

REGENERACIÓN DE MAÍCES BLANCOS SUBTROPICALES VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

REGENERATION OF SUBTROPICAL WHITE MAIZE VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS

C. Manuel Hernández-García¹, Cristina López-Peralta¹, Marco T. Buenrostro-Nava¹, Elizabeth Cárdenas-Soriano² y Alessandro Pellegrineschi³

¹Genética, ²Fitosanidad. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (cristy@colpos.mx). ³Centro de Biotecnología Aplicada, CIMMYT. 56130. El Batán, Texcoco, Estado de México.

RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) se destina principalmente a la alimentación animal (maíces amarillos) y en menor proporción a la humana (blancos). Los maíces blancos subtropicales son importantes para los humanos. Sin embargo existen problemas de regeneración, vía embriogénesis somática, que limitan su transformación genética. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la embriogénesis somática en nueve líneas de maíces blancos subtropicales. En la inducción de embriogénesis somática se evaluaron 1, 2 y 5 mg L⁻¹ de 2,4-D y Dicamba. Las líneas 78, 395 y 444 produjeron 70.1 a 87.2% de callos embriogénicos, similar a los testigos (67.2 a 74.7%). Las líneas 442 y 332 presentaron una tasa media de inducción de callos de 48.4 a 60.6%, mientras que las 330, 202, 204 y 331 mostraron los menores porcentajes (3.9 a 26.2%). Las líneas 330, 331 y el testigo 216×72 presentaron los mayores porcentajes con Dicamba, mientras que la línea 442 tuvo mayor porcentaje con 2,4-D. La inducción de las líneas varió entre dosis. La línea 395 regeneró 1.11 plantas por callo, similar a los tres testigos (0.74-0.95 plantas), mientras que las 442, 78 y 332 regeneraron 0.67, 0.37 y 0.33. Se obtuvieron plántulas enraizadas (92-99%) y aclimatación (95-100%) en las líneas 395, 442, 78 y 332. El número de plantas fértiles regeneradas fue 228, 187, 108 y 79 en las líneas 395, 442, 78 y 332. Se identificaron cuatro líneas embriogénicas de maíz blanco subtropical (395, 442, 78 y 332) con capacidad de regeneración de plantas fértiles en 17 semanas y con potencial para ser sometidas a transformación genética.

Palabras clave: *Zea mays* L., 2,4-D, Dicamba, histología.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es un cultivo usado principalmente a la alimentación animal (maíces amarillos); para la alimentación humana se destina menos de 10% de la producción total mundial (blancos). Este cultivo se ha mejorado de manera convencional

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is destined mainly for animal feed (yellow maizes) and in a smaller proportion for human consumption (white). The subtropical white maizes are important for humans. However, there are problems of regeneration, via somatic embryogenesis, that limit its genetic transformation. Therefore the objective of the present study was to evaluate somatic embryogenesis in nine lines of subtropical white maize. In the induction of somatic embryogenesis, 1, 2 and 5 mg L⁻¹ of 2,4-D and Dicamba were evaluated. Lines 78, 395 and 444 produced 70.1 to 87.2% of embryogenic calluses, similar to the controls (67.2 to 74.7%). Lines 442 and 332 presented a mean induction rate of calluses of 48.4 to 60.6%, whereas 330, 202, 204 and 331 showed the lowest percentages (3.9 to 26.2%). Lines 330, 331 and the control 216×72 presented the highest percentages with Dicamba, whereas line 442 had its highest percentage with 2,4-D. The induction of the lines varies among doses. Line 395 regenerated 1.11 plants per callus, similar to the three controls (0.74-0.95 plants), while 442, 78 and 332 regenerated 0.67, 0.37 and 0.33. Rooted seedlings (92-99%) and acclimatization (95-100%) were obtained in lines 395, 442, 78 and 332. The number of fertile regenerated plants was 228, 187, 108 and 79 in lines 395, 442, 78 and 332. Four embryogenic lines of subtropical white maize (395, 442, 78 and 332) were identified with regeneration capacity of fertile plants in 17 weeks and with potential for being subjected to genetic transformation.

Key words: *Zea mays* L., 2, 4-D, Dicamba, histology.

INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is a crop used mainly for animal feed (yellow maizes); less than 10% of the total world production (white) is used for human consumption. This crop has been improved by conventional and biotechnological means. The genetic transformation of white maize will depend mainly on the morphogenic response of the genotypes to be transformed and of the embryogenic crops that are used for their easy *in vitro* management and regeneration to fertile plants. White maize also generates

Recibido: Noviembre, 2006. Aprobado: Junio, 2007.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 41: 743-753. 2007.

y por medios biotecnológicos. La transformación genética del maíz blanco dependerá principalmente de la respuesta morfogénica de los genotipos a transformar y de los cultivos embriogénicos que se usen por su fácil manejo *in vitro* y regeneración a plantas fértiles. Asimismo por generar menos quimeras que otros cultivos debido a su origen unicelular, lo cual puede ser importante para propagación clonal, multiplicación de híbridos F1 y, especialmente, en ingeniería genética en maíz (Jähne *et al.*, 1995).

Un aspecto importante que influye en la respuesta del maíz durante la inducción de embriogénesis somática es el genotipo utilizado como explante (Duncan *et al.*, 1985). Segmentos de cromosomas están relacionados con la capacidad de formación del callo embriogénico (Armstrong *et al.*, 1992).

Se han identificado maíces embriogénicos amarillos de climas templados para la alimentación animal. Sin embargo en algunas regiones del mundo el cultivo de maíces blancos es importante para el consumo humano. Los genes insertados por transformación genética en maíces amarillos de climas templados se pueden transferir a maíces blancos subtropicales mediante mejoramiento convencional, pero el tiempo y los costos se incrementan en la generación de líneas transgénicas. Además, es difícil obtener progenies con el transgen y los caracteres agronómicos deseables en maíces blancos, porque hay grupos heteróticos incompatibles y con poca habilidad combinatoria (O'Kennedy *et al.*, 2001).

El Laboratorio de Ingeniería Genética del CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) y el Instituto de Investigación Agrícola de Kenia (KARI) desarrollan líneas transgénicas de maíz blanco subtropical para consumo humano mediante la transformación de maíces amarillos subtropicales y se transfieren los transgenes a maíces blancos elites por mejoramiento convencional, aunque con varias limitaciones (Bohorova *et al.*, 2001). Debido a que es importante determinar la totipotencialidad embriogénica de los maíces blancos, el objetivo del presente estudio fue evaluar la regeneración vía embriogénesis somática de nueve maíces blancos elites adaptados a las regiones subtropicales de África.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se caracterizaron nueve líneas del CIMMYT adaptadas a los climas subtropicales de África, veranos cálidos y elevada humedad ambiental: 78, 202, 204, 330, 331, 332, 395, 442 y 444. Como testigos se usaron los genotipos de maíz embriogénico amarillo 216, 216×72 y 72×216 (Borohova *et al.*, 1995). El cultivo del material vegetativo se hizo en invernaderos del CIMMYT (25 °C), ubicados en el Batán, Texcoco, México.

fewer chimeras than other crops due to its unicellular origin, which can be important for clonal propagation, multiplication of F1 hybrids, and especially in genetic engineering in maize (Jähne *et al.*, 1995).

One important aspect that influences the response of maize during the induction of somatic embryogenesis is the genotype used as explant (Duncan *et al.*, 1985). Segments of chromosomes are related to the formation capacity of the embryogenic callus (Armstrong *et al.*, 1992).

Yellow embryogenic maizes for animal feed from temperate climates have been identified. However, in some regions of the world the cultivation of white maize is important for human consumption. The genes inserted through genetic transformation in yellow maizes in temperate climates can be transferred to subtropical white maizes by means of conventional breeding, but the time and costs are increased in the generation of transgenic lines. Furthermore, it is difficult to obtain progeny with the transgene and the agronomic traits that are desirable in white maizes, because there are heterotics groups that are incompatible and with little combinatory ability.

The Genetic Engineering Laboratory of CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) and the Kenya Agricultural Research Institute (KARI) develop transgenic lines of subtropical white maize for human consumption through the transformation of subtropical yellow maizes, and the trans genes are transferred to elite white maizes by means of conventional plant breeding, although with various limitations (Bohorova *et al.*, 2001). Because it is important to determine the embryogenic totipotentiality of the white maizes, the objective of the present study was to evaluate the regeneration via somatic embryogenesis of nine elite white maizes adapted to the subtropical regions of Africa.

MATERIALS AND METHODS

Nine lines of CIMMYT maize were characterized, that were adapted to the subtropical climates of Africa, hot summers and high environmental humidity: 78, 202, 204, 330, 331, 332, 395, 442 and 444. As controls, the following yellow embryogenic maize genotypes were used: 216, 216×72 and 72×216 (Borohova *et al.*, 1995). The cultivation of the vegetative material was made in greenhouses of CIMMYT (25 °C), located in el Batán, Texcoco, México.

Disinfection of explants

The maize ears were harvested 16 d after anthesis and were disinfected for 30 min with commercial sodium hypochlorite (Cloralex®, 1.8%) and 10 drops of Tween 80®. They were rinsed in sterile water and the immature embryos (1-1.5 mm) were extracted

Desinfección de explantes

Las mazorcas de maíz se cosecharon 16 d después de la antesis y se desinfectaron 30 min con hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®, 1.8%) y 10 gotas de Tween 80®. Se enjuagaron en agua estéril y se extrajeron los embriones inmaduros (1-1.5 mm) con una espátula y un corte con bisturí de la parte superior del grano, los cuales fueron utilizados como explantes.

Inducción de embriogénesis somática

Para inducir la embriogénesis somática de las líneas de maíz mencionadas, se probaron 1, 2 y 5 mg L⁻¹ de las auxinas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; Sigma-Aldrich, USA) y ácido 3,6-dicloro-o-anisico (Dicamba; Sigma-Aldrich, USA). Como testigo se usó un medio sin auxinas. El medio de cultivo fue el N6 (Chu *et al.*, 1975) enriquecido con L-Prolina (2.3 g L⁻¹), caseína hidrolizada (0.2 g L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹) y agar (Bacto®, 8.6 g L⁻¹). El medio de cultivo se ajustó a pH 5.7 antes de ser esterilizado por 20 min en autoclave (Consolidated Stills and Sterilizers, MA., USA) a 120 °C y 1.05 kg cm⁻² de presión, y se colocaron 25 mL en cajas Petri de 100×15 mm.

Los embriones cigóticos se sembraron con el eje embrionario en contacto con el medio de cultivo y se incubaron 28 d en oscuridad a 27±1 °C. Al terminar la inducción se midió el porcentaje de callos embriogénicos (PCE) con al menos una estructura embriogénica y el porcentaje de callos tipo I y II (CTI y CTII). El diseño estadístico fue completamente al azar con un arreglo factorial (12 genotipos×2 auxinas×3 dosis). Cada tratamiento estuvo conformado por 20 embriones colocados en cada caja Petri y cuatro repeticiones. El análisis de varianza de los datos transformados (χ^2 ; Steel y Torrie, 1997) se hizo con el procedimiento GLM de SAS (2000). La separación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Germinación de embriones somáticos y regeneración

Para la germinación de los embriones somáticos, los callos inducidos se mantuvieron 21 d en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con tiamina-HCl (40 mg L⁻¹), L-asparagina (150 mg L⁻¹), sacarosa (20 g L⁻¹), ácido indolacético (0.5 mg L⁻¹, AIA), bencilaminopurina (1 mg L⁻¹, BAP) y agar (Bacto®, 8.6 g L⁻¹), ajustado a un pH de 5.7 antes de esterilizarse en autoclave. Después se agregó zeatina (5 mg L⁻¹, ZEA) esterilizada por filtración en frío usando un filtro Millipore® y se vertieron 25 mL en cajas Petri.

Los callos con embriones somáticos germinados se subcultivaron durante 21 d en frascos de 150 mL con 35 mL del mismo medio pero sin zeatina. En las plántulas provenientes de los embriones germinados se cortó la región radicular y se transfirieron para un mejor enraizamiento a cajas magenta de 250 mL con 50 mL del medio MS con sacarosa (20 g L⁻¹), ácido 1-naftalenacético (1.5 mg L⁻¹, ANA) y Fitagel (Sigma®, 5 g L⁻¹), ajustado a un pH de 5.7, y se incubaron a 27±1 °C y 16:8 h de luz:oscuridad proporcionada por lámparas de luz blanca fría fluorescente de 75 W (200 J m⁻² h⁻¹).

with a spatula and cut with a scalpel in the upper part of the grain, to be used as explants.

Induction of somatic embryogenesis

To introduce the somatic embryogenesis of the aforementioned maize lines, 1, 2 and 5 mg L⁻¹ of the auxins were tested: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; Sigma-Aldrich, USA) and 3,6-dichloro-o-anisic acid (Dicamba; Sigma-Aldrich, USA). A medium without auxins was used as control. The culture medium was N6 (Chu *et al.*, 1975) enriched with L-Proline (2.3 g L⁻¹), hydrolyzed casein (0.2 g L⁻¹), saccharose (30 g L⁻¹) and agar (Bacto®, 8.6 g L⁻¹). The culture medium was adjusted to pH 5.7 prior to being sterilized for 20 min in autoclave (Consolidated Stills and Sterilizers, MA., USA) at 120 °C and 1.05 kg cm⁻² pressure, and 25 mL were placed in Petri dishes of 100×15 mm.

The zygotic embryos were sown with the embryonic axis in contact with the culture medium and were incubated for 28 d in darkness at 27±1 °C. When induction was finished, the percentage of embryogenic calluses (PEC) was measured with at least one embryogenic structure and the percentage of type I and II calluses (CTI and CTII). The statistic design was completely randomized with a factorial arrangement (12 genotypes×2 auxins×3 doses). Each treatment was comprised of 20 embryos placed in each Petri dish and four replicates. The analysis of variance of the transformed data (χ^2 ; Steel and Torrie, 1997) was made with the GLM procedure of SAS (2000). The separation of means was made with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

Germination of somatic embryos and regeneration

For the germination of the somatic embryos, the induced calluses were maintained for 21 d in the culture medium MS (Murashige and Skoog, 1962) added with thiamine-HCl (40 mg L⁻¹), L-asparagin (150 mg L⁻¹), saccharose (20 g L⁻¹), indolacetic acid (0.5 mg L⁻¹, AIA), bencylaminopurine (1 mg L⁻¹, BAP) and agar (Bacto®, 8.6 g L⁻¹), adjusted to a pH of 5.7 prior to being sterilized in autoclave. Then, zeatine was added (5 mg L⁻¹, ZEA), sterilized by cold filtration using a Millipore® filter, and 25 mL were poured into Petri dishes.

The calluses with germinated somatic embryos were subcultivated during 21 d in flask of 150 mL with 35 mL of the same medium but without zeatin. The radicular region was cut from the plantlets from the germinated embryos, and were transferred for better rooting to magenta dishes of 250 mL, with 50 mL of the MS medium with saccharose (20 g L⁻¹), 1-naphtalene acetic acid (1.5 mg L⁻¹, NAA) and Phytigel (Sigma®, 5 g L⁻¹), adjusted to a pH of 5.7, and were incubated at 27±1 °C and 16:8 h of light:darkness provided by lamps of cold fluorescent white light of 75 W (200 J m⁻² h⁻¹).

At 21 d the percentage of calluses with germinated somatic embryos (PGC) was determined, with at least one plantlet of 1cm, and at 42 d the number of plantlets per embryogenic callus (PEC). In these variables the same treatments of the induction of somatic embryogenesis were evaluated, where each treatment had six replicates (Petri dish with 10 calluses). The data of PGC were transformed

A 21 d se determinó el porcentaje de callos con embriones somáticos germinados (PCG), con al menos una plántula de 1 cm, y a los 42 d el número de plántulas por callo embriogénico (PCE). En estas variables se evaluaron los mismos tratamientos de la inducción de embriogénesis somática, donde cada tratamiento tuvo seis repeticiones (caja Petri con 10 callos). Los datos de PCG se transformaron (X^{-2}) antes del análisis de varianza. El diseño estadístico, el análisis de varianza y la separación de medias fueron los mismos que en las variables de la inducción de embriogénesis somática.

A 63 d se evaluó el porcentaje de plántulas que formaron raíces (PPR). El diseño estadístico fue completamente al azar. Cada tratamiento (línea) tuvo ocho repeticiones (una caja magenta con cuatro plántulas). El análisis de varianza de los datos transformados (χ^{-2}) se hizo con el procedimiento GLM de SAS (2000) y la separación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Supervivencia de plantas y variación morfológica

Las plántulas enraizadas se transfirieron a macetas de 500 mL con peatmoss y se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 27 ± 1 °C, 90% de humedad relativa y 16:8 h luz:oscuridad ($200 \text{ J m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). A 28 d de aclimatación se determinó el porcentaje de supervivencia de 20 plantas por cada línea (PSP). Después se cultivaron cinco plantas aclimatadas y escogidas al azar por cada línea para observar cambios morfológicos.

Análisis histológico de callos embriogénicos

Callos embriogénicos de 7, 14, 21 y 28 d de las líneas 78, 332 y 395 se fijaron en FAA (alcohol etílico absoluto, ácido acético glacial, formaldehído, y agua destilada, en proporción 50:5:10:35 v/v), deshidratados en alcohol etílico (50, 70, 96 y 100%) e incluidos en Paraplast (Sigma®). Los cortes de 8 a 10 μm se hicieron con un micrótopo rotatorio (Spencer 820), se colocaron en baño de flotación (agua y grenetina) a 60 °C, se adhirieron a portaobjetos y se tiñeron con safranina-verde rápido (Iracheta-Donjuan *et al.*, 2003). Finalmente se montaron en resina sintética y se observaron y fotografiaron en un Fotomicroscopio III Carl Zeiss con una cámara digital Pixera Professional integrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de embriogénesis somática

A los 7 d de inducción se observó callo en el escutelo de los embriones cigóticos en todas las líneas y dosis de reguladores hormonales de crecimiento (RHC), excepto en los colocados en medio sin RHC que presentaron crecimiento de la radícula y del meristemo apical. Después de 14 d, las líneas 78, 332, 395, 442 y 444, y los testigos 216, 216×72 y 72×216 mostraron callos embriogénicos color crema (Figura 3 A-B), mientras que las líneas 202, 204, 330 y 331 mostraron callos de color café, pequeños, friables y con pocas estructuras

(X^{-2}) prior to the analysis of variance. The statistical design, the analysis of variance and the separation of means were the same as in the variables of the induction of somatic embryogenesis.

At 63 d an evaluation was made of the percentage of plantlets that formed roots (PPR). The statistical design was completely randomized. Each treatment (line) had eight replicates (a magenta dish with four shoots). The analysis of variance of the transformed data (χ^{-2}) was made with the GLM procedure of SAS (2000) and the separation of means with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

Survival of plants and morphological variation

The rooted plantlets were transferred to pots of 500 mL with peatmoss and were maintained in a growth chamber at 27 ± 1 °C, 90% relative humidity and 16:8 h light:darkness ($200 \text{ J m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). At 28 d of acclimation, the percentage of survival of 20 plants per line was determined (PSP). Then five acclimated plants were cultivated, randomly chosen for each line to observe morphological changes.

Histological analysis of embryogenic calluses

Embryogenic calluses of 7, 14, 21 and 28 d of the lines 78, 332 and 395 were fixed in FAA (absolute ethylic alcohol, glacial acetic acid, formaldehyde, and distilled water, in a ratio of 50:5:10:35 v/v), dehydrated in ethylic alcohol (50, 70, 96 and 100%) and included in Paraplast (Sigma®). The cuts of 8 to 10 μm were made with a rotating microtome (Spencer 820), they were placed in a flotation bath (water and grenetin) at 60 °C, were fixed to slides and stained with saphranine-rapid green (Iracheta-Donjuan *et al.*, 2003). Finally, they were mounted in synthetic resin and observed and photographed in a Carl Zeiss Photomicroscope III with an integrated Pixera Professional digital camera.

RESULTS AND DISCUSSION

Induction of somatic embryogenesis

At 7 d of induction, callus was observed in the scutulum of the zygotic embryos in all of the lines and doses of hormonal growth regulators (HGR), except in those placed in the middle without HGR that presented growth of the radicle and the apical meristem. After 14 d, lines 78, 332, 395, 442 and 444, and controls 216, 216×72 and 72×216 presented cream colored embryogenic calluses (Figure 3 A-B), whereas lines 202, 204, 330 and 331 had brown colored calluses that were small, friable and with few embryogenic structures, similar to the non-embryogenic calluses reported by Bronsema *et al.* (2001).

The analysis of variance of the percentage of embryogenic callus (PEC) showed significant differences ($p \leq 0.001$) among lines and among doses of auxins; among the auxins 2, 4-D and Dicamba significant differences were detected ($p \leq 0.05$). The

embriogénicas, similares a los callos no embriogénicos reportados por Bronsema *et al.* (2001).

El análisis de varianza del porcentaje de callo embriogénico (PCE) mostró diferencias significativas ($p \leq 0.001$) entre líneas y entre dosis de auxinas; entre las auxinas 2,4-D y Dicamba se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Las interacciones líneas \times auxinas, líneas \times dosis, y auxinas \times dosis también fueron significativas ($p \leq 0.001$). La interacción líneas \times auxinas \times dosis no fue significativa ($p > 0.05$).

En promedio, las líneas 78, 395 y 444 produjeron 70.1-87.2% de callos embriogénicos, similar ($p > 0.05$) al de los tres testigos (67.2-74.7%). Las líneas 442 y 332 presentaron una tasa media de inducción de callos (48.4-60.6%) y las líneas 330, 202, 204 y 331 mostraron porcentajes bajos (3.9-26.2%). Las líneas variaron en su respuesta al tipo de auxinas; las líneas 330, 331 y el testigo 216 \times 72 presentaron mayores porcentajes con Dicamba, mientras que la línea 442 logró mayor porcentaje con 2,4-D (Figura 1).

La respuesta de las líneas a la inducción de embriogénesis somática varió entre las tres dosis de auxinas. La línea 332 y los tres testigos tuvieron la mayor inducción con 1 y 2 mg L⁻¹ en promedio de las dos auxinas evaluadas (Cuadro 1). En promedio de líneas, la dosis de 5 mg L⁻¹ de 2,4-D produjo menores

interactions lines \times auxins, lines \times doses, and auxins \times doses were also significant ($p \leq 0.001$). The interaction lines \times auxins \times doses was not significant ($p > 0.05$).

On the average, lines 78, 395 and 444 produced 70.1-87.2% of the embryogenic calluses, similar ($p > 0.05$) to that of the three controls (67.2-74.7%). Lines 442 and 332 presented a mean induction rate of calluses (48.4-60.6%) and lines 330, 202, 204 and 331 showed low percentages (3.9-26.2%). The lines varied in their response to the type of auxins; lines 330, 331 and the control 216 \times 72 presented higher percentages with Dicamba, while line 442 achieved a higher percentage with 2, 4-D (Figure 1).

The response of the lines to the induction of somatic embryogenesis varied among the three doses of auxins. Line 332 and the three controls had the highest induction with 1 and 2 mg L⁻¹ average of the two auxins evaluated (Table 1). In the average of lines, the dose of 5 mg L⁻¹ of 2, 4-D produced lower percentages of embryogenesis (35.6%) than the doses of 1 and 2 mg L⁻¹, while with Dicamba the three doses produced the same results (49.5-54.0%). Bronsema *et al.* (2001) reported that doses higher than 2 mg L⁻¹ of 2, 4-D decrease the number of embryogenic calluses in the maize lines A188 and A632 of temperate climate.

According to Slater *et al.* (2003), all of the plant cells can be regenerated under the correct conditions of culture and stimuli, given that they conserve the genetic potential known as totipotency, although the

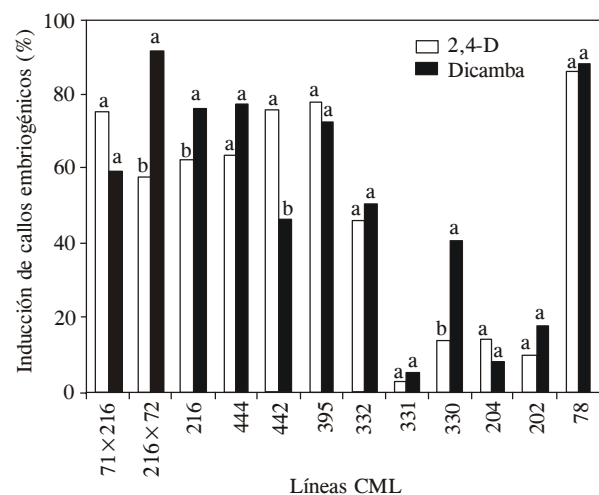


Figura 1. Porcentaje de inducción de callos embriogénicos de maíces blancos subtropicales tratados con 2,4-D y Dicamba, en promedio de tres dosis (1, 2 y 5 mg L⁻¹). Los testigos fueron 72 \times 216, 216 \times 72 y 216. Barras con diferente letra en una línea son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

Figure 1. Percentage of induction of embryogenic calluses of subtropical white maizes treated with 2, 4-D and Dicamba, with the average of three doses (1, 2 and 5 mg L⁻¹). The controls were 72 \times 216, 216 \times 72 and 216. Bars with different letters in a line are statistically different ($p \leq 0.05$).

Cuadro 1. Porcentaje de inducción de embriogénesis somática en maíces blancos subtropicales, con tres dosis de 2,4-D y Dicamba, en promedio.

Table 1. Percentage of induction of somatic embryogenesis in subtropical white maizes, with three doses of 2, 4-D and Dicamba, in average.

Líneas (CML)	Dosis (mg L ⁻¹)		
	1	2	5
72 \times 216 [†]	86.2 a [‡]	72.6 ab	42.9 b
216 \times 72	95.5 a	77.4 a	51.2 b
216	86.1 a	76.1 a	43.7 b
444	71.8 a	76.9 a	62.5 a
442	55.9 a	58.7 a	67.3 a
395	76.3 a	83.4 a	67.2 a
332	64.1 a	43.6 ab	36.0 b
331	1.2 b	3.1 ab	7.5 a
330	30.5 a	17.4 a	30.7 a
204	6.8 a	14.3 a	11.8 a
202	21.1 a	15.0 a	6.2 a
78	86.8 a	84.3 a	90.6 a

[†]Los testigos fueron 72 \times 216, 216 \times 72 y 216.

[‡]Promedios con diferente letra en la misma fila son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

porcentajes de embriogénesis (35.6%) que las dosis de 1 y 2 mg L⁻¹, mientras que con Dicamba las tres dosis produjeron los mismos resultados (49.5-54.0%). Bronsema *et al.* (2001) reportaron que dosis mayores de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D disminuyen el número de callos embriogénicos en los maíces A188 y A632 de clima templado.

Según Slater *et al.* (2003), todas las células vegetales pueden ser regeneradas en las condiciones de cultivo y estímulos correctos, ya que conservan el potencial genético llamado totipotencia, aunque las condiciones y estímulos varían entre genotipos. En maíz se ha observado un grupo de genes nucleares expresados en la región abaxial del escutelo de los embriones cigóticos, que controlan la inducción de callo embriogénico y regeneración (Bohorova *et al.*, 1995; Phillips, 2004).

En el presente estudio se observaron brotes y raicillas provenientes posiblemente de la germinación precoz de estructuras embriogénicas inducidas con la dosis de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D o de Dicamba. La germinación precoz durante la inducción de callos embriogénicos pudo deberse a que esta dosis no es suficiente para mantener el tejido indiferenciado, como lo señalan Suprasanna *et al.* (1991), quienes registraron que con dosis menores de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D se favorece la organogénesis en glumas de los maíces DHM 103 y DHM 101. También Bronsema *et al.* (1996) señalaron que en periodos de cultivos mayores a 14 d, la mayor parte del 2,4-D es metabolizado por el callo, lo que permite su diferenciación.

Los callos embriogénicos de maíz se clasificaron en dos tipos: I) estructuras compactas con embriones somáticos morfológicamente complejos y capacidad regenerativa corta y II) friables con embriones somáticos definidos y capacidad regenerativa prolongada (Armstrong y Green, 1985). En la formación de callos tipo I se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0.001$) entre las líneas, donde más de 62.5% de los callos formados en las líneas 444, 395, 332, 442, 330 y 202 fueron del tipo I (Figuras 2 y 3A). Pero las líneas 78 y 204 formaron 60.6 y 68.0% de callos tipo II (Figura 3B). Las interacciones genotipo \times auxinas, genotipo \times dosis y auxinas \times dosis no fueron significativas ($p > 0.05$).

Una ventaja de los callos embriogénicos tipo I es que pueden ser inducidos y regenerados hasta plantas fértiles en más genotipos de maíz (Carvalho *et al.*, 1997), como también se observó en esta investigación. Este tipo de callo embriogénico se ha usado en la transformación genética de maíces blancos (O'Kennedy *et al.*, 2001). Por lo anterior, se infiere que las líneas embriogénicas aquí identificadas tienen potencial para ser usadas en transformación genética.

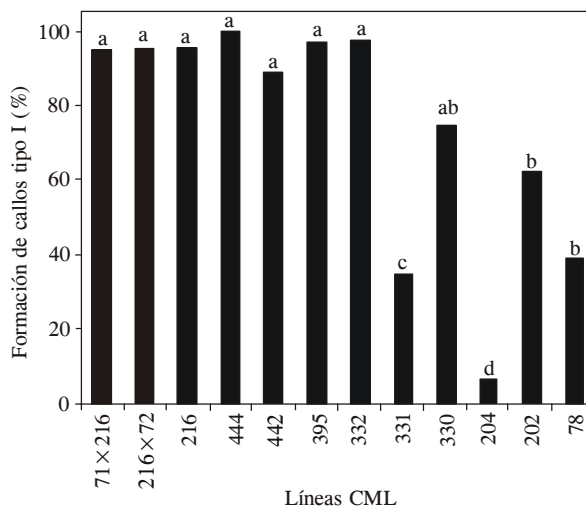


Figura 2. Porcentajes de callos tipo I formados por maíces blancos subtropicales, cuyos testigos fueron los genotipos 72×216, 216×72 y 216. Barras con diferente letra son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Percentages of type I calluses formed by subtropical white maizes, whose controls were genotypes 72×216, 216×72 and 216. Bars with different letter are statistically different ($p \leq 0.05$).

conditions and stimuli vary among genotypes. In maize, a group of nuclear genes has been observed expressed in the abaxial region of the scutellum of the zygotic embryos that control the induction of embryogenic callus and regeneration (Bohorova *et al.*, 1995; Phillips, 2004).

In the present study shoots and rootlets were observed, possibly from the precocious germination of embryogenic structures induced with the dose of 1 mg L⁻¹ of 2,4-D or of Dicamba. The precocious germination during the induction of embryogenic calluses could have been due to the fact that this dose is not sufficient to maintain the undifferentiated tissue, as is pointed out by Suprasanna *et al.* (1991), who registered that with doses lower than 2 mg L⁻¹ of 2, 4-D, organogenesis is favored in glumes of the maizes DHM 103 and DHM 101. Bronsema *et al.* (1996) also pointed out that in culture periods longer than 14 d, most of the 2, 4-D is metabolized by the callus, which permits its differentiation.

The embryogenic calluses of maize were classified into two types: I) compact structures with somatic embryos that are morphologically complex and short regenerative capacity and II) friable with defined somatic embryos and prolonged regenerative capacity (Armstrong and Green, 1985). In type I callus formation, significant differences were detected ($p \leq 0.001$) among the lines, where over 62.5% of the calluses formed in lines 444, 395, 332, 442, 330 and 202 were of type I (Figures 2 and 3A). But hand, lines 78 and 204 formed 60.6 and 68.0% of type II calluses

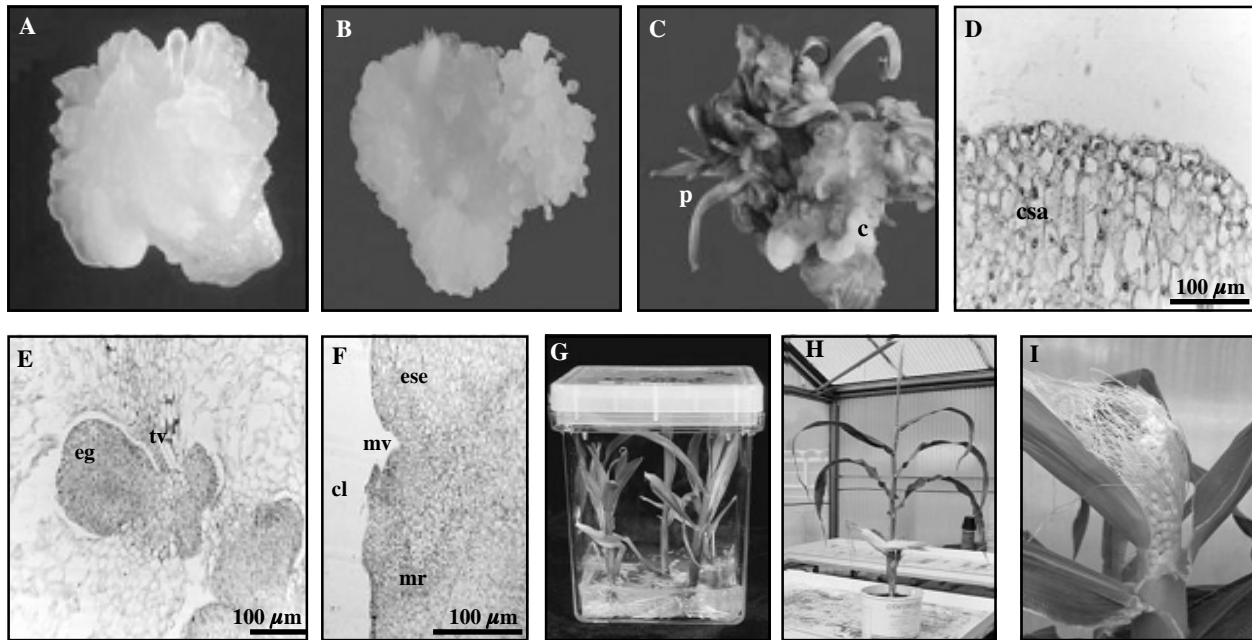


Figura 3. Regeneración de maíz blanco subtropical. [A] Callos embriogénicos tipo I. [B] Callos embriogénicos tipo II. [C] Callo (c) con plántulas (p). [D] Células subepidérmicas activas (csa). [E] Embrión en estado globular (eg) cerca del tejido vascular (tv). [F] Embrión somático con escutelo (ese), coleóptilo (cl), meristemo del vástago (mv) y radical (mr). [G] Desarrollo y enraizamiento de plántulas provenientes de embriones germinados. [H] Planta fértil. [I] Inflorescencia masculina feminizada.

Figure 3. Regeneration of subtropical white maize. [A] Type I embryogenic calluses. [B] Type II embryogenic calluses. [C] Callus (c) with plantlets (p). [D] Active subepidermic cells (asc). [E] Embryo in globular state (eg) close to the vascular tissue (vt). [F] Somatic embryo with scutellum (ses), coleoptiles (cl), meristem of shoot (mv) and radical (mr). [G] Development and rooting of shoots from germinated embryos. [H] Fertile plant. [I] Feminized male inflorescence.

Germinación de embriones somáticos y regeneración

Los embriones somáticos de los callos embriogénicos inducidos con ambas auxinas fueron germinados en presencia de luz. Después de 7 d en el medio MS de germinación, los coleóptilos generados por los embriones somáticos de las líneas 78, 202, 332, 395, 442 y de los tres testigos, se tornaron verde y formaron plántulas (Figura 3C). Los callos de las líneas 204, 330, 331 y 444 color café y formaron raíces, característica típica de los callos no embriogénicos (Bronsema *et al.*, 1997). No obstante, Carvalho *et al.* (1997) y El-itriby *et al.* (2003) señalan que los callos clasificados como embriogénicos no necesariamente permiten la regeneración de plántulas.

A los 21 d, en el porcentaje de callos germinados (PCG) con al menos un brote de 1 cm se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.001$) entre líneas. La línea 78 mostró 83.9% de callos germinados, valor similar ($p > 0.05$) al de los testigos (85.5-97.2%); las líneas 395 y 442 produjeron 69.8-71.9% de callos germinados y las líneas 332 y 444 tuvieron 36.4 y 0.0% de callos embriogénicos germinados.

(Figure 3B). The interactions genotype \times auxins, genotype \times doses and auxins \times doses were not significant ($p > 0.05$).

One advantage of the type I embryogenic calluses is that they can be induced and regenerated to fertile plants in more maize genotypes (Carvalho *et al.*, 1997), as was also observed in this investigation. This type of embryogenic callus has been used in the genetic transformation of white maize (O'Kennedy *et al.*, 2001). Therefore, it is inferred that the embryogenic lines identified here have potential for being used in genetic transformation.

Germination of somatic embryos and regeneration

The somatic embryos of the embryogenic calluses induced with both auxins were germinated in the presence of light. After 7 d in the MS germination medium, the coleoptiles generated by the somatic embryos of lines 78, 202, 332, 395, 442 and of the three controls, turned green and formed plantlets (Figure 3C). The calluses of lines 204, 330, 331 and 444 turned brown and formed roots, a characteristic typical of non-embryogenic calluses (Bronsema *et al.*, 1997).

La interacción líneas × tipo de auxinas fue significativa ($p \leq 0.001$) en la inducción de embriogénesis somática. Así, la auxina Dicamba dio menor cantidad de callos germinados en la línea 442 (Figura 4). Al respecto, Dicamba se considera una auxina fuerte que afecta en forma diferente a los genotipos de maíz durante la inducción de embriogénesis somática y regeneración (Duncan *et al.*, 1985).

También se registraron diferencias significativas ($p \leq 0.001$) en el número de plántulas regeneradas por callo embriogénico (PCE), entre líneas. La línea 395 regeneró 1.11 plantas por callo, capacidad similar ($p > 0.05$) a la de los testigos (0.74-0.95 plantas); las líneas 442, 78 y 332 tuvieron menores valores de regeneración: 0.67, 0.37 y 0.33 plantas por callo. En esta variable no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las dos auxinas, las tres dosis, ni en las interacciones genotipo × auxinas, genotipo × dosis y auxina × dosis.

En las plántulas de 3 cm o más provenientes de embriones somáticos germinados se cortó la zona radical original y se transfirieron al medio de enraizamiento MS contenido en cajas magenta. A los 7 d de cultivo se observaron pequeñas raíces en los nudos de las plántulas y a los 21 d un sistema radical extenso (Figura 3G). En los porcentajes de

However, Carvalho *et al.* (1997) and Elitriby *et al.* (2003) point out that the calluses classified as embryogenic do not necessarily allow the regeneration of plantlets.

At 21 d, in the percentage of germinated calluses (PGC) with at least on shoot of 1 cm, significant differences ($p \leq 0.001$) were observed among lines. Line 78 showed 83.9% of the germinated calluses, a value similar ($p > 0.05$) to that of the controls (85.5-97.2%); lines 395 and 442 produced 69.8-71.9% of germinated calluses and lines 332 and 444 had 36.4 and 0.0% of germinated embryogenic calluses.

The interaction lines × type of auxins was significant ($p \leq 0.001$) in the induction of somatic embryogenesis. Thus, the auxin Dicamba gave a lower amount of germinated calluses in line 442 (Figure 4). To this respect, Dicamba is considered a strong auxin that affects the maize genotypes differently during the induction of somatic embryogenesis and regeneration (Duncan *et al.*, 1985).

Significant differences ($p \leq 0.001$) were also registered in the number of plantlets regenerated by embryogenic callus (PEC), among lines. Line 395 regenerated 1.11 plants per callus, a capacity similar ($p > 0.05$) to that of the controls (0.74-0.95 plants); lines 442, 78 and 332 had lower regeneration values: 0.67, 0.37 and 0.33 plants per callus. In this variable there were no significant differences ($p > 0.05$) among the two auxins, the three doses, nor in the interactions genotype × auxins, genotype × dose and auxin × dose.

The original radicular region was cut in the shoots of 3 cm or more from germinated somatic embryos, and they were transferred to the MS rooting medium contained in magenta dishes. At 7 d of culture, small roots were observed in the nodes of the plantlets, and at 21 d an extensive radical system was observed (Figure 3G). In the percentages of plantlets that formed roots *in vitro* (PPR), significant differences were not observed among the lines identified as embryogenic (395, 442, 78 and 332), which showed *in vitro* rooting from 95 to 98%, values similar to those of the control genotypes (92-99%).

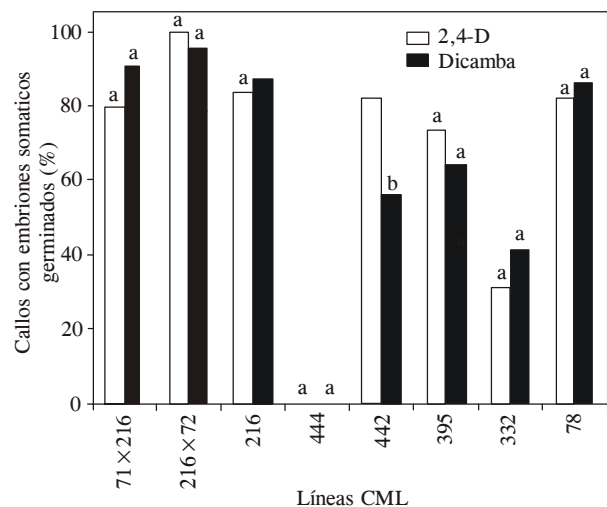


Figura 4. Porcentaje de callos con embriones somáticos germinados inducidos con 2,4-D y Dicamba, en maíces blancos subtropicales, en promedio de tres dosis. Los testigos fueron los genotipos 72×216, 216×72 y 216. Barras con diferente letra en una línea son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

Figure 4. Percentage of calluses with germinated somatic embryos induced with 2, 4-D and Dicamba, in subtropical white maizes, average of three doses. The controls were genotypes 72×216, 216×71 and 216. Bars with different letter in a line are statistically different ($p \leq 0.05$).

Survival of plants

In all, the regeneration of 228, 187, 108 and 79 plants was achieved in lines 395, 442, 78 and 332; in the controls 216, 72×216 and 216×72, there was regeneration in 229, 213 and 113 plants. With respect to the acclimatization of 20 regeneration plants of each line, 100% survival was achieved in the embryonic lines 78, 332, 395 and 442, possibly due to the extensive radical system that was induced *in vitro*.

plántulas que formaron raíces *in vitro* (PPR), no se observaron diferencias significativas entre las líneas identificadas como embriogénicas (395, 442, 78 y 332), las cuales mostraron enraizamiento *in vitro* de 95 a 98%, valores similares a los de los genotipos testigos (92-99%).

Supervivencia de plantas

En total se logró la regeneración de 228, 187, 108 y 79 plantas en las líneas 395, 442, 78 y 332; en los testigos 216, 72×216 y 216×72 se regeneraron 229, 213 y 113 plantas. En cuanto a la aclimatación de 20 plantas regeneradas de cada línea, se logró 100% de supervivencia en las líneas embriogénicas 78, 332, 395 y 442, posiblemente debido al extenso sistema radical que se indujo *in vitro*.

Al crecer en invernadero cinco de las plantas aclimatadas por cada línea embriogénica, todas produjeron inflorescencias y mazorcas con granos normales similares a las líneas progenitoras (Figura 3H). Sin embargo se presentaron variaciones morfológicas como presencia de pelos estigmáticos y granos pequeños en las inflorescencias masculinas (Figura 3I) en aproximadamente 20% de las plantas, las cuales no causaron esterilidad.

Estas variaciones morfológicas se deben a la alteración de la cromatina durante la mitosis de los callos embriogénicos, así como al origen organogénico que también se presenta en los callos tipo I de maíz (De Aguiar-Perecin *et al.*, 2000), tipo de callo predominante en las líneas estudiadas (Figura 3A). En plantaciones comerciales de maíces se ha caracterizado mutantes similares a los observados en el presente trabajo; así, Neuffer *et al.* (1997) describieron plantas fértiles con pelos estigmáticos y granos pequeños en las inflorescencias masculinas, cuyas mutaciones fueron en el gen dominante *ts5* del cromosoma 4S.

Análisis histológico de callos embriogénicos

En cortes histológicos de los callos embriogénicos de 7 d en las líneas 78, 332 y 395, así como de los tres testigos se observó actividad mitótica en las células próximas al sistema vascular, así como en las cercanas a la subepidermis del escutelo de los embriones cigóticos usados como explantes (Figura 3D). En los callos de 14 d se observaron centros proembriogénicos constituidos por células pequeñas teñidas diferencialmente y con núcleos prominentes. Dichos centros se localizaron cerca de la epidermis de la superficie adaxial del callo y de los haces vasculares con elementos de vaso en los callos tipo I de las líneas 395 y 332 y los testigos (Figura 3E).

When five of the acclimated plants per each embryogenic line were grown in the greenhouse, all of them produced inflorescence and ears with normal grains similar to the parent lines (Figure 3H). However, morphological variations appeared such as the presence of stigmatic hairs and small grains in the male inflorescences (Figure 3I) in approximately 20% of the plants, which did not cause sterility.

These morphological variations are due to the alteration of the chromatin during the mitosis of the embryogenic calluses, as well as the organogenic origin that also appears in type I maize calluses (De Aguiar-Perecin *et al.*, 2000), the type of callus predominating in the lines under study (Figure 3A). In commercial maize plantations, mutants have been characterized that are similar to those observed in the present study; thus, Neuffer *et al.* (1997) described fertile plants with stigmatic hairs and small grains in the male inflorescences, whose mutations were in the dominant gene *ts5* of the chromosome 4S.

Histological analysis of embryogenic calluses

In histological cuts of the embryogenic calluses of 7 d in lines 78, 332 and 395, as well as of the three controls, mitotic activity was observed in the cells next to the vascular system, and in those close to the subepidermis of the scutellum of the zygotic embryos used as explants (Figure 3D). In the calluses of 14 d, proembryogenic centers were observed comprised of small differentially stained cells and with prominent nuclei. These centers were located near the epidermis of the adaxial surface of the callus and of the vascular fascia with elements of vessel in the type I calluses of lines 395 and 332 and the controls (Figure 3E).

Vasil *et al.* (1985) and Fransz and Schel (1994) mentioned that the location of the proembryogenic centers in these regions is due to the fact that their cells are undifferentiated and in the embryogenic phase; therefore, they are easily stimulated by the auxins. They also pointed out that the presence of proembryogenic centers close to the procambium of the explant may be related to the high levels of phytohormones and nutrient flow in these sites. Finally, in type I and II embryogenic calluses, of 21 and 28 d of the lines studied and of the controls, somatic embryos were observed with the organs typical of the zygotic embryos of the monocotyledoneas (Figure 3F).

CONCLUSIONS

Four embryogenic lines were identified of subtropical white maize (CML332, CML78, CML395 and CML442), with regenerative capacity of fertile

Vasil *et al.* (1985) y Franz y Schel (1994) mencionaron que la localización de los centros proembriogénicos en estas regiones se debe a que sus células se encuentran indiferenciadas y en fase embriogénica; por tanto, son fácilmente estimuladas por las auxinas. También señalaron que la presencia de centros proembriogénicos cercanos al procambium del explante puede estar relacionado con los altos niveles de fitohormonas y flujo de nutrientes en estos sitios. Finalmente, en callos embriogénicos tipo I y II, de 21 y 28 d de las líneas estudiadas y de los testigos se observaron embriones somáticos con los órganos típicos de los embriones cigóticos de las monocotiledóneas (Figura 3F).

CONCLUSIONES

Se identificaron cuatro líneas embriogénicas de maíces blancos subtropicales (CML332, CML78, CML395 y CML442), con capacidad regenerativa de plantas fértiles y potenciales para ser sometidas a transformación genética. Se observó una respuesta diferencial de los genotipos a las tres dosis y a las auxinas 2,4-D y Dicamba durante la inducción de embriogénesis somática. Se obtuvieron embriones somáticos con los órganos típicos de las monocotiledóneas, cuyo origen estuvo en las células cercanas a la subepidermis y al sistema vascular de los embriones cigóticos cultivados como explantes.

AGRADECIMIENTOS

A Ana M. Sánchez del CIMMYT y al Dr. Jorge Valdez del Colegio de Postgraduados, por la toma de fotografías y fotomicrografías.

LITERATURA CITADA

- Armstrong, C. L., and C. E. Green. 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164: 207-214.
- Armstrong, C. L., J. Romero-Severson, and T. K. Hodges. 1992. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 84: 755-762.
- Bohorova, N. E., B. Luna, R. M. Brito, L. D. Huerta, and D. A. Hoisington. 1995. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. *Maydica* 40: 275-281.
- Bohorova, N., R. Frutos, M. Royer, P. Estañol, M. Pacheco, Q. Rascón, S. McLean, and D. Hoisington. 2001. Novel synthetic *Bacillus thuringiensis cry1B* gene and the *cry1B-cry1Ab* translational fusion confer resistance to southwestern corn borer, sugarcane borer and fall armyworm in transgenic tropical maize. *Theor. and Appl. Genet.* 103: 817-826.
- Bronsema, F. B. F., P. Redig, W. J. F. Van Oostveen, H. A. Van Onckelen, and A. A. M. Van Lammeren. 1996. Uptake and

plants and potential for being subjected to genetic transformation. A differential response was observed of the genotypes to the three doses and auxins 2, 4-D and Dicamba during the induction of somatic embryogenesis. Somatic embryos were obtained with the organs typical of the monocotyledoneas, whose origin was in the cells near the subepidermis and the vascular system of the zygotic embryos cultivated as explants.

—End of the English version—



biochemical analysis of 2,4-D in cultured zygotic embryos of *Zea mays* L. *J. Plant Physiol.* 149: 363-371.

- Bronsema, F. B. F., W. J. F. Van Oostveen, and A. A. M. Van Lammeren. 1997. Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines A188 and A632. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50: 57-65.
- Bronsema, F. B. F., W. J. F. Van Oostveen, and A. A. M. Van Lammeren. 2001. Influence of 2,4-D, TIBA and 3,5-D on the growth response of cultured maize embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 45-56.
- Carvalho, C. H. S., N. Bohorova, P. N. Bordallo, L. L. Abreu, F. H. Valicente, W. Bressan, and E. Paiva. 1997. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Rep.* 17: 73-76.
- Chu, C. C., C. C. Wang, and C. S. Sun. 1975. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Science Sinica* 18: 659-668.
- De Aguiar-Perecin, M. L. R., A. Fluminhan, J. A. Dos Santos-Serejo, J. R. Gardingo, M. R. Bertão, M. J. U. Decico, and M. Mondin. 2000. Heterochromatin of maize chromosomes: structure and genetic effects. *Genet. and Mol. Biol.* 23: 1015-1019.
- Duncan, D. R., M. E. Williams, B. E. Zehr, and J. M. Widholm. 1985. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta* 165: 322-332.
- El-itriby, H. A., S. K. Assem, E. M. H. Hussein, F. M. Abdel-Galil, and M. A. Madkour. 2003. Regeneration and transformation of Egyptian maize inbred lines via immature embryo culture and a biolistic particle delivery system. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant* 39: 524-531.
- Franz, P. F., and J. H. N. Schel. 1994. Ultrastructural studies on callus development and somatic embryogenesis in *Zea mays* L. In: Bajaj Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Maize*. Springer-Verlag, Berlin. Vol. 25, pp: 50-65.
- Iracheta-Donjuan, L., M. C. López-Peralta, V. A. González-Hernández, I. Sánchez-Cabrera, y E. Cárdenas-Soriano. 2003. Variación genotípica en la capacidad organogénica *in vitro* del maíz. *Agrociencia* 37: 451-465.
- Jähne, A., D. Becker, and H. Lörs. 1995. Genetic engineering of cereal crop plants: a review. *Euphytica* 85: 35-44.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Neuffer, M. G., E. H. Coe, and S. R. Wessler. 1997. *Mutants of Maize*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 468 p.
- O'Kennedy, M. M., J. T. Burger, and D. K. Berger. 2001. Transformation of elite white maize using the particle inflow gun and

- detailed analysis of a low-copy integration event. *Plant Cell Rep.* 20: 721-730.
- Phillips, G. C. 2004. Invited review: *in vitro* morphogenesis in plants-recent advances. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant* 40: 342-345.
- SAS Institute. 2000. SAS/STAT User' Guide. Release 6.03. Cary, NC. USA.
- Slater, A., N. W. Scott, and M. R. Fowler. 2003. *Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plants*. Oxford University Press. United Kingdom. 368 p.
- Steel, R. G., and J. H. Torrie. 1997. *Principles and Procedures of Statistics: a Biometrical Approach*. 3a ed. Mc-Graw Hill, New York. 666 p.
- Suprasanna, P., K. V. Rao, and G. M. Reddy. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration in maize. *Acta Horticulturae* 289: 265-266.
- Vasil, V., C. Lu, and I. K. Vasil. 1985. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Protoplasma* 127: 1-8.