Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología Agropecuaria ISSN: 2448-6620

REGENERACIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES MADUROS S_1 DE LA RAZA DE MAÍZ CÓNICO NORTEÑO DE XICHÚ

Maricruz Martínez Lara[1]; Francisco Chablé Moreno[2]; Alfredo Josué Gámez Vázquez[3]; Francisco Cervantes Ortiz[2]; Jesús Frías Pizano[2]; Ricardo Yáñez López[2]; J. Guadalupe García Rodríguez[2]

[1]Estudiante del Doctorado en Ciencias en producción Agroalimentaria del TecNM-Roque, Carretera Celaya-Juventino Rosas, Km.8, Celaya, México. [2]Docentes del TecNM-Roque, Carretera Celaya Juventino Rosas, Km.8, Celaya, México. [3]Investigador INIFAP-CIAP/BAJIO, Carretera Celaya San Miguel de Allende Kilómetro 6.5, Celaya, Guanajuato. Autor de correspondencia: maricruzml091296@gmail.com

RESUMEN

El maíz es la base de la alimentación de los mexicanos, en este sentido las razas nativas de maíz son de interés como fuente de germoplasma. El cultivo de tejidos es una herramienta a través de la regeneración *in vitro* de embriones maduros de maíz. Esta técnica presenta una limitante por la alta incidencia de contaminación microbiana y la reducción en la capacidad regenerativa respecto a embriones inmaduros. El objetivo fue establecer un protocolo eficiente para la regeneración de plántulas de la raza Cónico Norteño mediante embriones maduros S_1. El diseño experimental se basó en cuatro colectas (AMBC, GPO1, EPO068, SUBP3), cultivadas en medios Murashige y Skoog (MS) al 50% y 100%, suplementados con 0.5 mg L^{-1} de BAP y 0.1 mg L^{-1} de AIA. Se evaluaron las variables longitud de raíz, coleóptilo y plúmula bajo un diseño completamente al azar, aplicando prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Se logró la regeneración directa de embriones maduros, el medio MS al 100% promovió mayor elongación, mientras que MS al 50% favoreció un desarrollo foliar más equilibrado. La eficiencia de regeneración fue elevada: AMBC alcanzó 100%, GPO1 94.4%, EPO068 y SUBP3 88.9%. En conclusión, se demostró que los embriones maduros constituyen una alternativa viable para la regeneración de maíz nativo, alcanzando eficiencias del 80–90% y puede ser usado en programas de mejoramiento genético, dada la disponibilidad y longevidad de la semilla madura.

Palabras clave: *maíz, cónico norteño, embriones maduros, organogénesis directa.*

ABSTRACT

Maize is the staple food of Mexicans, and in this sense, native maize varieties are of interest as a source of germplasm. Tissue culture is a tool for the in vitro regeneration of mature maize embryos. This technique is limited by the high incidence of microbial contamination and the reduced regenerative capacity compared to immature embryos. The objective was to establish an efficient protocol for the regeneration of seedlings of the Northern Conical variety using mature S_1 embryos. The experimental design was based on four collections (AMBC, GPO1, EPO068, SUBP3), cultured in 50% and 100% Murashige and Skoog (MS) media, supplemented with 0.5 mg L^{-1} of BAP and 0.1 mg L^{-1} of IAA. Root length, coleoptile length, and plumule length were evaluated

using a completely randomized design and Tukey's test (α 0.05). Direct regeneration of mature embryos was achieved. The 100% MS medium promoted greater elongation, while the 50% MS medium favored more balanced foliar development. Regeneration efficiency was high: AMBC reached 100%, GPO1 94.4%, EPO068 and SUBP3 88.9%. In conclusion, mature embryos are shown to be a viable alternative for the regeneration of native maize, achieving efficiencies of 80–90%, and can be used in genetic improvement programs, given the availability and longevity of mature seed.

Keywords: *maize, northern conical maize, mature embryos, direct organogenesis.*

INTRODUCCIÓN

El maíz forma parte de la alimentación básica de los mexicanos, el consumo per cápita es de 133.6 kg (FIRA, 2024), se estima que en el 2024 se sembraron 6 millones de hectáreas de maíz de grano blanco y se produjeron 21 millones de toneladas (SIAP, 2024). Sin embargo, a nivel mundial México ocupa el octavo lugar con el 1.9 % de la producción (FIRA, 2024).

La mayor superficie sembrada es por variedades e híbridos, mientras que los maíces nativos son conservados por pequeños productores (Monroy – Sais *et al*., 2024). Los maíces nativos presentan mejor calidad nutricional para la elaboración de alimentos, el conocimiento femenino sobre variedades y procesos de nixtamalización es clave para la conservación *in situ* (Paéz y Astier, 2026). Son una fuente de germoplasma por su amplia variabilidad, resaltado caracteres como la altura de la planta, longitud y número de hileras, así como aquellas de ciclo corto (Velasco – García *et al*., 2023).

El cultivo de tejidos vegetales se fundamenta en la plasticidad y totipotencia celular para la regeneración de ejemplares bajo condiciones de asepsia controlada. De acuerdo con Urías-Salazar et al. (2022), el empleo de explantes variados, como cotiledones, ápices radiculares o semillas, permite la regeneración de plantas libres de patógenos.

Dada a la importancia de los maíces nativos, el empleo de técnicas como el cultivo de tejidos vegetales es una alternativa en el mejoramiento genético; por un lado, puede incrementar la variación genética (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009) mientras por la otra parte permite aumentar los ciclos del cultivo en el mismo año y localidad (Escutia-Ponce *et al*., 2025). De acuerdo a los fines de la investigación, se ha propuesto el cultivo *in vitro* de maíz con el establecimiento de embriones inmaduros ya que este explante es totipotencial para la formación de callos embriogénicos, usados en la transformación genética, pero la capacidad regenerativa, se ha observado que disminuye su totipotencia con la maduración del embrión (Kumar *et al*., 2021).

Además, resultados en investigaciones recientes mencionan que se puede obtener genotipos élites en periodo de tiempo más corto y reducir los tiempos de cosecha, con ello se puede acelerar y aumentar los ciclos del cultivo en un mismo año en un programa de mejoramiento genético, reducir la transmisión de enfermedades por semillas (Escutia-Ponce *et al*., 2025). La principal problemática del cultivo *in vitro* de los embriones maduros es el porcentaje de contaminación de hongos y bacterias ocasionados por el contacto del explante a condiciones ambientales (Tinak *et al*., 2026). Por ello es necesario emplear un método de desinfección eficiente que permita la regeneración del explante. El objetivo de la investigación fue establecer un protocolo para la regeneración de plántulas de maíz a través del cultivo *in vitro* de embriones maduros S_1 de la raza Cónico Norteño.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el campo experimental del TecNM-Roque con ubicación en la Carretera Celaya-Juventino Rosas, Km.8, con una ubicación geográfica de 20° 34´ 54,24" latitud N y 100° 49´ 35,34" Longitud O, con una altura de 1774 msnm, con una temperatura media de 21°C, precipitación media anual de 600 a 800 mm, con un clima de cálido subhúmedo, de acuerdo con la clasificación climática de Köppen (García, 1973) y con predominancia de suelo de tipo vertisol (INEGI, 2017).

La obtención de los materiales fue a través de un ciclo de endogamia (S_1) de cuatro colectas de maíz de la raza Cónico Norteño (AMBC, EPO068, GPO1, SUBP3) en el ciclo otoño-invierno, 2025. La cosecha se realizó a los 50 días después de la polinización, posteriormente se realizó la extracción del embrión. La siembra del embrión se realizó en el medio de cultivo fue en Murashige and Skoog (MS, 1962) al 50% y al 100% (T1 y T2, respectivamente), suplementado con los reguladores de crecimiento reportados por Chablé *et al*. 2017 (0.5 mg L^{-1} de BAP y 0.1 mg L^{-1} AIA), se adicionó 3% de sacarosa y 0.6% de agar Bioxon®, el pH se ajustó a 5.6 ± 0.01.

La desinfección de la semilla se realizó con una solución jabonosa por 25 minutos, seguidamente de tres enjuagues hasta la eliminación de la espuma, posteriormente se colocó en etanol al 70% (v/v) por 10 minutos y en hipoclorito de sodio al 10 % (v/v) por 25 minutos, realizando tres enjuagues entre cada solución con agua destilada estéril. Finalmente, la semilla se colocó con agua estéril en la campana de flujo laminar por 24 h. El endospermo fue extraído mediante una disección longitudinal con un bisturí, sembrando el embrión con la aleurona, el escutelo y la radícula en contacto con el medio de cultivo. Después de seis días del establecimiento *in vitro* la plántula con desarrollo radicular y foliar se llevó a condiciones *ex vitro*. La aclimatación se realizó en recipientes de 1 L, el sustrato fue Peat moss humedecido a capacidad de campo, antes de la siembra se aplicó una solución de Captan® y Cupravit® al 0.5% (v/v).

Las plántulas se extrajeron de los contenedores de vidrio y con un pincel y agua estéril se eliminó el medio de cultivo de la superficie radicular, posteriormente se colocaron en Captan al 0.5% (v/v) por 3 min y se realizó un enjuague con agua estéril. Los recipientes fueron sellados con bolsas plásticas para mantener un microclima y evitar la deshidratación del tejido, el control de hongos se realizó con la misma solución antifúngica. Dado al estrés al proceso de aclimatación, fue necesario realizar el corte de la plúmula a la altura del coleóptilo, esto permitió en desarrollo foliar, durante siete días la plántula se mantuvo en condiciones controladas, antes de trasplantar a campo se colocaron en invernadero por siete días más.

Las variables evaluadas fueron longitud de raíz (LongRa), longitud de coleóptilo (LongC) y longitud de plúmula (LongPLum), el diseño experimental fue completamente al azar y se aplico una prueba de comparación de medias de Tukey (α 0.5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza (ANVA) en el tratamiento 1 y 2 no mostró diferencias significativas ($p \geq 0.05$) en la longitud de la plúmula (LongPlum), en el tratamiento 1 el vigor de las plantas fue raquítico, desarrollando tallos delgados (Figura 1). En la longitud radicular (LongRa) y la longitud de coleóptilo el tratamiento 1 hubo diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$), la endogamia en EPO068 y GPO1 presentaron buen desarrollo radicular (Figura 1b y 1c), en cuanto a Subp3 no se promovió la rizogénesis (Figura 1d), AMBC presentó 3 cm de longitud de coleóptilo, mientras que el resto 2 cm (Cuadro 1). En el tratamiento 2, no hubo diferencias significativas ($p \geq 0.05$) en LongRa, pero la rizogénesis fue mayor que en el tratamiento 1 (Figura 2), en la longitud del coleóptilo (LongCol) el ANVA mostró diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre las S_1, pero tuvo la misma tendencia en el tratamiento 1 (Cuadro 1). El coeficiente de variación fue superior a 20%, esto se atribuye al nivel de endogamia y la variabilidad de la raza.

Cuadro 1. Prueba de comparación de medias de regeneración *in vitro* de embriones maduros S_1 de cónico norteño

	Tratamiento 1			Tratamiento 2		
S_1	LongRa	LongCol	LongPlum	LongRa	LongCol	LongPlum
AMBC	1.25 ab	3.54 a	1.14 a	1.55 a	3.60 a	1.76 a
GPO1	1.64 a	2.61 b	0.81 a	1.58 a	2.80 b	1.79 a
EPO068	1.54 a	2.58 b	1.24 a	1.54 a	2.92 ab	2.14 a
SUBP3	0.90 b	2.09 b	0.64 a	1.02 a	2.54 b	1.54 a

Los valores en la misma columna con la misma letra son estadísticamente iguales, Primer ciclo de endogamia (S_1), Cónico norteño de Xichú adaptado a Ambiente Celaya (AmbC), Longitud de raíz (LongRa), Longitud de coleóptilo (LongCol), Longitud de plúmula (LongPlum).

Ye *et al*. (2022) establecieron con la eficiencia de la caulogénesis en embriones maduros de maíz, a diferencia de los sistemas basados en tejidos inmaduros, la disponibilidad escalable y la longevidad de las semillas maduras facilitan su implementación en programas de mejora con el apoyo de cultivo de tejidos vegetales. Este enfoque mitiga las limitaciones asociadas con la estacionalidad de los embriones inmaduros. En nuestra investigación el uso de semillas maduras representa una ventaja, dada la variabilidad y la cantidad de semilla obtenida durante el proceso de endogamia, se logró la regeneración a través de la organogénesis directa de los embriones maduros.

Así mismo, Kumar *et al*. (2021) empleo embriones maduros, el embrión fue aislado después de tres días de imbibición, sus resultados mostraron la regeneración a través de organogénesis indirecta, menciona que la auxina 2,4-D fue eficaz mientras que el uso de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y ácido naftalenacético (ANA) no tuvo efecto en el número de brotes, pero logró regenerar una planta por embrión, resultados en esta investigación al emplearse BAP y ácido Indolacético (AIA), se logró la regeneración completa de la planta a partir del por embrión aislado (Figura 3), dentro de esta investigación uno de los objetivo fue establecer una metodología eficaz para la regeneración directa de embriones maduros, con la finalidad de ser empleada en el futuro en programas de mejoramiento de maíz. En este sentido, es de importancia evitar la caulogénesis, la organogénesis indirecta puede presentar variabilidad somaclonal resultando en modificaciones genéticas y epigenéticas, mientras que la organogénesis directa se obtienen plantas genéticamente más estables (Majumder *et al*., 2025), dentro de la raza cónico norteño se presenta alta heterogeneidad y se espera homogenizar los genotipos a través de los ciclos de selección.

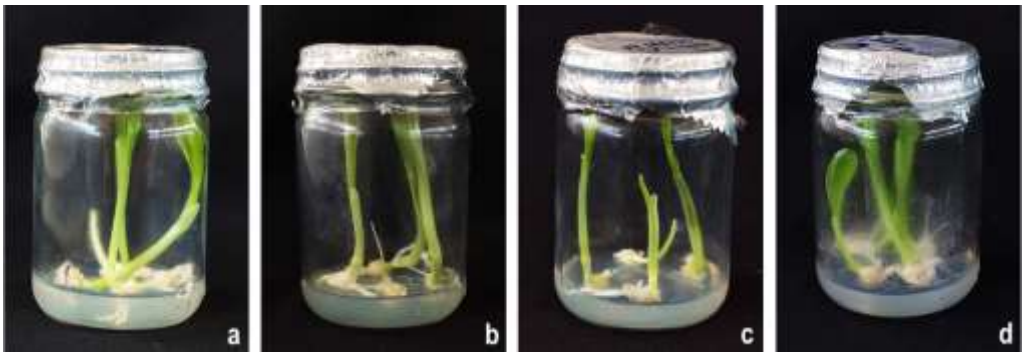

Figura 1. Tratamiento 1(MS al 100% adicionado con 0.5 mg L^{-1} de BAP y 0.1 mg L^{-1} AIA). a) AMBC, b) EPO068, c) GPO1 y d) SUBP3

El proceso de desinfección no afectó la viabilidad del embrión para AMBC se obtuvo el 100% de regeneración, en GPO1 el 94.4%, en EPO 068 el 88.9% y en la SUBP3 el 88.9%, Morshed et al. (2014) obtuvo del 25 al 75% de la regeneración de embriones maduros en cuatro variedades de maíz. Cabe mencionar que Morshed *et al*. (2014) realizó la siembra de la semilla sin retirar el endospermo, mientras que en esta investigación se

emplearon embriones aislados, esta metodología resulta más eficiente para la regeneración de plantas de maíz a través de embriones maduros. Al usar concentraciones más altas de MS (100%) las plántulas presentado mayor longitud, esto ocasionó que algunas plántulas comenzaran a necrosar, en MS (50%) las plántulas fueron de porte más bajo, pero con buen desarrollo foliar.

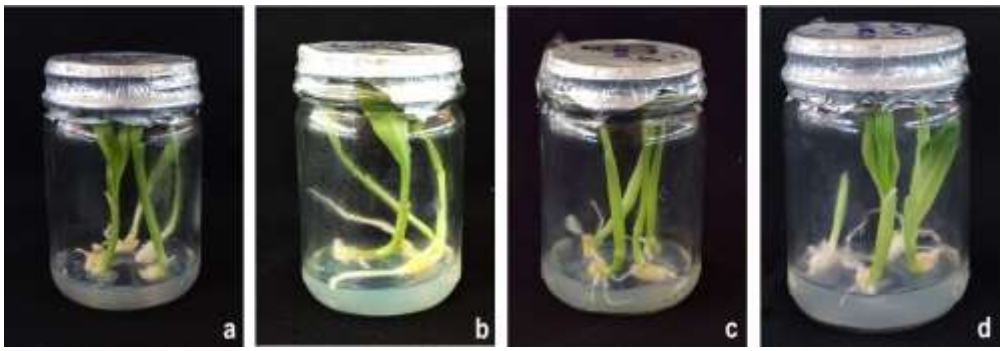

Figura 1. Tratamiento 2 (MS al 50% adicionado con 0.5 mg L^{-1} de BAP y 0.1 mg L^{-1} AIA). a) AMBC, b) EPO068, c) GPO1 y d) SUBP3

Una de las principales limitantes del uso de embriones maduros en el cultivo de tejidos es el porcentaje de contaminación, como consecuencia de la exposición a agentes contaminantes (principalmente a hongos y bacterias), dentro de las selecciones de S_1 evaluadas se observó alta contaminación en AMBC (75%), en el resto fue mínima (5%), investigaciones de Demisse *et al*. (2008) mencionan que el método de desinfección de semilla no fue el adecuado, se logró obtener el 95% de germinación, pero la contaminación fue alta 81.5%, al modificar el protocolo redujo al 22% de tal modo que logro regenerar dos líneas endogámicas de maíz por vía organogénesis indirecta.

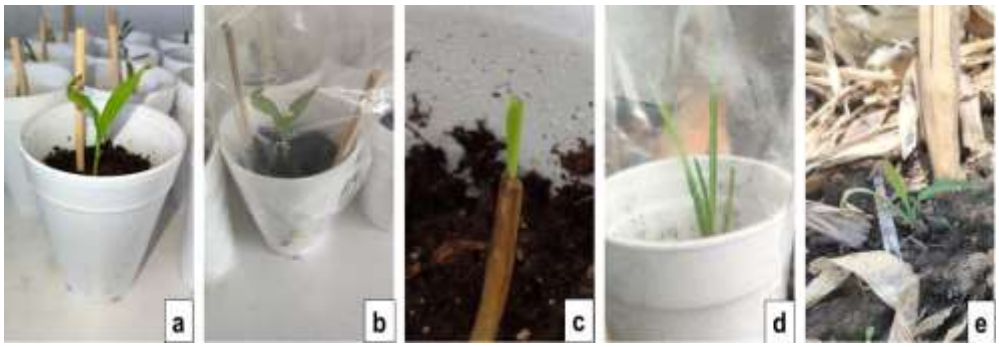

Figura 3. Aclimatación de S_1 de los genotipos seleccionados de maíz cónico norteño. a) establecimiento de plántula regenerada *in vitro* en sustrato, b) proceso de aclimatación con bolsas de polipropileno, c) corte de plúmula en plántulas con necrosis en hojas, d) hojas nuevas después del corte de plúmula y e) establecimiento en campo (plántula adaptada a condiciones *ex vitro* exitosa).

Kang *et al*. (2022) realizó un protocolo de regeneración y transformación de embriones inmaduros de maíz a través de organogénesis indirecta, después de 165 días fue trasplantado en suelo. Bedada *et al*. (2022) obtuvo el 90% de sobrevivencia en la etapa de endurecimiento en líneas de maíz regeneradas a través de embriones

maduros. Chablé *et al*. (2017), menciona el 76% de las plántulas regeneradas *in vitro* de 19 poblaciones de maíz fueron transferidas a suelo y adaptadas a campo. En nuestra investigación el proceso de aclimatación desde *in vitro* a campo transcurrió 59 días, se sugieren hacer modificaciones en el proceso de aclimatación para esta raza, aunque el porcentaje de sobrevivencia disminuyó considerablemente.

CONCLUSIONES

Se logró que la regeneración de embriones maduros, un área poco explorada frente a los estadios inmaduros. Los resultados mostraron que el protocolo de desinfección no afecto la viabilidad del embrión, permitiendo la organogénesis directa con una eficiencia del 80-90%. Para maximizar el éxito experimental, se sugiere priorizar la siembra aséptica en el tratamiento 2 y la implementación de subcultivos en el tratamiento uno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bedada, L. T., Seth, S., Runo, S. M., Tefera, W., & Jesse, M. (2012). Regenerability of elite tropical maize (Zea mays L.) inbred lines using immature zygotic embryo explants. *African Journal of Biotechnology*, *11*(3), 598-605. DOI: 10.5897/AJB11.812

Chablé-Moreno, F., Huerta-Santoyo, D., Raya-Pérez, J. C., Ramírez-Pimentel, J. G., Aguirre-Mancilla, C. L., Estrada-Luna, A. A. y Covarrubias-Prieto, J. (2017). Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de cruzas interpoblacionales de maíz S_2 con empleo de BAP y AIA. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México 5*(1), 1-11.

Escutia-Ponce, J.M.; García-Rodríguez, J.G., Mendoza-Elos, M.; Montes-Hernández, S.; Ramírez-Pimentel, J.G. Rivera-Arredondo, M.; Chablé-Moreno, F.; Gámez-Vázquez, A.J. (2025). Morfología y rendimiento de plantas de maíz obtenidas mediante cultivo de embriones inmaduros y por semillas. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 48 (3): 233-240, DOI: https://doi.org/10.35196/rfm.2025.3.233

Kumar, K., Abhishek, A., Jha, A. K., Kumar, B., & Rakshit, S. 2021. In vitro regeneration in maize (Zea mays L.). *Maize J*, 10 (1), 6-12.

FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). 2024. *Panorama Agroalimentario: Maíz 2024*. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. https://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/abrirArchivo.jsp?abreArc=122742

García, E . (1973). Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (adaptación a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía. UNAM. México, D.F. México. 264 p

INEGI. Marco Geoestadístico Municipal (2017). versión 4.3. Celaya, Guanajuato.

Majumder, S., Igamberdiev, A. U., and Debnath, S. C. (2025). Somaclonal Variation and Clonal Fidelity in Commercial Micropropagatio: Challenges and Perpestives. *Agronomy, 15*(6), 1489. DOI: https://doi.org/10.3390/agronomy1506148

Moroy-Sais., A. S., Tobin, D., Bellon, M. R., Astier, M., Cibrián-Jaramillo, A., Gálvez-Reyes, N., Mastretta-Yanes, A., Ruiz-Arocho, J., Wegier, A and Chen, Y. H. (2024). Smallholder farmers' diverse values in maize landrace conservation: A case study from Chiapas Mexico. *Journal of Rural Studies*. 110,103347. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2024.103347

Morshed, S., Baker, A., Siddique; Islam S. M.S. (2014). Callus Induction; Immature and Mature Embryo; In Vitro Regeneration; Somatic Embryogenesis. *International Journal of Agriculture Innovations and Research. 3*(3), 895-904.

Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–497

Páez, M. V., & Astier, M. (2026). Reframing native maize conservation, the energy-gender nexus, and food sovereignty in rural Mexico. *Elem Sci Anth*, *14*(1), 00023.

Sánchez-Chiang, N.; Jiménez, V.M. (2009) Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. Agronomía mesoamericana 20 (1): 135-151. I.SSN: 1021-7444. DOI:

SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pes quera). 2024. Anuario estadístico de la producción agrícola. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, México, D.F. Disponible en https://nube.agricultura.gob.mx/cierre_agricola/

Tinak Ekom, D.C., Lombeko Obe Tomo, V., Mongoue Fanche, A. *et al.* Genotype-specific disinfection protocols enable reliable in vitro culture from mature field-harvested maize seeds. *Discov. Plants* **3**, 90 (2026). DOI: https://doi.org/10.1007/s44372-026-00566-4

Velasco-García, Á. M., García-Zavala, J. J., Sahagún-Castellanos, J., Lobato-Ortiz, R., Sánchez-Abarca, C., y Marín-Montes, I. M. (2020). Análisis de la variabilidad morfológica de maíces nativos y exóticos en valles altos de México. *Revista fitotecnia mexicana*, *43*(4A), 517-524. DOI: https://doi.org/10.35196/rfm.2020.4-a.517

Urías-Salazar, A. A., Ayil-Gutiérrez, B. A., Delgado-Martínez, R., Silva-Espinosa, J. H. T., Segura-Martínez, M. T. J. y Poot-Poot, W. A. (2022). Cultivo de tejidos vegetales y mutagénesis inducida: Una estrategia para el desarrollo de plantas tolerantes a salinidad. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, *30*(85) DOI: https://doi.org/10.33064/iycuaa2022853315

Kang, M., Lee, K., Finley, T., Chappell, H., Veena, V., and Wang, K. (2022). An Improved *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Genome-Editing Method for Maize Inbred B104 Using a Ternary Vector System and Immature Embryos. *Frontiers in plant science*, *13*, 860971. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.860971