 % de error. Medias en la columna con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey, 0.05).



Al cultivar *in vitro* células de tabaco en medio de cultivo líquido con 30 % de PEG (-28 bar), Iraki *et al.* (1989) detectaron que las células tolerantes presentaron menor tamaño, baja tasa de alargamiento y menor volumen, en comparación con las células intolerantes; en condiciones de salinidad las células tolerantes redujeron su volumen y tuvieron la mitad de polisacáridos en la pared celular que las intolerantes. También hubo diferencias en la composición química de la pared, ya que las tolerantes tuvieron bajas proporciones de celulosa y mayores de hemicelulosa y proteína insoluble; en la composición de las proteínas insolubles se encontró que el aminoácido hidroxiprolina (componente de la proteína extensina) fue el único que se abatió con el estrés.

En este estudio, el genotipo LE-14 presentó el mayor ajuste osmótico debido a la contribución de polímeros insolubles de la pared celular, y la mayor cantidad de proteína soluble.

Patrones electroforéticos de las proteínas en brotes de cultivo in vitro bajo estrés osmótico

Se analizaron las proteínas de los diferentes genotipos en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, como se indicó en el inciso 3.6.4. En las Figuras 24, 25, 26 y 27 se muestran los patrones electroforéticos de los genotipos seleccionados, mostrando en el primer carril marcadores de peso molecular (M) en sus correspondientes pesos moleculares, para ubicar el peso de las diferentes proteínas de los extractos.

El análisis visual de la proteína soluble total teñida con azul de Comassie en los geles de los distintos genotipos, muestra una gran heterogeneidad en peso molecular y en la abundancia relativa de los diferentes grupos de proteínas. Esto señala poca confiabilidad en el patrón de bandeo, probablemente debido a la interferencia del PEG.



Estudios recientes indican que el PEG precipita las proteínas durante su proceso de extracción, dependiendo de su concentración. De esta manera, las proteínas presentes en el sobrenadante, el cual se usa para la cuantificación y la electroforesis, presenta menor contenido de proteínas solubles por la presencia del plimero disuelto. Inclusive, ocurre baja repetibilidad del patron de bandeo proteico (Xi *et al.*, 2006)

Genotipo LE-13

Las muestras de las plantas de campo corresponden a un genotipo que se consideró como testigo en la electroforesis. Las plántulas cultivadas *in vitro* tuvieron un patrón electroforético complejo.

Los brotes sin estrés osmótico (C1-P0 y C3-P0) manifestaron mayor número de bandas proteicas que los brotes cultivados con 10 % de PEG (C1-P10 y C3-P10). Principalmente, en el tercer ciclo de selección hubo menos bandas proteicas en los brotes, pero también una acumulación de proteínas de bajo peso molecular (6.5 kDa) al llegar a 15 % de PEG la cual no se observó con la misma intensidad en los otros tratamientos (Figura 25 A). Se registró una banda de 83 kDa no se expresó en el tercer ciclo de selección con PEG 10 % (Figura 24).



Genotipo LE-13.

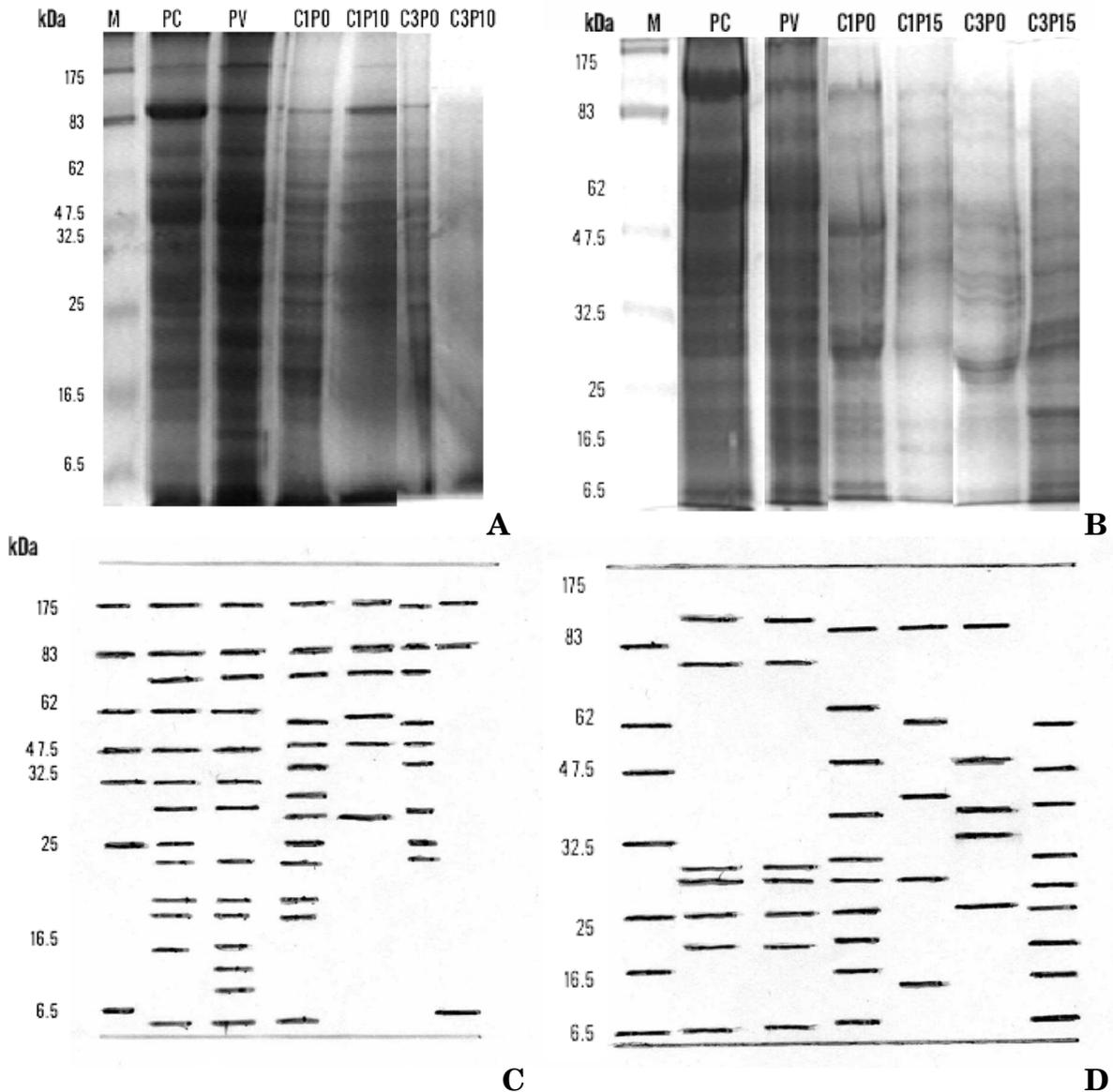


Figura 24. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida del genotipo LE-13 en los ciclos de selección 1 y 3 y en A) PEG 0 y 10 %; B) 0 y 15 %. C y D) Corresponde a la identificación visual de las diferentes bandas. M = Marcador de peso molecular, PC = Planta de campo, PV = Plántula cultivada *in vitro*; C1 y C3 = Ciclo uno y tres de selección; P0, P10 y P15 = PEG 0%, 10% (A) y 15% (B).



Los brotes del primer ciclo de selección con 15 % de PEG (C1-P15) tuvieron menor expresión de bandas con respecto a los brotes cultivados sin estrés osmótico (C1-P0) la presencia de bandas de pesos diferentes. En el tercer ciclo de selección el número de bandas fue mayor que en los brotes sin estrés, particularmente con bandas de 47.5, 62 kDa y otras ubicadas en el intervalo de 16.5 a 32.5 kDa, las cuales se expresaron específicamente sólo en estrés (Figura 24).

Genotipo LE-16

En este genotipo la expresión de bandas proteicas fue mayor en la planta de campo que en las plántulas y brotes cultivados *in vitro*. En el primer ciclo de selección, los brotes cultivados con 0 % de PEG (C1-P10) presentaron mayor número de bandas que los brotes con estrés (C1-P10). En el tercer ciclo ocurrió lo contrario ya que la mayor expresión la presentaron los brotes cultivados con PEG (C3-P10), principalmente de bandas en el rango de 25 a 47.5 kDa (Figura 25).

En el primero y tercer ciclos de selección de brotes con 15 % de PEG (C1-P15) y (C3-P15) sobresale la menor expresión de proteínas que los brotes cultivados sin estrés. En C1-P15 los brotes presentaron mayor expresión de una banda proteica de 83 kDa (Figura 25).



Genotipo LE-16

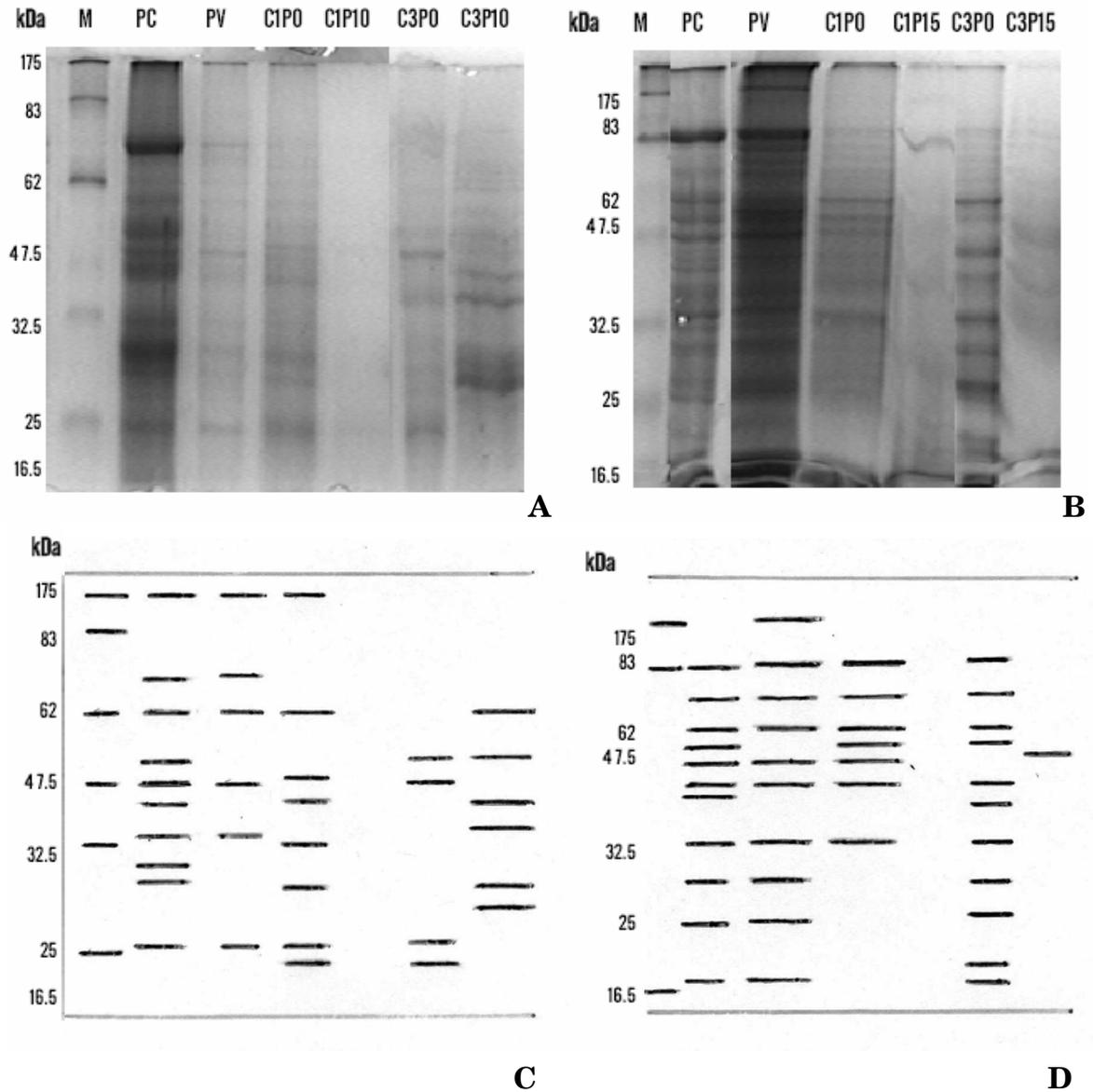


Figura 25. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida del genotipo LE-16 en los ciclos de selección 1 y 3 y en A) PEG 0 y 10 %; B) 0 y 15 %. C y D) Corresponde a la identificación visual de las diferentes bandas. M = Marcador de peso molecular, PC = Planta de campo, PV = Plántula cultivada *in vitro*; C1 y C3= Ciclo uno y tres de selección; P0, P10 y P15 = PEG 0%, 10% (A) y 15% (B).



Genotipo LE-14

Reiteradamente, la planta cultivada en campo presentó elevada expresión proteica con respecto a las plántulas y brotes cultivados *in vitro*. En esta última condición el primer ciclo de brotes cultivados con 10 % de PEG (C1-P10), el número de bandas superó al presentado en la condición sin estrés osmótico (C1P0) y en el tercer ciclo de selección los brotes manifestaron baja expresión de bandas proteicas, solamente una ubicada en el rango de 25 a 32.5 kDa fue sobresaliente (Figura 26).

En el primer ciclo de selección con 15 % de PEG los brotes presentaron menos bandas proteicas que los brotes cultivados sin estrés. En el tercer ciclo se presentó la misma tendencia, pero los brotes cultivados con PEG conservaron bandas específicas de 25 kDa y dos ubicadas en el rango de 62 a 83 kDa (Figura 26).



Genotipo LE-14

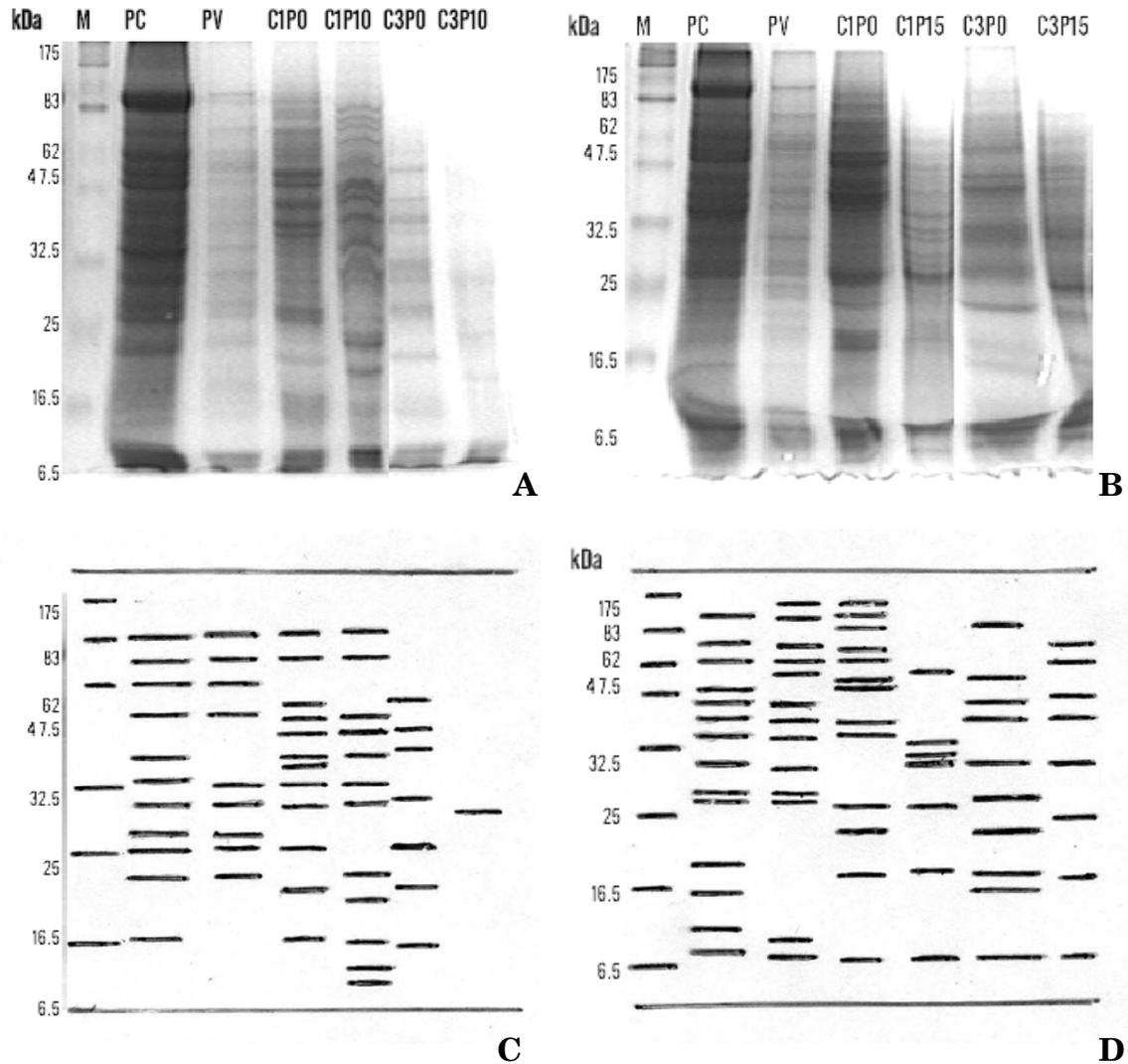


Figura 26. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida del genotipo LE-14 en los ciclos de selección 1 y 3 y en A) PEG 0 y 10 %; B) 0 y 15 %. C y D) Corresponde a la identificación visual de las diferentes bandas. M = Marcador de peso molecular, PC = Planta de campo, PV = Plántula cultivada *in vitro*; C1 y C3= Ciclo uno y tres de selección; P0, P10 y P15 = PEG 0%, 10% (A) y 15% (B).



Genotipo LE-46

En el primer ciclo los brotes sin PEG presentaron bandas más intensas con respecto a las bandas de los brotes con 10 % de PEG. En el tercer ciclo ocurrió lo contrario ya que en presencia de PEG los brotes manifestaron bandas que se expresaron con mayor intensidad. Estas bandas fueron de alrededor de 20 kDa, 30 kDa y de 47 kDa (Figura 27).

En el primer ciclo de selección con 15 % de PEG los brotes tuvieron menor expresión de bandas proteicas con respecto a los brotes sin estrés, pero con el estrés se conservaron bandas en el rango de 32.5 kDa a 83 kDa. En el tercer ciclo ocurrió lo contrario, los brotes bajo estrés presentaron abundantes bandas en el intervalo de 25 a 83 kDa (Figura 27).



Genotipo LE-46

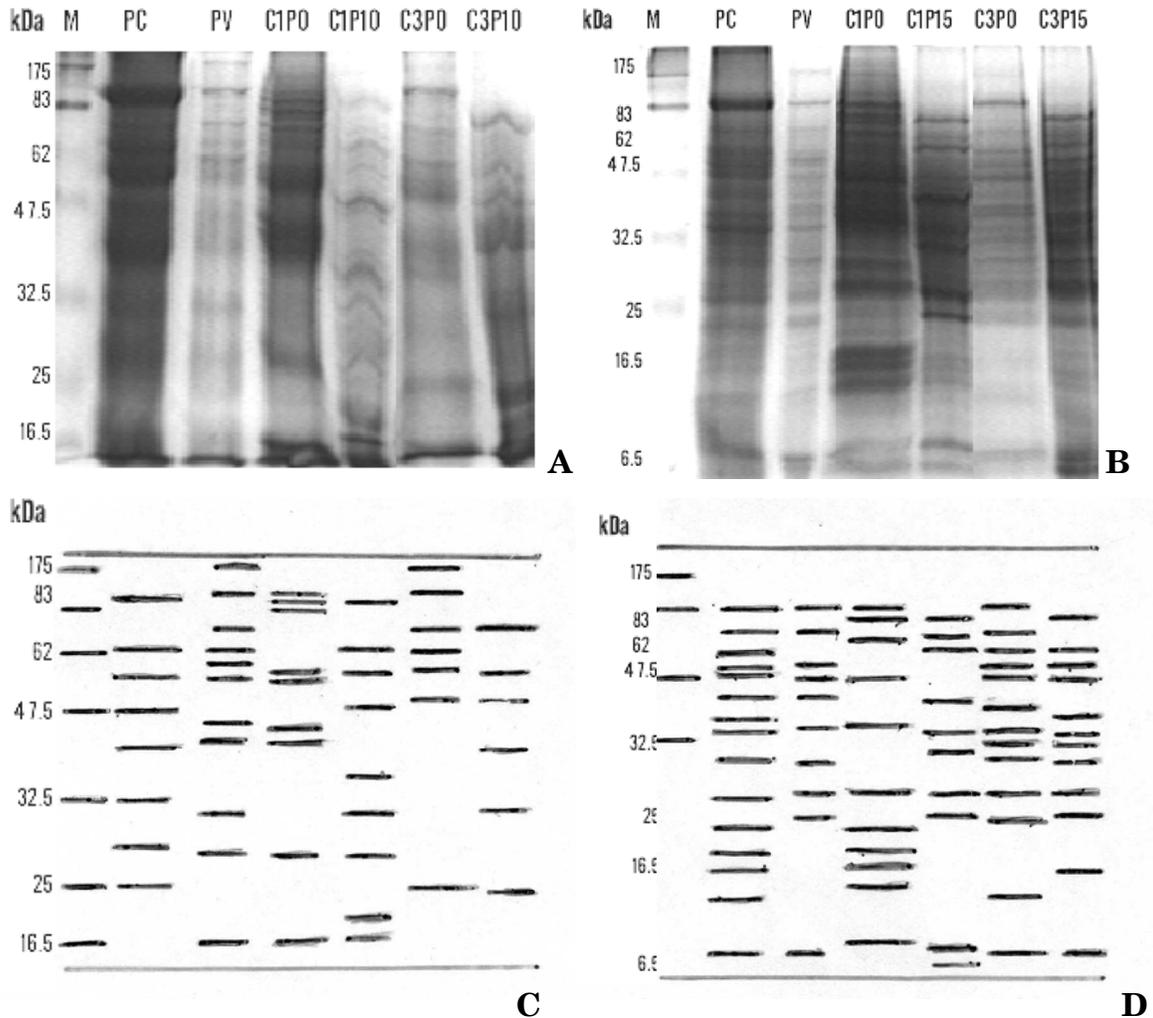


Figura 27. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida del genotipo LE-46 en los ciclos de selección 1 y 3 y en A) PEG 0 y 10 %; B) 0 y 15 %. C y D) Corresponde a la identificación visual de las diferentes bandas. M = Marcador de peso molecular, PC = Planta de campo, PV = Plántula cultivada *in vitro*; C1 y C3= Ciclo uno y tres de selección; P0, P10 y P15 = PEG 0%, 10% (A) y 15% (B).



En células cultivadas *in vitro* de *Populus euphratica* se comprobó que tanto el número como el peso molecular de las bandas proteicas difieren entre las células sometidas a estrés iónico-osmótico (NaCl) con las sometidas a estrés osmótico (PEG-6000). Por ejemplo, una proteína de 28 kDa se expresó en ambos tipos de estrés, pero otras dos proteínas de 25 kDa y 66 kDa se expresaron únicamente con estrés salino (Gu *et al.*, 2004). Un comportamiento similar se ha encontrado en células de tabaco seleccionadas por tolerancia al estrés salino y estrés osmótico, donde el número de bandas expresadas e inhibidas difiere con el tipo de estrés; sin embargo, dos proteínas (26 y 43 kDa) estuvieron presentes en ambos (Singh *et al.*, 1985). Esto indica que se debe interpretar con precaución el patrón de polipéptidos encontrados después de aplicar estrés, inclusive dentro de una misma especie.

En una investigación con maíz efectuada por Espinosa *et al.* (2001) en campo e invernadero, mediante electroforesis unidimensional se encontraron bandas proteicas que se expresaron únicamente en riego o en sequía, mientras que algunas otras se expresaron con mayor intensidad en sequía que en riego. Las proteínas variaron en número y en peso molecular entre raíz, tallo y hoja así como entre variedades. En total, el déficit hídrico indujo la síntesis de 36 proteínas de pesos moleculares, que variaron de 20.3 a 167 kDa, pero otras 16 se expresaron tanto en riego como sequía.

Zorb *et al.* (2004) hicieron estudios *in vivo* del impacto de la salinidad sobre la expresión de proteínas en plántulas de maíz mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. Con el tratamiento de 100 mM durante nueve días se expresaron 510 y 488 manchas proteicas en la raíz y vástago respectivamente; en comparación con el testigo, el estrés promovió la aparición o sobre-expresión de 42 % y la sub-expresión de 23 % de las proteínas en el vástago, mientras que en las raíces fue el 41 % y 40 %, respectivamente. Los autores identificaron con precisión 14 proteínas, de las cuales cinco participan en la



síntesis y modificación de otras proteínas, seis correspondieron a enzimas del metabolismo del carbono, y las tres restantes participan en el metabolismo del nitrógeno. En general, las proteínas se ubicaron en el rango de 17 a 58.4 kDa y la intensidad de su expresión varió entre los órganos estudiados. Al respecto en el trabajo anterior se concluyó que la resistencia a la salinidad es una característica poligénica y que no hay mecanismos específicos para estrés por salinidad en maíz. En otro trabajo similar con maíz cultivado en invernadero y en cámara de crecimiento, y mediante la misma técnica bidimensional de electroforesis, Riccardi *et al.* (1998) encontraron que a los 10 d de estrés hídrico se detectaron 413 manchas proteicas de las cuales 78 fueron influidas por el estrés; de éstas, 40 incrementaron su expresión, 10 se expresaron únicamente con el estrés, 23 presentaron una menor expresión y cinco no se alteraron. Se identificaron 19 proteínas por su mayor expresión relacionada con el estrés hídrico, y correspondieron a enzimas involucradas en las rutas metabólicas básicas como la glucólisis, ciclo de Krebs (por ejemplo, enolasa y triosa fosfato isomerasa), la ruta de los fenilpropanoides y una que presumiblemente participa en la lignificación (cafeato metil transferasa). Inclusive, 10 de estas proteínas coincidieron totalmente en nivel de secuencia de aminoácidos con otras proteínas reportadas para otras variedades de maíz o para otras especies como trigo, arroz y chícharo. También Pérez *et al.* (2000) estudiaron la respuesta de la raíz de plántulas de arroz sometidas a estrés salino y encontraron que algunas manchas proteicas (entre 4 y 6) se inhibieron por el estrés y otras se expresaron en mayor magnitud (entre 5 y 7), según la variedad. El peso molecular de las proteínas se ubicó entre 14 y 98 kDa, pero ninguna coincidió con las reportadas en otros trabajos, lo que denota la diversidad de proteínas entre variedades y la complejidad de los mecanismos responsables de la tolerancia a la salinidad en ese cultivo. Salekdeh *et al.* (2002) detectaron 1000 manchas proteicas, de las cuales 42 presentaron un cambio cuantitativo y cualitativo por el estrés. En la hoja se identificaron y secuenciaron ocho proteínas, cuyo peso molecular osciló entre 21 y



46 kDa, que participan en el metabolismo del carbono, alargamiento celular y en el metabolismo antioxidante. En la raíz se identificaron cinco proteínas con un peso de 22 a 31 kDa, algunas de ellas participan en la biosíntesis de lignina y de ácido abscísico. En general, la síntesis de polipéptidos resultó más pronunciada en la raíz que en el vástago.

Por su parte Kong *et al.* (2005) encontraron que el estrés salino promovió mayor expresión de una banda proteica de 90 kDa en la raíz y dos bandas proteicas de 22 y 31 kDa en la vena central de la hoja. La expresión de proteínas resultó menor en la lámina foliar. Un análisis más detallado a través de electroforesis bidimensional reveló que 13 proteínas se expresaron a causa del estrés y 10 disminuyeron su expresión. La electroforesis bidimensional permitió demostrar que la mancha proteica de 31 kDa presente en la vena central estaba constituida de al menos cuatro componentes diferenciados por su punto isoeléctrico. Posteriormente, con el uso de un anticuerpo policlonal generado en ratón, se determinó que la mayor expresión de esta proteína ocurrió en variedades tolerantes y la menor en la variedad sensible.

Al cultivar variedades de sorgo (tolerante y susceptible) en condiciones de riego y de sequía en campo, se determinó el patrón de expresión de la proteína Ciclofilina de 20 kDa, por medio de anticuerpos monoclonales de *Arabidopsis thaliana*. Con el estrés por sequía hubo mayor expresión de la proteína en hojas y granos en desarrollo en la variedad tolerante; también se detectó otra proteína de 35 kDa asociada a esta variedad cuya intensidad aumentó ligeramente con el estrés (Sharma y Singh, 2003). En trigo se determinó que la proteína Deshidrina de 24 kDa estuvo asociada a las variedades tolerantes bajo condiciones de estrés por déficit hídrico (López *et al.*, 2003). En estos trabajos se resaltó la necesidad de corroborar la función de tales proteínas en plantas transgénicas en cuanto a la tolerancia a la sequía, así como el potencial para usarlas como marcadores bioquímicos en la evaluación de variedades.



Contenido de prolina en el tejido foliar

Considerando que a nivel de campo las líneas LE-16 y LE-13 son contrastantes en su tolerancia a la sequía (Zarco *et al.*, 2005), en el presente trabajo se analizaron sus contenidos de prolina en brotes del tercer ciclo de selección *in vitro*. Tanto en LE-13 como en LE-16 se observó una marcada acumulación de este aminoácido con 15 % y con 10% de PEG, respectivamente. En LE-16 también hubo acumulación con 20% de PEG (Figura 28).

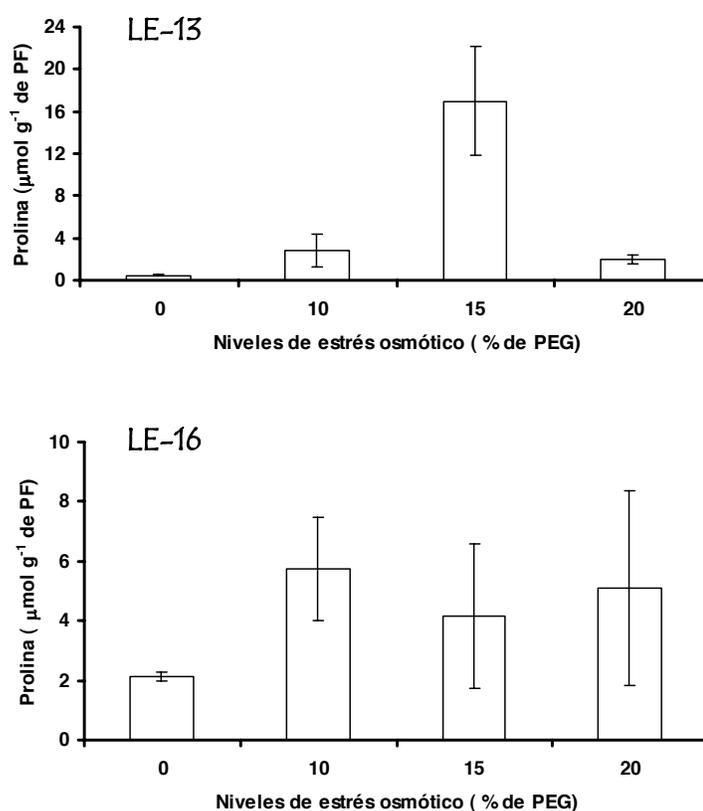


Figura 28. Acumulación de prolina libre en tejido foliar de brotes de dos líneas de maíz (LE-13 y LE-16) seleccionadas *in vitro* en tres ciclos bajo estrés osmótico inducido con PEG-8000.

En plántulas de maíz sometidas a estrés osmótico, Valentovic *et al.* (2006) encontraron que el contenido de malonil dialdehido (producto de la oxidación de ácidos grasos) se incrementó significativamente, indicativo de que hubo daño en



las membranas celulares y se alteró su permeabilidad. También los contenidos totales de electrolitos, de prolina y de azúcares solubles se incrementaron con el estrés, sobre todo en raíz, y mesocotilo, más que en hojas. Tales sustancias permitieron el ajuste osmótico y la conservación de la estabilidad de la membrana. En cebada Kocheva y Georgiev (2003) encontraron que el estrés osmótico con 25 % de PEG-6000 incrementó la acumulación de prolina y produjo un mayor daño en las membranas celulares en las hojas, con respecto al testigo. En este mismo sentido, Balbín *et al.* (1987) estudiaron hojas de maíz las cuales desprendieron de la planta y las dejaron a la intemperie para inducir estrés hídrico; después de 6 h descubrieron que al bajar el contenido relativo de agua hubo mayor acumulación de prolina, aumentó el daño en las membranas celulares y hubo mayor contenido de ADN; por el contrario, fue notoria la disminución del contenido de ARN.

La variedad de maíz Zacatecas 58 mostró capacidad de acumular prolina en respuesta a sequía; inclusive, las variedades derivadas de ella mediante mejoramiento genético convencional por tolerancia a la sequía aumentaron aún más su capacidad de acumular ese aminoácido por efecto del estrés (Avendaño *et al.*, 2005). Al cultivar células de esta variedad *in vitro* en un medio salino, se produjo mayor cantidad de prolina y se expresó una proteína no identificada (Carrillo *et al.*, 1993). Santos *et al.* (1996) cultivaron callo organogénico y embriogénico de una variedad de maíz sensible a estrés salino en medio sólido con sal (NaCl); el contenido de aminoácidos libres se incrementó con la salinidad (1.2 %) en ambos tipos de callos, pero el contenido total de proteína se incrementó ligeramente sólo en el callo organogénico. Hubo mayor expresión de poliaminas en el callo embriogénico que en el organogénico. En contraste, el contenido de prolina no se alteró con la salinidad y fue similar en ambos tipos de callo.

Los callos de arroz cultivados en presencia de sal (NaCl) tuvieron menor peso fresco, menor peso seco, y menor contenido total de proteína, pero manifestaron mayor cantidad de prolina (Reddy y Vaidyanath, 1986). Al someter callos de este



cultivo a estrés osmótico con PEG-6000 en concentraciones de 0 % hasta 10 %, García *et al.* (1999) detectaron rompimiento de las membranas principalmente en la variedad susceptible al estrés, pero no en la tolerante; el contenido total de proteínas aumentó con el estrés en callos de la variedad tolerante, mientras que disminuyó en los susceptibles. Similarmente, Pushpam y Rangasamy (2000) sometieron callos de maíz a estrés salino (de 0 hasta 1 %) y determinaron una interacción significativa variedad x concentración de sal (NaCl); en las plántulas el contenido de proteínas disminuyó conforme se incrementó la concentración de PEG, efecto que fue más severo en las variedades tolerantes; no obstante, el contenido de prolina aumentó con el estrés.

Estos estudios indican una relación estrecha entre la acumulación de prolina con la tolerancia al estrés, en comparación con la acumulación de proteínas solubles. En este sentido el genotipo LE-13 sería un candidato para estudios detallados de respuesta al déficit hídrico, aunque las relaciones hídricas revelan que el genotipo LE-16 desarrolla otros mecanismos de tolerancia al estrés por déficit hídrico.

4.2.3. Enraizamiento *in vitro* y aclimatación *ex vitro* de los brotes seleccionados bajo estrés osmótico

Enraizamiento *in vitro* de brotes

Los brotes seleccionados durante tres ciclos, en varios niveles de estrés osmótico, se sometieron a enraizamiento *in vitro*. Hubo variación en la capacidad de enraizamiento de los brotes entre genotipos y entre niveles de estrés osmótico (Figura 29). En general, la mayor capacidad de enraizamiento ocurrió en brotes seleccionados en 10 % y 15 % de PEG. Los brotes seleccionados en 20 % tuvieron baja capacidad de enraizar, con excepción del genotipo LE-14 que presentó 71 % de brotes con raíces y no se presenta diferencias significativas debido a que esta expresado en por ciento (Cuadro 34).



Al respecto, Iracheta *et al.* (2003) reportó porcentajes de enraizamiento entre 0 % y 100 %, dependiendo del genotipo y de la concentración de ácido naftalenacético presente en el medio de cultivo.

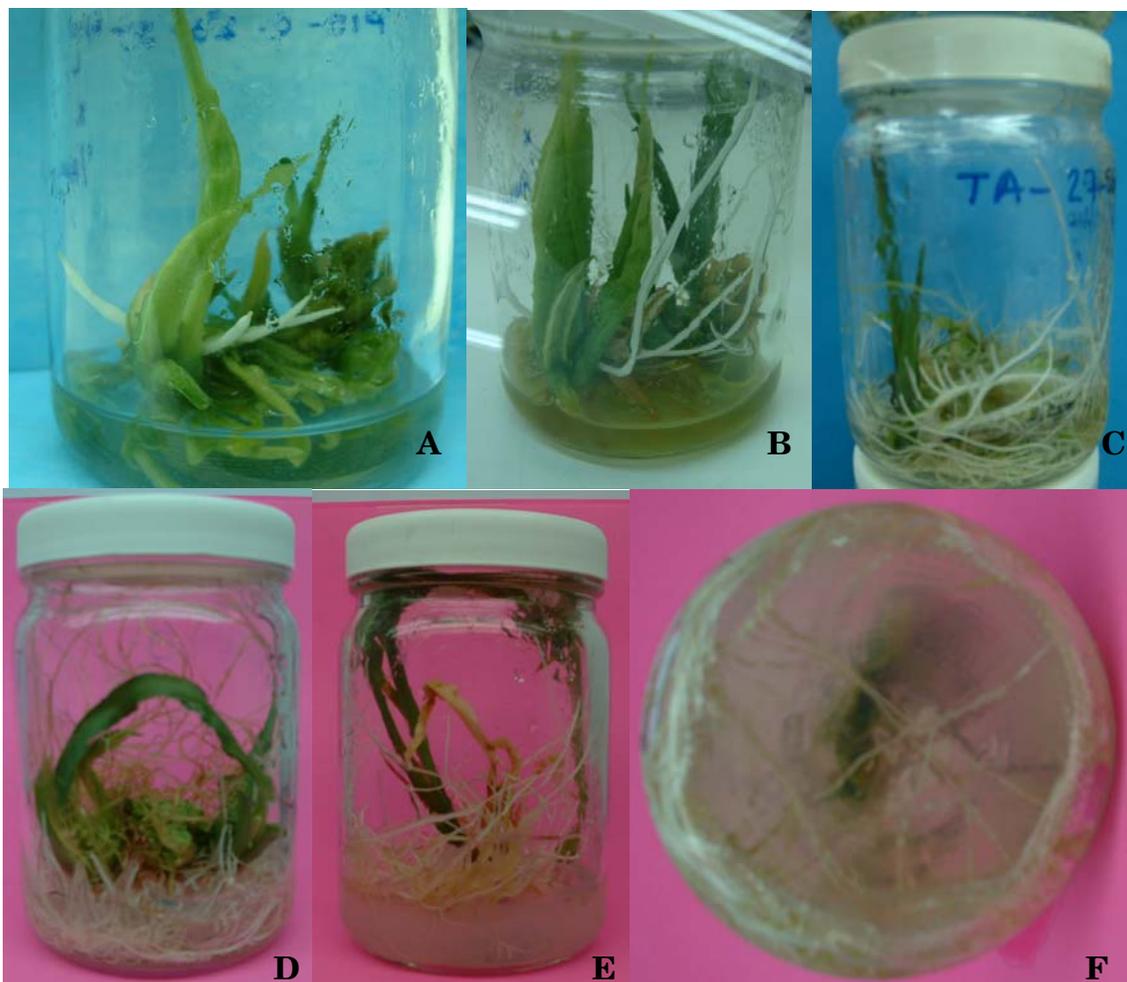


Figura 29. Variación en la capacidad de enraizamiento *in vitro* de los brotes seleccionados por su tolerancia al estrés osmótico. Las primeras cinco imágenes son frontales (A = LE-14, B = LE-46, C = LE-13, D y E) y la última imagen es de la base del frasco (F).

La ausencia de capacidad para el desarrollo de raíces en explantes es algo común, y se considera un evento desfavorable para la propagación y un obstáculo para una rápida multiplicación de genotipos sobresalientes. En *Arabidopsis thaliana* se han detectado 10 proteínas asociadas con el enraizamiento (algunas chaperonas y proteínas inducidas con auxinas), las cuales están involucradas con

el metabolismo de auxinas y del carbono. Esto brinda la posibilidad de generar marcadores bioquímicos asociados con la rizogénesis *in vitro* (Sorin *et al.*, 2005), e indica que esta característica se rige por varios genes.

Cuadro 34. Frecuencia de enraizamiento de brotes seleccionados durante tres ciclos en varios niveles de estrés osmótico con PEG.

Genotipos	PEG (%)	Número de brotes evaluados		Enraizamiento (%)
		Iniciales	Finales con raíz	
LE-13	0	10	4	40.0
	10	11	5	45.5
	15	12	6	50.0
	20	12	1	8.3
LE-14	0	6	2	33.3
	10	8	4	50.0
	15	5	1	20.0
	20	7	5	71.4
LE-16	0	3	0	0.0
	10	5	1	20.0
	15	4	2	50.0
	20	3	0	0.0
LE-46	0	7	0	0.0
	10	11	2	18.2
	15	4	4	100.0
	20	3	1	33.3
<i>Promedio</i>	-	7	2	34

Aclimatación ex vitro de los brotes seleccionados

En este trabajo se intentó la aclimatación de los brotes seleccionados por su tolerancia al estrés osmótico. Sin embargo, no hubo brotes sobrevivientes. En la Figura 30 se muestran algunos brotes en tal proceso dentro de una cámara de crecimiento.

Después de la micropropagación *in vitro*, la aclimatación de las plantas es el cuello de botella. Se considera que las plantas o brotes que crecen *in vitro* en condiciones microambientales favorables dentro de un recipiente, como: bajo nivel de luz, condiciones asépticas, un medio de cultivo con carbohidratos y



nutrimentos que permiten en crecimiento heterotrófico y una atmósfera con alta humedad relativa (Hazarika, 2003); sin embargo, si no existe ventilación se acumula etileno (Seelye *et al.*, 2003).



Figura 30. Proceso de aclimatación de brotes. A) Brotes seleccionados, B) Lavado de raíces y prevención de infecciones mediante inmersión en una solución con fungicida, C) Material desinfectado, D) Introducción de los brotes en un recipiente con sustrato, y E) Desarrollo plántulas en una cámara de crecimiento.

Las plántulas obtenidas de cultivo *in vitro* generalmente son anormales a nivel morfológico, anatómico y fisiológico, por lo que después de su transferencia *ex vitro* estas plantas resultan susceptibles a las condiciones ambientales de invernadero o campo. Por ello es necesario un periodo de aclimatación para desvanecer tales anomalías (Pospisilova *et al.*, 1999); durante este periodo las plantas están en estrés, por lo que presentan lento crecimiento aunado a una significativa mortalidad (Seelye *et al.*, 2003).



Entre las estrategias para el endurecimiento de las plantas *in vitro* están: desarrollar cultivos autótrofos con hojas persistentes y fotosintéticamente activas, encontrar el nivel óptimo de sacarosa para mejorar el enraizamiento y supervivencia, evaluar tratamientos con retardantes del crecimiento para mejorar la calidad de las plántulas regeneradas, disminuir la humedad relativa del recipiente mediante desecantes o agentes osmóticos (como PEG), incrementar tanto la irradiancia como la concentración de CO₂ con ventilación forzada. Otras medidas a tomar durante la aclimatación *ex vitro* son: uso de antitranspirantes para reducir la pérdida de agua, e incrementar la concentración de CO₂ (Pospisilova *et al.*, 1999; Hazarika, 2003).

Durante el cultivo *in vitro* de algunas especies ocurre un desarrollo lento de la cutícula, menor acumulación de ceras epicuticulares, bajo funcionamiento de estomas y menor acumulación de clorofila, características relacionadas con una mayor transpiración en las plantas una vez fuera de los recipientes de cultivo. En consecuencia, durante la aclimatación en el invernadero o en campo ocurren cambios sustanciales en cuanto a la morfología y anatomía, principalmente en la epidermis, grosor de las hojas, diferenciación de mesófilo, la estructura y número de cloroplastos (Pospisilova *et al.*, 1999). Dado que hay variación de las respuestas entre especies, no hay un protocolo general de aclimatación (Seelye *et al.*, 2003). Inclusive, se recomienda que el enraizamiento de los brotes se dé durante la aclimatación (Hazarika, 2003), pues un desarrollo óptimo de las plántulas ocurre cuando han emitido nuevas hojas y raíces en condiciones de invernadero o de campo (Seelye *et al.*, 2003).



V. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye lo siguiente:

- Durante la germinación *in vitro*, LE-13 y LE-14 presentaron las plántulas más vigorosas en altura y número de hojas.
- El pH del medio de cultivo influyó en la inducción de brotes, según el genotipo. LE-13 y LE-16 presentaron la mejor inducción con base al número de explantes con brotes.
- Los explantes basales derivados de la primera y segunda posición a partir del nudo coleoptilar de las plántulas donadoras, mostraron la mejor respuesta organogénica.
- La consistencia del medio de cultivo, el intervalo entre subcultivos y el genotipo, fueron factores influyentes en el crecimiento de los brotes.
- El volumen del recipiente no tuvo efecto durante la organogénesis. Durante la fase de inducción LE-13 presentó los brotes más vigorosos (altura y número de hojas).
- En la etapa de multiplicación sin estrés, con frecuencia de 30 a 50 % los brotes desarrollaron estructuras reproductivas femeninas (jilotes). En esta etapa LE-13 y LE-14 presentaron los brotes más vigorosos.
- La multiplicación de brotes en presencia de PEG en el medio de cultivo, el vigor (altura, número de hojas y peso fresco) de los mismos dependió del genotipo, del nivel estrés osmótico y del ciclo de selección *in vitro*. En tales condiciones LE-13 y LE-14 mostraron brotes de mayor vigor.
- El potencial hídrico y osmótico del tejido foliar de los brotes bajo estrés estuvo influenciado por el genotipo, y la concentración de PEG en el medio de cultivo.
- LE-13 y LE-16 tuvieron el mayor nivel de ajuste osmótico por efecto del estrés inducido con PEG. La naturaleza del ajuste osmótico fue



contrastante en LE-13 y LE-16. El primer genotipo presentó ajuste osmótico debido en mayor parte a la acumulación de solutos en las células del tejido foliar; mientras que el segundo mostró en mayor medida la participación de polímeros insolubles.

- La acumulación de proteína soluble en el tejido de los brotes se vio influenciada por el genotipo, el nivel de selección *in vitro* y la concentración de PEG.
- LE-13 fue la línea que tuvo menor acumulación de proteína soluble con respecto a las restantes. Esta línea junto con LE-14 no afectaron su contenido proteico por influencia del estrés osmótico en un nivel de 20% después de tres ciclos de selección.
- Las mejores líneas fueron LE-14 y LE-16 por presentar mayor ajuste osmótico asociado con la acumulación de polímeros insolubles en el tejido del brote, lo que evidencia que la selección *in vitro* es viable para elegir los mejores genotipos, aunque no sirvió para mejorar el vigor de los brotes en cada genotipo, lo que indica que el peso fresco y seco no son marcadores fisiológicos de la tolerancia de los brotes al estrés osmótico.
- No hubo un patrón confiable de las proteínas por medio de electroforesis.
- La aclimatación de los brotes seleccionados *in vitro* por tolerancia al estrés osmótico no fue exitosa debido al alto porcentaje de mortalidad de los mismos.



VI. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en cada etapa de este trabajo, se sugiere estudiar en investigaciones futuras, los siguientes aspectos:

- Examinar la respuesta de los genotipos al estrés osmótico vía embriogénesis somática a partir de embriones inmaduros, ya que se podría obtener una mejor respuesta en la germinación de embriones que se sometieran al estrés.
- Estudiar detalladamente el ajuste osmótico por efecto de polímeros insolubles derivados de la pared celular, como un posible marcador fisiológico de la tolerancia al estrés osmótico.
- Antes de hacer los análisis de electroforesis de proteínas, es importante examinar la interferencia del PEG presente en el tejido foliar de los brotes durante la extracción, o como alternativa generar un protocolo de lavado del tejido foliar para eliminar el PEG adherido.
- Estudiar el empleo de marcadores moleculares en brotes de maíz sometidos a estrés hídrico.
- Estudiar e identificar proteínas por electroforesis bidimensional.
- Estudiar el proceso de aclimatación de plántulas *ex vitro*.



VII. LITERATURA CITADA

- Abdel-Ghany H M, A A Nawar, M E Ibrahim, Sh A El-Shamarka, M M Selim, and A I Fahmi (2004)** Using tissue culture to select for drought tolerance in bread wheat. In: Fischer T et al (ed). New directions for a diverse planet: Proceedings for the 4th International Crop Science Congress Brisbane, Australia, 26 September- 1 October 2004. Poster 563.
- Abumhadi N, K Kamenarova, E Todorovska, M Stoyanova, G Dimos, A Trifonova, S Tacumi, C Nakamura, H Ansiad, K Gecheff, and A Atanassov (2005)** Biotechnological approaches for cereal crops improvement Part I: Development of *in vitro* culture and Genetic Transformation Technologies in cereals. *Biotechnology & Biotechnology Equipment* 19:72-89.
- Ahmed Z, F Akhter, M S Haque, and H Banu (2001)** Novel micropropagation system. *Journal of Biological Sciences* 1(11):1106-1111.
- Alam M Z, T Stuchbury, R E L Naylor, and M A Rashid (2003)** Water uptake and germination pattern of rice seeds under iso-osmotic solutions of NaCl and PEG, different concentration of CaCl₂ and combinations of NaCl and CaCl₂. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6(12):1059-1066.
- Al-Bahrany A M (2002)** Callus growth and proline accumulation in response to polyethylene glycol induced osmotic stress in rice (*Oriza sativa* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5:1294-1296.
- Atteya A M (2003)**. Alteration of water relations and yield of corn genotypes in response to drought stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 29(1-2):63-76.
- Avendaño A C H, C Trejo L, C López C, J D Molina G, A Santacruz V, y F Castillo G (2005)** Comparación de la tolerancia a la sequía de cuatro variedades de maíz (*Zea mays* L.) y su relación con la acumulación de prolina. *Interciencia* 30(9):560-564.



- Balbín A M I, E Ortega D, M García G, y J Jekov (1987)** Cambios metabólicos provocados por el déficit hídrico en hojas separadas de plantas de caña de azúcar y de maíz. *Ciencias de la Agricultura*. 32:82-87.
- Bänziger M, Edmeades G O, Beck D, and Bellon M (2000)** Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: from theory to practice. CIMMYT, Mexico, DF. 68 p.
- Bartlett M S (1947)** The use of transformations. *Biometrics* 3:39-52.
- Beck E H, S Fettig, C Knake, K Hartig, and T Bhattarai (2007)** Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Bioscience* 32(3):501-510.
- Ben H G (1987)** Relationship between salt tolerance and resistance to polyethylene glycol induced water stress in cultured citrus cells. *Plant Physiology* 85:430-433.
- Benítez B A (2005)** Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas Editorial Reverté. Barcelona, España. 197 p.
- Bhargava S, and S Paranjpe (2004)** Genotypic variation in the photosynthetic competence of *Sorghum bicolor* seedlings subjected to polyethylene glycol mediated drought stress. *Journal of Plant Physiology* 161:125-129.
- Bhaskaran S, R H Smith, and R J Newton (1985)** Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. *Plant Physiology* 79:266-269.
- Blancaflor E B, and K H Hasenstein (1995)** Growth and microtubule orientation of *Zea mays* roots subjected to osmotic stress. *International Journal of Plant Science* 156(6):774-783.
- Bradford M M (1976)**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:255-260.



- Bray E A (2002)** Classification of genes differentially expressed during water deficit stress in *Arabidopsis thaliana* an analysis using microarray and differential expression data. *Annals of Botany* 89:803-811.
- Bressan R A, A K Handa, S Handa, and P M Hasegawa (1982)** Growth and water relations of cultured tomato cells after adjustment to low external water potential. *Plant Physiology* 70:1303-1309.
- Bressan R A, and P M Hasegawa (1981)** Resistance of Cultured Higher Plant Cells to Polyethylene Glycol-Induced Water Stress. *Plant Science Letters* 21:23-30.
- Brown D C W, D WM Leung, and T A Thorpe (1979)** Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiologia Plantarum* 46:36-41.
- Bruce W B, G O Edmeades, and T C Barker (2002)** Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53(366):13-25.
- Campalans A, M Pages, and R Messeguer (2001)** Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*Prunus amygdalus*). *Tree Physiology* 21:633-643.
- Cano E A, F Pérez A, V Moreno, M Caro, and M C Bolarín (1998)** Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 53:19-26.
- Cardone S, S Olmos, y V Echenique (2004)** Variación somaclonal. En: V. Echenique, C. Rubinstein y L. Mroginski (eds). *Biología y mejoramiento vegetal*. INTA, Buenos Aires, Argentina. pp 83-95.
- Carrillo C G, V de la Rosa M G, y O Delgado M L (1993)** Respuesta de células indiferenciadas de *Zea mays* L. al estrés por NaCl. *Acta Mexicana de Ciencia y Tecnología* 11(41):95-101.



- Cassells A C, and B M Doyle (2003)** Genetic engineering and mutation breeding for tolerance to abiotic and biotic stresses: Science, technology and safety. *Bulgarian Journal of Plant Physiology. Special Issue*:52-82.
- Cell Chemical Company (2000)** Polyethylene Glycol. www.cc.com. (Verificada el día 20 de Mayo de 2007).
- Chadler S F, and T A Thorpe (1987)** Characterization of growth, water relations, and proline accumulation in sodium sulfate tolerant callus of *Brassica napus* L. cv Westar (Canola). *Plant Physiology* 84:106-111.
- Chadler S F, K Y Paek, E C Pua, E Ragolsky, B B Mandal, and T A Thorpe (1988)** The effectiveness of selection for salinity tolerance using *in vitro* shoot cultures. *Botanical Gazette* 149(2):166-172.
- Chapman S C, and G O Edmeades (1999)** Selection improves drought tolerance in tropical maize populations: II direct and correlated responses among secondary traits. *Crop Science* 39:1315-1324.
- Charcosset A, and L Moreau (2004)** Use of molecular markers for the development of new cultivars and the evaluation of genetic diversity. *Euphytica* 137:81-94.
- Chaumont F, F Barrieu, E M Herman, and M J Chrispeels (1998)** Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation. *Plant Physiology* 117:1143-1152.
- Chazen O, and P M Neumann (1994)** Hydraulic signals from the roots and rapid cell wall hardening in growing maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to polyethylene glycol induced water deficits. *Plant Physiology* 104:1385-1392.
- Cruz P A B, V A González H, Ma del C Mendoza C, y Ma L Ortega D (2003)** Marcadores fisiológicos de la tolerancia al envejecimiento de semilla en maíz. *Agrociencia* 37:371-381.



- Cubero J I (2003)** Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Ediciones Mundi Prensa. España. 567 p.
- Cushman J C (2003)** Functional genomics of plant abiotic stress tolerance. In: R A Prade, H J Bohnert (eds). Genomics of plants and Fungi. Marcel Dekker, Inc. USA. pp 315-357.
- De Oliveira C C E, A W P Ferreira F, and M Vinicius S (2004)** Temperature and pH of the nutrient solution on wheat primary root growth. Science Agriculture 61:313-318.
- Dhindsa R S, J D Bewley (1977)** Water stress and protein synthesis. Plant Physiology 59:295-300.
- Dracup M (1991)** Increasing salt tolerance of plants through cell culture requires greater understanding of tolerance mechanisms. Australian Journal of Plant Physiology 18:1-15.
- Dragiiska R, D Djilianov, P Denchev, and A Atanassov (1996)** *In vitro* selection for osmotic tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Bulgarian Journal of Plant Physiology 22(3-4):30-39.
- Dudley J W (1993)** Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. Crop Science 33:660-668.
- Dumont B N, A Mazari, N J Livingston, P Von Aderkas, M R Becwar, R E Percy, and S E Pond (1996)** Water relations a parameters and tissue development in somatic and zygotic embryos of three pinaceous conifers. Amerina Journal of Botany 83(8):992-996.
- Earle E D and A R Kuehnle (1990)** Somaclonal variation in maize. In: Y P S Bajaj (Editor) Biotechnology in agriculture and forestry, Volume II. Springer Verlag Berlin Heilderberg. pp 326-351.
- Edmeades G O, J Bolaños, S C Chapman, H R Laffite, and M Banziger (1999)** Selection improves drought tolerance in tropical maize populations:



I. Gains in biomass, grain, yield, and harvest index. *Crop Science* 39:1306-1315.

Edwards K L, and M H Goldsmith (1980) pH dependent accumulation of indolacetic acid by corn coleoptile sections. *Planta* 147:457-466.

Errabii T, C B Gandonou, H Essalmani, J Abrini, N Idaomar, and N S Senhaji (2006) Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. *African Journal of Biotechnology* 5(16):1488-1493.

Espinosa P N, F Montiel A, y J L Rodríguez O (2001) Efecto del déficit hídrico en el patrón electroforético de proteínas totales en dos variedades de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 24(1):121-128.

Eudes F, S Acharya, A Laroche, L B Selinger, and K J Cheng (2003) A novel method to induce direct somatic embryogenesis secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. *Plant Cell Tissue and Organ Cultures* 73:145-157.

Fehr W R (1993) Principles of cultivar development. Volume 1. Theory and Technique. Iowa State University. Ames, Iowa, USA. 536 p.

Flores H A (2001) Introducción a la Genotecnia Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 131 pp.

FAS-USDA (Foreign Agricultural Service - United States Department of Agriculture) (2007) World Corn Trade.
(http://www.fas.usda.gov/grain_arc.asp. Consultada en Agosto de 2007).

Fragoso P E M, G F Gutiérrez H, y J Virgen V (2006) Repercusiones físicas y fisiológicas del envejecimiento natural de semillas de cruza simples de maíz y sus líneas progenitoras. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29:75-80.



- Gallé A, J Csiszar, I Tari, and L Erdei (2002)** Changes in water and chlorophyll fluorescence parameters under osmotic stress in wheat cultivars. *Acta Biologica Szegediensis* 46(3-4):85-86.
- García A, M Florido, I Pérez, R M Lara, M C González, y M T Marrero (1999)** Estabilidad de la membrana y contenido de proteínas totales en callos de arroz sometidos a estrés hídrico. *Cultivos Tropicales* 20(3):17-20.
- García B E (1999)** El 85 % del cultivo del maíz es de temporal. *Agro Síntesis* 31:20-22.
- García B J (2001)** Los primeros pobladores de México: cenolítico superior y protoneolítico. *Arqueología Mexicana*. Vol IX. No.52: 52-57.
- Girma F S, and D R Krieg (1992)** Osmotic adjustment in sorghum. *Plant Physiology* 99:577-582.
- González R H, S Salazar G, G Ramirez R, J L Rodriguez O, y A C Ramos V (2003)** Preliminary results on *in vitro* selection for tolerance to chloride excess in avocado. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 9(1):39-43.
- Granados S D y G F López (1996)** Agroecología. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 420 pp.
- Gu R, Q Liu, D Pei, and X Jiang (2004)** Understanding saline and osmotic tolerance of *Populus euphratica* suspended cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68:261-264.
- Gunn R E, and P R Day (1986)** *In vitro* Culture in plant Breeding. *In*: L A Withers, P G Alderson. (editors). *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Butterworths. England. pp:313-327.
- Hallauer A R, and J B Miranda F (1981)** Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State University. Amess, Iowa, USA. 468 p.



- Handa A K, and R Bressan A (1982)** Characteristics of Cultured Tomato Cells after Prolonged Exposure to Medium Containing Polyethylene Glycol. *Plant Physiology* 69:514-521.
- Hasegawa P M, R Bressan, S Handa, and A K Handa (1984)** Cellular mechanisms of tolerance to water stress. *Horticultural Science* 19(3):371-373.
- Hazarika B N (2003)** Acclimatization of tissue cultured plants. *Current Science* 85(12):1704-1712.
- Hibon A, B Triomphe, M López P, and L Saad (1992)** La producción de maíz de temporal en México: tendencias y retos tecnológicos e institucionales para los investigadores. CIMMYT. México. 46 p.
- Hirano Y, T Terai, K Goto, and A Nakajima (1991)**. Effect of polyethylene glycol on the synthesis of oligopeptide by papain in and organic medium. *Agricultural and Biological Chemistry* 55(10):2461-2465.
- Hofmann N, R L Nelson, and S S Korban (2004)** Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 77:157-163.
- Hohl M, and P Schopfer (1991)** Water relations of growing maize coleoptiles. Comparison between manitol and polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiology* 95:716-722.
- Infante G S, y L Calderón A (1980)** Manual de análisis probit. Colegio de Postgraduados. Centro de Estadística y Cálculo. México. 105 p.
- Iracheta D L (2002)** Caracterización fisiológica, bioquímica e histológica de *Zea mays* L. *in vitro* al déficit hídrico. Tesis Doctor en Ciencias especialista en Genética. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, México. 121 p.



- Iracheta D L, Ma C. López P, V A González H, I Sánchez C, y E Cárdenas S (2003)** Variación genotípica en la capacidad organogénica *in vitro* del maíz. *Agrociencia* 37:451-465.
- Iraki N M, R A Bressan, P M Hasegawa, and N C Carpita (1989)** Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth limited plant cells adapted to osmotic stress. *Plant Physiology* 91:39-47.
- Jackson M B (2003)** Aeration stress in plant tissue cultures. *Bulgarian Journal of Plant Physiology, Special Issue*: 96-109.
- Jagtap V, S Bhargava, P Streb, and J Feierabend (1998)** Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L) Moench. *Journal of Experimental Botany* 49 (327):1715-1721.
- Jauhar P P (2006)** Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: the prospects and challenges. *Crop Science* 46:1841–1859.
- Jia W, J Zhang, and J Liang (2001)** Initiation of water deficit induced abscisic acid accumulation in maize leaves and roots: cellular accumulation in maize leaves and roots: cellular volume and water relations. *Journal of Experimental Botany* 52 (355):295-300.
- Jiang M, and J Zhang (2002)** Water stress induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* 53(379):2401-2410.
- Juárez M J, and G Carrillo C (2003)** Producción de biomasa y capacidad de rediferenciación en cultivos *in vitro* de caña de azúcar sometidos a estrés por cloruro de sodio y kanamicina. *Biotecnología Aplicada* 20:155-159.
- Jyoti H R D, and T M Varghese (1990)** Explant cultures of maize (*Zea mays* L.) raised under water deficit and waterlogged conditions. *New Phytologist* 116:325-330.



- Kerepesi I, and G Galiba (2000)** Osmotic and salt stress induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science* 40:482-487.
- King P, and K Shimamoto (1983)** Maize. In: D A Evans, W R Sharp, P V Ammirato, and Y Yamada (Editors) *Handbook of plant cell culture*, Volume 1. Mc Millan Publishing Company, N. Y. pp 69-91.
- Kocheva K, and G Georgiev (2003)** Evaluation of reaction of two contrasting barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar in response to osmotic stress with PEG 6000. *Bulgarian Journal of Plant Physiology, Special Issue*:290-294.
- Kohlenbach H W, and W Wernicke (1978)** Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 86:463-472.
- Kong N K, S Daduang, C Wongkham, S Bunnang, M Kossittrakun, and P Theerakulpisut (2005)** Protein profiles in response to salt stress in leaf sheaths of rice seedlings. *Science Asia* 31:403-408.
- Kramer P J (1980)** Drought Stress, and Origin of Adaptations. In N C Turner, P J Kramer (Eds). *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. John Wiley and Sons. USA. pp
- Lebrum L, K Rajasekaran, and M G Mullis (1985)** Selection *in vitro* for NaCl tolerance in *Vitis rupestris* Scheele. *Annals of Botany* 56:733-739.
- Levitt J (1980)** Responses of plants to environmental stresses. Vol II: water, radiation, salt and other stresses. Academic Press USA. 606 p.
- Li W, P Masilamany, K J Kasha, and K P Pauls (2002)** Developmental, tissue culture, and genotypic factors affecting plant regeneration from shoot apical meristems of germinated *Zea mays* L. seedlings. *In Vitro Cell Development Biology* 38:285-292.
- Lim S (2006)** Sorghum gene expression modulated by water deficit and cold stress. Thesis of Master of Science. Texas A&M University. pp 65.



- Liu H, Y Liu, B Yu, Z Liu, and W Zhang (2004)** Increased polyamines conjugated to tonoplast vesicles correlate with maintenance of the H⁺-ATPase and H⁺-PPase activities and enhanced osmotic stress tolerance in wheat. *Journal of Plant Growth Regulation* 23:156-165.
- Liu X, and W V Baird (2003)** Differential expression of genes regulated in response to drought or salinity stress in sunflower. *Crop Science* 43:678-687.
- López A L, y L López L (1996)** El pasado indígena. El Colegio de México. Fideicomiso Historia de las Américas. Fondo de Cultura Económica. México. 306 p.
- López C G, G M Banowetz, C J Peterson, and W E Kronstand (2003)** Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. *Crop Science* 43:577-582.
- López I L A (2003)** Perspectivas de la red maíz para 2003. FIRA- Banco de México. 28 pp.
- Lu Z, and P M Neumann (1998)** Water stressed maize, barley and rice seedlings show species diversity in mechanisms of leaf growth inhibition. *Journal of Experimental Botany* 49(329):1945-1952.
- Luna F M, J R Gutiérrez S (1998)** Mejoramiento genético de maíz de temporal en la región centro norte de México. *Rev. Fitotec. Mex.* 21(2):147-158.
- Lupotto E, M C Lusardi, and M Mongodi (1989)** *In vitro* selection of maize (*Zea mays* L) salt tolerant somaclones and plant regeneration. *Genetics and Breeding* 43:215-222.
- Lutts S, J M Kinet, and J Bouharmont (1996)** Effects of various salts and mannitol on ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) callus cultures. *Journal of Plant Physiology* 149:186-195.



- Ma Q, D W Turner, D Levy, and W A Cowling (2004)** Solute accumulation and osmotic adjustment in leaves of *Brassica* oil seeds in response to soil water deficit. *Australian Journal of Agricultural Research* 55:939-945.
- Mahajan S, and N Tuteja (2005)** Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139-158.
- Maiti R K, L E Delgado A, S Ibarra C, A M Ontiveros D, M De la Rosa I, and H De Leon C (1996)** Genotypic variability in maize cultivars (*Zea mays* L.) for resistance to drought and salinity at the seedling stage. *Journal of Plant Physiology* 148:741-744.
- Marcum K B (2002)** Growth and physiological adaptations of grasses to salinity stress. In: M Pessarakli (Ed) *Handbook of Plant and Crop Physiology*. Second edition. Marcel Dekker Inc. New York. pp: 623-632.
- Márquez S F (1985)** Genotecnia vegetal. Tomo I. AGT Editor, S. A. 357 p.
- Martínez J P, S Lutts, A Schanck, M Bajji, and J M Kinet (2004)** Is osmotic adjustment for water stress resistance in the mediterranean shrub *Atriplex halimus* L.. *Journal of Plant Physiology* 161:1041-1051.
- Mata G B (2001)** México rural: políticas para su reconstrucción. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 393 pp.
- Materechera S A, A R Dexter, A M Alston, and J M Kirby (1992)** Growth of seedlings roots in response to external osmotic stress by polyethylene glycol 20000. *Plant and Soil* 143:85-91.
- Mejía C J (2001)** Inducción de organogénesis *in vitro* de maíz y multiplicación en condiciones de estrés hídrico. Tesis Maestría en Ciencias especialista en Genética. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, México. 117 p.
- Mercado J A, M A Sancho C, S Jiménez B, R Perán Q, F Pliego A, and M A Quesada (2000)** Assessment of *in vitro* growth of apical stem sections and



adventitious organogénesis to evaluate salinity tolerance in cultivated tomato. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 62:101-106.

Michel B E, and M R Kaufmann (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51:914-916.

Millán L J S (1999) Gestionó Sinaloa sobrepeso para el maíz. *Agro Síntesis* 31:18-19.

Ming L, G Xuan W, and J Sheng L (2003) Application of external calcium in improving the PEG induced water stress tolerance in liquorice cells. *Botanical Bulletin of the Academy Sinica* 44:275-284.

Miranda C S (1998) El mejoramiento genético del maíz en la época prehispánica. En: Cuevas S J A, E Cedillo P, A Muñoz O, P Vera C (Eds). *Lecturas de Etnobotánica. PNE. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.* 267-282 p.

Moinuddin, and R K Chopra (2004) Osmotic Adjustment in chickpea in relation to seed yield and yield parameters. *Crop Science* 44:449-455.

Molina G J D (1992) Introducción a la genética de poblaciones y cuantitativa. AGT Editor, S. A. México. 350 p.

Morales A, M L Ortega D, J Molina G, and E Sanchez de J (1999) Importance of rubisco activase in maize productivity based on mass selection procedure. *Journal of Experimental Botany* 50 (335):823-829.

Morales I M (1997) Maíz y neoliberalismo. Nuevas realidades viejas interpretaciones. En: Torres S G, M Morales I. *Maíz, tortilla. Políticas y alternativas.* (Eds). PUAL. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 57-70 p.

Murashige T, and F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-479.



- Nabors M W (1992)** Environmental stress resistance. In: P J Dix (ed). Plant cell line selection. VCH. New York. USA. 167-186.
- Nagy Z, and G Galiba (1995)** Drought and salt tolerance are not necessarily linked: a study on wheat varieties differing in drought tolerance under consecutive water and salinity stresses. *Journal of Plant Physiology* 145:168-174.
- Nedjimi B, Y Daoud, and M Touati (2006)** Growth, water relations, proline and ion content of *in vitro* cultured *Atriplex halimus* sp. *schweinfurthii* as affected by CaCl₂. *Communications in Biometry and Crop Science* 1(2):79-89.
- Newton R J, S Bhaskaran, J D Puryear, and R H Smith (1986)** Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. *Plant Physiology* 81:626-629.
- Nguyen H T (2000)** Molecular dissection of drought resistance in crop plants: from traits to genes. In: Ribaut, J M, D Poland (eds.). *Molecular Approaches for the Genetic Improvement of Cereals for Stable Production in Water Limited Environments. A strategic planning workshop held at CIMMYT, El Batan, México. 21-25 June 1999. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo.* 36-40 p.
- Nonogaki H (2006)** Seed germination. The biochemical and molecular mechanisms. *Breeding Science* 59:93-105.
- Nuez F, y J M Carrillo (2000)** Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 579 p.
- Nulsen R A, and G W Thurtell (1980)** Effects of osmotic around the roots on water uptake by maize plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 7:27-34.



- Núñez D L, C A Muñoz R, V R Reyes G, I Velasco V, y H Gadsden E (2007)** Caracterización de la sequía a diversas escalas de tiempo en Chihuahua México. *Agrociencia* 41(3):253-262.
- Ochatt S J, P L Marconi, S Radice, P A Arnozis, and O H Caso (1999)** *In vitro* recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 55:1-8.
- Ogawa A, and A Yamauchi (2006a)** Root osmotic adjustment under osmotic stress in maize seedlings 1. Transient change of growth and water relations in roots in response to osmotic stress. *Plant Production Science* 9(1):27-38.
- Ogawa A, and A Yamauchi (2006b)** Root osmotic adjustment under osmotic stress in maize seedlings 2. Mode of accumulation of several solutes for osmotic adjustment in the root. *Plant Production Science* 9(1):39-46.
- Ogawa A, C Kawashima, and A Yamauchi (2005)** Sugar accumulation along the seminal root axis, as affected by osmotic stress in maize: a possible physiological basis for plastic lateral root development. *Plant Production Science* 8(2):173-180.
- Ortiz M, H Silva, P Silva, y E Acevedo (2003)** Estudio de parámetros hídricos foliares en trigo (*Triticum aestivum* L.) y su uso en selección de genotipos resistentes a sequía. *Revista Chilena de Historia Natural* 76:219-233.
- Ovalle V F, y E López G (1997)** La reestructuración de la producción maicera nacional. En: Torres S G, M Morales I. Maíz, tortilla. Políticas y alternativas. (Eds). PUAL. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp. 101-130.
- Pandey R, and R M Agarwal (1998)** Water stress induced changes in proline contents and nitrate reductase activity in rice under light and dark condition. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 4:53-57



- Pauk J, F Ertugrul, T Bartok, O Kiss, L Cseuz, and D Dudits (2002)** Improvement of wheat abiotic stress resistance via genetic transformation. Proceedings of the 7th. Hungarian Congress on Plant Physiology S1-02.
- Peláez A I, E Ortega D, y A González M (1987)** Variación en el contenido de proteínas solubles en laminas foliares de caña de azúcar sometidas déficit hídrico. Ciencias de la Agricultura 32:89-94.
- Pellegrineschi A, J M Ribaut, R Trethowan, K Yamaguchi S, and D Hoisington (2002)** Progress in the genetic engineering of wheat of water limited conditions. JIRCAS Working Report: 55-60.
- Pérez A E, M T Estan, M Caro, and G Guerrier (1993a)** Osmotic adjustment in *Lycopersicum esculentum* and *L. pennellii* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses. Physiologia Plantarum 87:493-498.
- Pérez E A, L F Pateña, and M L Logroño (1993b)** Embryogenic and organogenic callus induction, maintenance and plantlet regeneration in maize (*Zea mays* L) cv IPB Var 4 and inbred line Pi23. Phillippines Journal of Crop Science 18(1):31-35.
- Pérez M B E, M Gidekel, y N Ochoa A (2000)** Efecto del NaCl en el crecimiento y en los patrones de proteínas en raíz de tres variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). Scientiae Naturae 2:5-20.
- Picca A, M Helguera, N Salomón, y A Carrera (2004)** Marcadores moleculares. En: V Echenique, C Rubinstein, L Mroginski (eds). Biotecnología y mejoramiento vegetal. INTA, Buenos Aires, Argentina. pp. 61-68.
- Pospisilova J, I Ticha, P Kadlecek, D Haisel, and S Plzakova (1999)** Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Biologia Plantarum 42(4):481-497.
- Pushpam R, and S R S Rangasamy (2000)** Effect of salinity on protein and proline content of callus and seedling of rice. Crop Research 20(2):192-196.



- Raman K, D B Walden, and R I Greyson (1980)** Propagation of *Zea mays* L. by shoot tips culture: a feasibility study. *Annals of Botany* 45:183-189.
- Rathinasabapathi B (2000)** Metabolic Engineering for Stress Tolerance: Installing Osmoprotectant Synthesis Pathways. *Annals of Botany* 86:709-716.
- Reddy P J, and K Vaidyanath (1986)** *In vitro* characterization of salt stress effects and the selection of salt tolerant plants in rice (*Oryza sativa* L). *Theoretical and Applied Genetics* 71:757-760.
- Reisen D, F Marty, and N L Castel (2005)** New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. *BMC Plant Biology* 5:1-13.
- Ribaut J M, G Edgmeades, E Perotti, and D Hoisington (2000)** QTL analyses, MAS results, and perspectives for drought tolerance improvement in tropical maize. In: Ribaut J M, D Poland (eds). *Molecular Approaches for the Genetic Improvement of Cereals for Stable Production in Water Limited Environments*. A strategic planning workshop held at CIMMYT, El Batan, México. 21-25 June 1999. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. pp. 131-136.
- Ribaut J M, M Banziger, J Betrán, C Jiang, G O Edmeades, K Dreher, and D Hoisington (2002)** Use of molecular markers in plant breeding: drought tolerance improvement in tropical maize. In: Kang M. S. (ed). *Quantitative genetics, genomics and plant breeding*. CAB International. pp. 85-99 .
- Riccardi F, P Gazeau, D de Vienne, and M Zivy (1998)** Protein changes in response to progressive water deficit in maize. *Plant Physiology* 117:1253-1263.
- Rodríguez V J (1981)** La oferta y la demanda del maíz en México. Sus proyecciones futuras. En *Memorias del simposio Nacional. El maíz en*



México, su presente, pasado y futuro. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México. pp. 31-54.

- Rodríguez M, Canales E, and Borrás H O (2005)** Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnología Aplicada* 22:1-10
- Romo S, E Labrador, and B Dopico (2001)** Water stress regulated gene expression in *Cicer arietinum* seedlings and plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 39:1017-1026.
- Salekdeh G H, J Siopongco, L J Wade, B Ghareyazie, and J Bennett (2002)** A proteomic approach to analyzing drought and salt responsiveness in rice. *Field Crops Research* 76:199-219.
- Salisbury B F, and C W Ross (1994)** *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericana. México D. F. 700 p.
- Sánchez D, y M J Aguirreolea (2000)** El agua en la planta. En: Azcón B M, M Talón (eds). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc Graw Hill. Ediciones Universidad de Barcelona. España. pp.17-30.
- Santos C L V, S Gomes, and G Caldeira (2000)** Comparative responses of *Helianthus annuus* plants and calli exposed to NaCl: II. Selection of stable salt tolerant calli cell lines and evaluation of osmotic adjustment and morphogenic capacity. *Journal of Plant Physiology* 156:68-74.
- Santos D M, and N Ochoa A (1994)** PEG-tolerant cell clones of chilli pepper: growth, osmotic potentials and solute accumulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 37:1-8.
- Santos M A, T Cámara, P Rogriguez, I Claparols, and J M Torné (1996)** Influence of exogenous proline on embryogenic and organogenic maize callus subjected to salt stress. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 47:59-65.



- Seelye J F, G k Burge, and E R Morgan (2003)** Acclimatizing tissue culture plants: reducing the shock. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society 53:84-90.
- Seki M, J Ishinada, M Narasuka, M Fujita, T Nakajima, A Enju, T Sakurai, M Satou, K Akiyama, K Yamaguchi, P Carninci, J Kawai, Y Hayashizaki, and K Shinozaki (2002)** Monitoring the expression pattern of around 7000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full length cDNA microarray. Functional and Integrative Genomics 2:282-291.
- Seki M, M Narusaka, H Abe, M Kasuga, K Yamaguchi S, P Carninci, Y Hayashizaki, and K Shinozaki (2001)** Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full length cDNA Microarray. The Plant Cell 13:61-72.
- Sharma A D, and P Singh (2003)** Effect of water stress on expression of a 20 kDa cyclophilin like protein in drought susceptible and tolerant cultivars of sorghum. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 12:77-80.
- Sharp R E, V Poroyko, L G Hejlek, W G Spollen, G K Springer, H J Bonhert, and H T Nguyen (2004)** Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. Journal of Experimental Botany 409(55):2343-2351.
- Sharry S E, and J A Teixeira da S (2006)** Effective organogenesis, somatic embryogenesis and salt tolerance induction *in vitro* in the persian lilac tree (*Melia azedarach* L.). In: J A Teixeira da S (editor) Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume II. Global Science Books. pp 317-324.
- Shibli R A, and K Al-Juboory (2002)** Comparative responses of “Nabali” olive microshoot, callus, and suspension cell cultures to salinity and water deficit. Journal of Plant Nutrition 25(1):61-74.
- Shinozaki K (2003)** Drought stresses. In: B Thomas (ed). Encyclopedia of



Applied Plant Science. Elsevier Academic Press. USA. pp. 1471-1477.

Shinozaki K Y, and K Shinozaki (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57:781-803.

Shinozaki K, and K Yamaguchi S (1997) Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiology* 115:327-334.

Siddique M R B, A Hamid, and M S Islam (2000) Drought stress effects on water relations of wheat. *Botanical Bulletin of the Academy Sinica* 41:35-39.

Silva R H, M Ortíz L, y E Acevedo H (2007) Relaciones hídricas y ajuste osmótico en trigo. *Agrociencia* 41:23-34.

Singh N K, A K Handa, P M Hasegawa, and R A Bressan (1985) Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiology* 79:126-137.

Sorin C, L Negroni, T Balliau, H. Corti, M P Jacquemot, M Davanture, G Sandbery, M Zivy, and C Bellini (2005) Proteomic analysis of different mutant genotypes of *Arabidopsis* led to the identification of 11 proteins correlating with adventitious root development. *Plant Physiology* 140:349-364.

Stasolla C, L Van Zyl, U Egertsdotter, D Craig, W Craig, W Liu, and R R Sederoff (2003) The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology* 131:49-60.

Steuter A A, and A Mozafar (1981) Water potential of aqueous polyethylene glycol. *Plant Physiology* 67:64-67.

Sticklen M B and H F Oraby (2005) Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. *In Vitro Cellular & Developmental-Plant Biology* 41:187-200.



- Taiz L, E Zeiger (2006)** Plant Physiology. Fourth Edition. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. California. USA. 764 pp.
- Thiart S (2003)** Manipulation of growth by using tissue culture techniques. In: Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society Volume 53. pp. 61-67.
- Tiel K, G A Enriquez, Y Ceballo, N Soto, A D Fuentes, A Ferreira, Y Coll, M Pujol (2006)** Development of a system for rapid plant regeneration from *in vitro* sugarcane (*Sacharum officinarum* L.) meristematic tissue. Biotecnologia Aplicada 23(1):22-24.
- Tuberosa R, and S Salvi (2006)** Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. Trends in Plant Science 11(8):405-413.
- Tuberosa R, S Salvi, M C Sanguineti, P Landi, M Maccaferri, and S Conti (2002)** Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought stressed maize. Annals of Botany 89:941-963.
- Turner N C, M M Jones (1980)** Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation. In: N C Turner, P J Kramer (Eds). Adaptation of plants to water and high temperature stress. John Wiley and Sons. USA. Pp: 87-103.
- Turrent F A, R Aveldaño S (1997)** Posibilidades técnicas de autosuficiencia sostenible de maíz en México. En: Torres S G, M. Morales I. Maíz, tortilla. Políticas y alternativas. (Eds). PUAL. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 71-100.
- Ueda A, A Kathiresan, M Inada, Y Narita, T Nakamura, W Shei, T Takabe, J Bennett (2004)** Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. Journal of Experimental Botany 55(406):2213-2218.



- Uma S, T G Prasad, and M U Kumar (1995)** Genetic variability in recovery growth and synthesis of stress proteins in response to polyethylene glycol and salt stress in finger millet. *Annals of Botany* 76:43-49.
- Urechean V (2003)** The influence of stress induced by NaCl on the morphogenic aspects of the callus initiated from immature maize embryos. *Bulgarian Journal of Plant Physiology Special Issue*:336-352.
- Vajrabhaya M, W Kumpum, and S Chadchawan (2001)** The solute accumulation: mechanism for drought tolerance in RD23 rice (*Oryza sativa*) lines. *Science Asia* 27:93-97.
- Valentovic P, M luxova, L Kolarovic, and O Gasparikova (2006)** Effect of osmotic stress on compatible solutes contents, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant and Soil Environment* 52(4):186-191.
- Valle V P, y B Lucas F (2000)** Toxicología de alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Nacional de Salud Ambiental. México. 261 p.
- Van der Weele C M, W G Spollen, R E Sharp, T I Bassin (2000)** Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient agar media. *Journal of Experimental Botany* 51 (350):1555-1562.
- Van der Weerd L, M M A E Claessens, T Ruttink, F J Vergeldt, T J Schaafsma, and H V As (2001)** Quantitative NMR microscopy of osmotic stress responses in maize and pearl millet. *Journal of Experimental Botany* 52(365):2333-2343.
- Vega O P C (1988)** Introducción a la teoría de genética cuantitativa. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 398 p.
- Verslues P E, E S Ober, and R E Sharp (1998)** Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiology* 116:1403-1412.



- Wakabayashi K, T Hoson, S Kamisaka (1997)** Osmotic stress suppresses cell wall stiffening and the increase in cell wall bound ferulic and diferulic acids in wheat coleoptiles. *Plant Physiology* 113:967-973.
- Walden D B, R I Greyson, V R Bommineni, D R Pareddy, J P Sanchez, E Banasikowska, and D T Kudirka (1989)** Maize meristem culture and recovery of mature plants. *Maydica* 34:263-275.
- Wellhausen E J (1981)** Razas y variedades mexicanas de maíz y su importancia en el mejoramiento genético. En *Memorias del simposio Nacional. El maíz en México, su presente, pasado y futuro*. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México. pp. 75-86.
- Westgate M E, and J S Boyer (1985)** Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem, and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* 164: 540-549.
- Willadino L, T Camara, N Boget, I Claparols, M Santos, and J M Torne (1996)** Polyamine and free amino acid variations in NaCl-treated embryogenic maize callus from sensitive and resistant cultivars. *Journal of Plant Physiology* 149:179-185.
- Xiong L, H Lee, M Ishitani, J K Zhu (2002)** Regulation of osmotic stress responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 277(10):8588-8596.
- Xiong L, M Ishitani, H lee, J K Zhu (2001)** The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulphurase and modulates cold stress and osmotic stress responsive gene expression. *The Plant Cell* 13:2063-2083.
- Xi J, X Wang, S Li, X Zhou, L Yue, J Fan and D Hao (2006)** Polyethylene glycol fractionation improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome. *Phytochemistry* 67 (2006) 2341–2348.



- Yamaguchi M, H Kato, S Yoshida, S Yamamura, H Uchimiya, M Umeda (2003)** Control *in vitro* of organogenesis by cyclin dependent kinase activities in plants. Proceedings of the National Academy of Science 100 (3):8019-8023.
- Yang L, B Zheng, C Mao, K Yi, F Liu, Y Wu, Q Tao, P Wu (2003)** cDNA-AFLP analysis of inducible gene expression in rice seminal root tips under water deficit. Gene 314:141-148.
- Yeo R A, and T J Flowers (1984)** Nonosmotic effects of polyethylene glycols upon sodium transport and sodium-potassium selectivity by rice roots. Plant Physiology 75:298-303.
- Zair I, A Chlyah, K Sobounji, M Tittahse, H Chlyah (2003)** Salt tolerante improvement in some wheat cultivars alter application of *in vitro* selection pressure. Plant Cell Tissue and Organ Culture 73:237-244.
- Zarco P E, V A González H, Ma C López P, y Y Salinas M (2005)** Marcadores fisiológicos de la tolerancia a sequía en maíz (*Zea mays* L.). Agrociencia 39: 517-528.
- Zhang J, H T Nguyen, and A Blum (1999)** Genetic analyses of osmotic adjustment in crop plants. Journal of Experimental Botany 50(332):291-302.
- Zhong H, C Srinivasan, and M B Sticklen (1992)** *In vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L.) I. Differentiation of multiple shoots clumps and somatic embryos from shoot tips. Planta 187:483-489.
- Zorb C, S Schmitt, A Neeb, S Karl, M Linder, and S Schubert (2004)** The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L) to salt stress is characterized by mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. Plant Science 167:91-100



VIII. APÉNDICE

Cuadro 1 A. Componentes del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962), y concentraciones finales de las hormonas empleadas para la inducción, multiplicación y enraizamiento de brotes de cuatro genotipos de maíz cultivados *in vitro*.

Componente	PM	g L ⁻¹	Molaridad	Inducción mg L ⁻¹	Multiplicación mg L ⁻¹	Enraizamiento mg L ⁻¹
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	80.04	165	2.061469265			
Nitrato de potasio (KNO ₃)	101.108	190	1.8791787			
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	370	37	0.1			
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ .4H ₂ O)	205	1.688	0.008234146			
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	287.54	0.86	0.002990888			
Sulfato cúprico (CuSO ₄ .5H ₂ O)	249.68	0.0024	9.6123E-06			
Cloruro de calcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	440	44	0.1			
Yoduro de potasio (KI)	166.01	0.08	0.000481899			
Cloruro de cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	237.95	0.0024	1.00862E-05			
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	136.09	17	0.124917334			
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	61.86	0.62	0.010022632			
Molibdato de sodio (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	241.95	0.0248	0.000102501			
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	278.028	2.784	0.01001338			
Etilendiaminotetracético (Na ₂ EDTA) Ácido C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₁₀ Na ₂	372.3	3.724	0.010002686			
Ácido indol-3-acético C ₁₀ H ₉ NO ₂ (AIA)	175.18	0.1	0.000570841	1	1	
6-Bencilaminopurina C ₁₂ H ₁₁ N ₅ (BAP)	225.25	0.1	0.000443951	1.5	1.5	
Ácido Giberélico C ₁₉ H ₂₂ O ₆ (AG ₃)	346.37	0.1	0.000288709		1	
Ácido naftalenacético C ₁₂ H ₁₀ O ₂ (ANA)	186.21	0.1	0.000537028			5
Ácido indolbutílico C ₁₀ D ₂ H ₇ NO ₂ (AIB)	203.24	0.1	0.000492029			2.5
(C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n Agar tipo A		6				
Sacarosa		30				50000



Cuadro 2 A. Preparación del buffer de muestra para 50 mL de agua

Reactivo	Cantidad
62 mM Tris-HCl, pH 7.5	0.375 g
20 % Glicerol	10 mL
10% SDS	5 g
5% β -Mercaptoetanol	2.5 mL
Azul de Bromofenol	0.001 g

Cuadro 3 A. Preparación de soluciones para determinar la curva patrón del contenido de proteína. Albúmina de suero bovino (BSA, Sigma®) ($0.25 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)

Tubo Eppendorf	Solución de BSA (μL)	Agua (μL)	Reactivo de Bradford (μL)	Concentración de proteína (μg)
1	0	800	200	0
2	10	790	200	2.5
3	20	780	200	5
4	30	770	200	7.5
5	40	760	200	10
6	50	750	200	12.5
7	60	740	200	15



Cuadro 4 A. Preparación del gel de separación al 12%

Reactivo	Cantidad
H ₂ O dd	3.4 mL
Tris-HCl, pH 8.8, 1.5 M	2.5 mL
Acrilamida-Bisacrilamida (30%).	4.0 mL
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%	0.1 mL
Tetra metil etilen diamina (TEMED)	5.0 µL
Persulfato de amonio (APS) 10%	50 µL

Cuadro 5 A. Preparación del gel apilador al 4 %

Reactivo	Cantidad
H ₂ O dd	6.1 mL
Tris-HCl, pH 6.8, 0.5 M	2.5 mL
Acrilamida-Bisacrilamida (30%).	1.3 mL
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%	0.1 mL
Tetra metil etilen diamina (TEMED)	10 µL
Persulfato de amonio (APS) 10%	50 µL

Cuadro 6 A. Preparación del buffer de corrida 10 X, pH 8.3

Reactivo	Cantidad (g)
SDS	10.0
Tris-base	30.3
Glicina	144.0

Se aforo a 1 L con agua dd y se mantuvo en refrigeración a 4 °C.



Cuadro 7 A. Relación de los doce geles hechos con base en los diferentes tratamientos de PEG y ciclos de selección

Gel (Numero)	Genotipo	Tratamientos de PEG (%) cargados por gel	Ciclos de selección
1	LE-13	0 y 10	Los 3
2	LE-13	0 y 15	Los 3
3	LE-13	0 y 20	Los 3
4	LE-16	0 y 10	Los 3
5	LE-16	0 y 15	Los 3
6	LE-16	0 y 20	Los 3
7	LE-14	0 y 10	Los 3
8	LE-14	0 y 15	Los 3
9	LE-14	0 y 20	Los 3
10	LE-46	0 y 10	Los 3
11	LE-46	0 y 15	Los 3
12	LE-46	0 y 20	Los 3

Cuadro 8 A. Preparación del colorante Comassie para teñir geles

Reactivo	Cantidad
Ácido acético glacial	100 ml
Metanol	150 ml
Azul de Comassie	0.5 g

Se preparó 0.5 L y se aforo con agua dd.



Cuadro 9 A. Preparación de la solución de Ácido Sulfosalicílico al 3 %.

Reactivo	Cantidad
Ácido sulfosalicílico	3 g

Aforar a 100 mL de agua d.

Cuadro 10 A. Preparación de la solución de Ninhidrina ácida.

Reactivo	Cantidad
Ninhidrina ácida	1.25 g
Ácido acético glacial	30 mL
Ácido fosfórico*	20 mL

*Preparado a 6 M (10.15 mL de ácido fosfórico aforados a 25 mL con agua d).

Cuadro 11 A. Preparación de las soluciones para determinar la curva patrón del contenido de prolina

Tubos	Solución Madre de Prolina (µL)	Ácido Sulfo salicílico (µ L)	Contenido de Prolina $C_1V_1=C_2V_2$ (nmol)	Ácido Acético Glacial (µL)	Ninhidrina (µL)
1	20	1980	8	2000	2000
2	50	1950	20	2000	2000
3	100	1900	40	2000	2000
4	200	1800	80	2000	2000
5	400	1600	160	2000	2000
6	600	1400	240	2000	2000
7	800	1200	320	2000	2000
8	1000	1000	400	2000	2000
9	1500	500	600	2000	2000
10	2000	0	800	2000	2000
Blanco					
11	0	2000		2000	2000



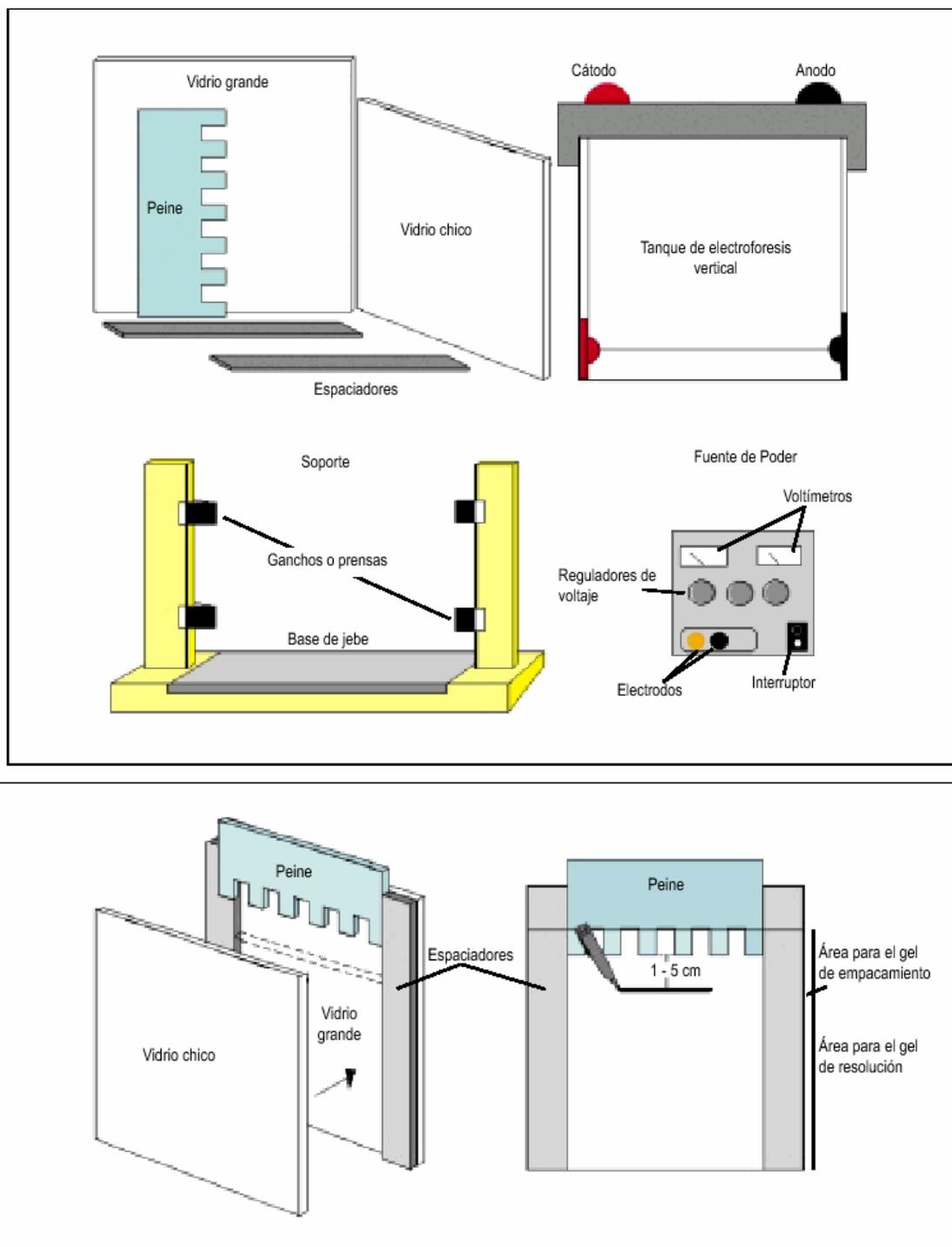


Figura 1A. Forma de ensamblar los vidrios y los espaciadores de una cámara de electroforesis vertical



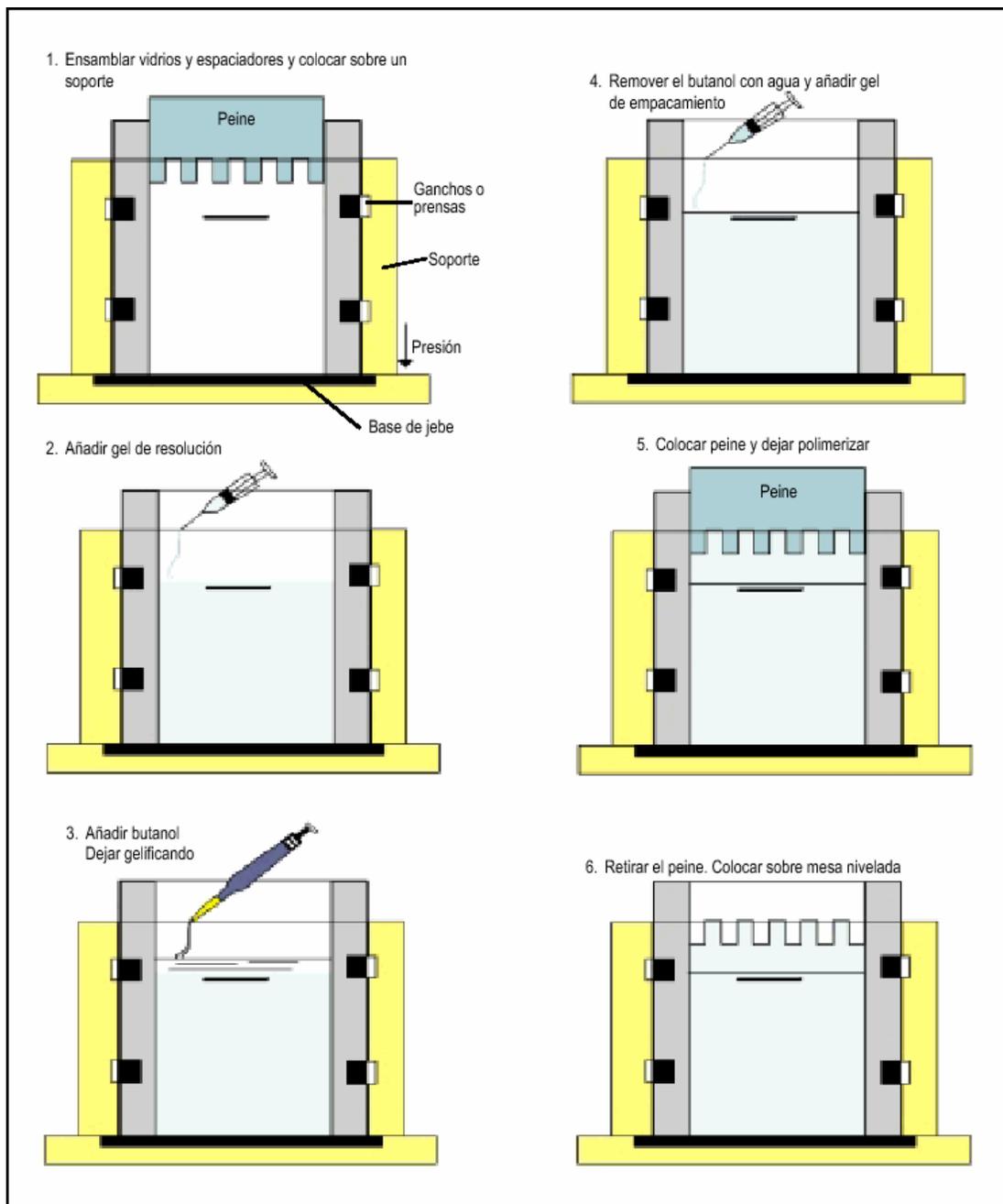


Figura 2A. Procedimiento para el ensamblaje de un modelo de cámara de electroforesis vertical.



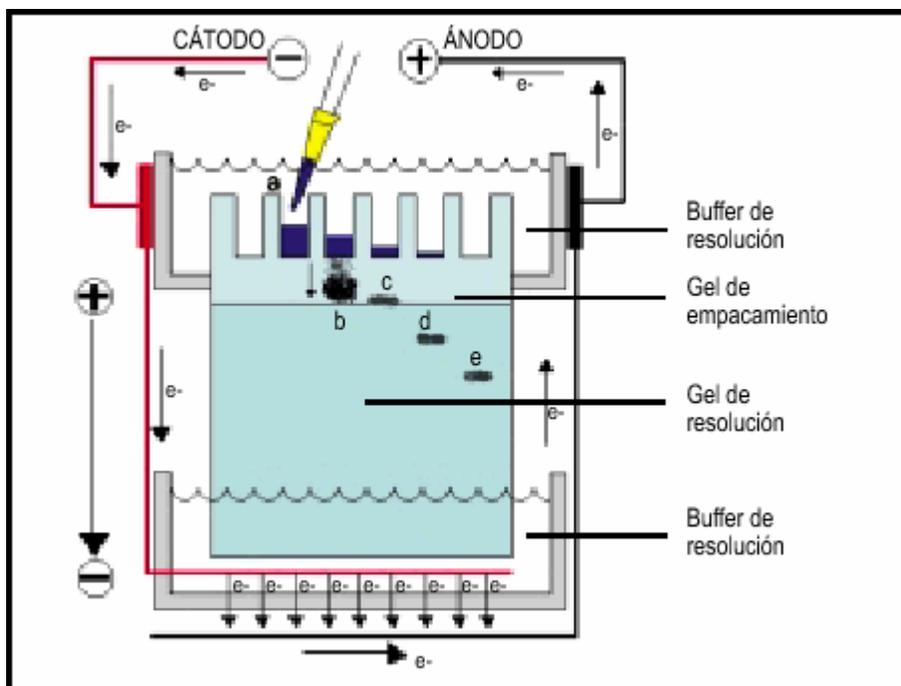


Figura 3A. Interior de una cámara de electroforesis vertical en operación: a) Durante la colocación de la muestra en el pocillo del gel, b) Después de aplicar un voltaje determinado el cual genera el empacamiento uniforme de las proteínas, c, d y e) las proteínas migran hacia el ánodo y se distribuyen en el gel a manera de bandas. (e)=electrón.



