

Desarrollo floral del maíz *in vitro* durante la inducción y multiplicación de brotes*

Maize floral development *in vitro* during the induction and shoot multiplication

Mónica Beatriz López Hernández^{1§}, Ma. Cristina Guadalupe López Peralta², Víctor Arturo González Hernández³ y Elizabeth Cárdenas Soriano⁴

¹Campo Experimental Edzná, INIFAP, Carretera Campeche-Pocayum, km 15.5 San Francisco de Campeche, Campeche. C. P 24520. Tel. 01 9818139748. (lopez.monica@inifap.gob.mx). ²Fisiología Vegetal, ³Genética y ⁴Fitosanidad. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P. 56230. Tel. 01 5959520200. (cristy@colpos.mx), (vagh@colpos.mx). [§]Autora para correspondencia: lopez.monica@inifap.gob.mx.

Resumen

El cultivo *in vitro* para la inducción floral presenta una ventaja por la facilidad de aplicar diversos estímulos que induzcan o inhiban este fenómeno sin involucrar factores ambientales (Scorza, 1982). Los altos rendimientos en maíz como en muchos cultivos depende principalmente del número de granos producidos por planta y se ha observado que el número de mazorcas está determinado por reguladores de crecimiento endógenos (Leal-León *et al.*, 2002). Durante la organogénesis directa del maíz *in vitro* obtenida a partir de la base del coleóptilo se generan estructuras reproductivas femeninas de manera precoz, lo cual es un problema en la inducción y multiplicación *in vitro* de brotes de maíz debido a la competencia por la asimilación de los componentes del medio de cultivo (Iracheta *et al.*, 2003). En el Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, en 2006 se estudió la función de las fitohormonas en el desarrollo floral de líneas de maíz en la inducción y multiplicación de brotes probando diferentes citocininas en diferentes dosis y en combinación con dos dosis de ácido indol acético. Las líneas evaluadas difirieron en su capacidad morfogénica, siendo las líneas de maíz L13 y L14 las que mostraron la mayor capacidad de inducción de brotes. La iniciación floral se detectó entre 10

Abstract

In vitro culture for floral induction has an advantage because of the ease of applying various stimuli that induce or inhibit this phenomenon without involving environmental factors (Scorza, 1982). High yields in maize as in many crops depend primarily on the number of grains per plant produced and has been observed that the number of ears is determined by endogenous growth regulators (Leal-Leon *et al.*, 2002). During direct organogenesis *in vitro* of corn obtained from the base of the coleoptile female reproductive structures are generated at an early stage, which is a problem in the induction and *in vitro* multiplication of shoots of corn due to competition for the assimilation of components of the culture medium (Iracheta *et al.*, 2003). In the Graduate College in Agricultural Sciences in 2006 studied the role of phytohormones in floral development of maize lines in the induction and shoot multiplication trying different cytokinins at different doses and in combination with two doses of indole acetic acid. The lines tested differed in their morphogenic capacity, being the maize lines L13 and L14 which showed the highest shoot induction capacity. Floral initiation was detected between 10 and 15 d from seeding explants. The development of female inflorescences

* Recibido: enero de 2011
Aceptado: agosto de 2012

y 15 d a partir de la siembra de explantes. El desarrollo de inflorescencias femeninas dependió del tipo de citocininas (de mayor a menor respuesta): BAP> KIN> TDZ. Con ZEA y 2iPA sólo se inducen y multiplican brotes vegetativos.

Palabras clave: *Zea mays* L., auxinas, citocininas, inflorescencias femeninas, tipo y dosis hormonal.

Introducción

Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se usan en la agricultura para la producción masiva de clones sanos, y para estudios bioquímicos, fisiológicos, anatómicos, de selección *in vitro*, entre otros (Roca y Mroginski, 1991). El éxito reproductivo de una planta depende de que complete su ciclo hasta la floración (Montero y Jiménez, 2009). Durante el proceso de inducción floral, a nivel meristemo, ocurren una serie de eventos que afectarán el hábito de crecimiento vegetativo, incluyendo pérdida de la dominancia apical, alargamiento del tallo, cambios en la filotaxia y la forma de la hoja (Galoch *et al.*, 2002).

El inicio de la floración está fuertemente regulado por cambios ambientales relacionados con factores estacionales tales como el fotoperiodo, la temperatura y el estado de desarrollo de la planta (Bernier *et al.*, 1993). El cultivo *in vitro* para los estudios de inducción floral presentan una ventaja por la facilidad de aplicar diversos estímulos que induzcan o inhiban este fenómeno sin involucrar factores ambientales (Scorza, 1982). Dichos estudios han buscado establecer un modelo eficiente, reproducible y simple para la inducción floral; lo anterior con el fin de facilitar estudios a nivel molecular y bioquímico de los procesos involucrados como: inactivación, sobreexpresión, interacción entre genes y factores de transcripción, avances en la producción de híbridos entre otros estudios (Nadgauda *et al.*, 1990; Roldan *et al.*, 1999; Rohit *et al.*, 2009).

En maíz, los altos rendimientos dependen principalmente del número de granos producidos por cada planta y se ha observado que el número de mazorcas por plantas está determinado por reguladores de crecimiento endógenos (Leal-León *et al.*, 2002). Por tanto, este sistema puede ser de mucha utilidad para estudiar los diferentes procesos involucrados en el desarrollo de las inflorescencias de maíz; debido a que muchos procesos de desarrollo vegetal son complejos de estudiar *in vivo*. En la organogénesis del maíz, el tiempo de obtención de regenerantes se reduce considerablemente con el

depended on the type of cytokinin (highest to lowest response): BAP> KIN> TDZ. With ZEA and 2iPA only induce and multiply vegetative shoots.

Key words: *Zea mays* L., auxins, cytokinins, female inflorescences, type and hormonal dose.

Introduction

The techniques of plant tissue culture *in vitro* are used in agriculture for the mass production of healthy clones, and for biochemical, physiological, anatomical, selection *in vitro*, among others studies (Roca and Mroginski, 1991). The reproductive success of a plant depends to complete its cycle to flowering (Montero and Jiménez, 2009). During the process of floral induction, at meristem level, a series of events occur that affect the vegetative growth habit, including loss of apical dominance, stem elongation, changes in phyllotaxy and leaf shape (Galoch *et al.*, 2002).

The onset of flowering is strongly regulated by environmental changes related to seasonal factors such as photoperiod, temperature and state of development of the plant (Bernier *et al.*, 1993). The cultivation *in vitro* for studies of floral induction has an advantage because of the ease of applying various stimuli that induce or inhibit this phenomenon without involving environmental factors (Scorza, 1982). These studies have sought to establish an efficient model, reproducible and simple for floral induction; the above in order to facilitate studies at the molecular and biochemical level of processes involved as inactivation, overexpression, interaction between genes and transcription factors, advances in production of hybrids among other studies (Nadgauda *et al.*, 1990, Roldan *et al.*, 1999; Rohit *et al.*, 2009).

In maize, high yields depend mainly on the number of produced grains per plant and has been observed that the number of ears per plant is determined by endogenous growth regulators (Leal-León *et al.*, 2002). Therefore, this system can be very useful to study the different processes involved in the development of inflorescences of maize; due to many plant development processes are complex to study *in vivo*. In the organogenesis of corn, the obtaining time of regenerants is greatly reduced with the use of shoot apices as explants. Direct organogenesis, allows avoiding the problems of somaclonal variation occurring when trying to regenerate plantlets via callus and cell culture (Nadhi and de Wet, 1995).

empleo de ápices de brotes como explantes. La organogénesis directa, permite evadir los problemas de variación somaclonal que se presentan al tratar de regenerar plántulas vía cultivo de células y callos (Nadhi y de Wet, 1995).

De manera general, el factor principal en el desarrollo de estructuras reproductivas son las fitohormonas las cuales son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas y que influyen sobre su desarrollo; son consideradas como las principales señales de estímulo para la inducción floral. Su relación tanto a nivel de la inducción como de morfogénesis de la flor, indica que su acción es multifactorial (Bernier *et al.*, 1993; Perillelux y Bernier, 1997; Williams, 2004).

A nivel fisiológico las citocininas han sido determinantes en la inducción floral de muchas especies de plantas; en cultivos *in vitro* las citocininas pueden inducir el desarrollo floral a partir de varios órganos. Al respecto, explantes nodales de *Ocimum basilicum* L. mostraron proliferación de brotes después de 7 a 10 d cultivados en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1.5 mg L⁻¹ de Kinetina; 90% de estos brotes se diferenciaron en flores al ser subcultivados sobre medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 5 mg L⁻¹ de Bencil aminopurina y 1 mg L⁻¹ de ácido indol acético (Sudhakaran y Sivasankari, 2002). Leal *et al.* (2002) encontraron que el crecimiento de inflorescencias femeninas de maíz fue promovido por AIA a 1.5 mg L⁻¹ y Zeatina a 1 mg L⁻¹. Rohit *et al.* (2009) observaron el desarrollo de inflorescencias femeninas generadas de brotes apicales en Medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹, después de 42 d de incubación.

De acuerdo a los antecedentes mencionados, el objetivo de esta investigación fue estudiar el desarrollo de inflorescencias durante la inducción y multiplicación *in vitro* de brotes de maíz en presencia de diferentes dosis y tipos de fitohormonas. También se presenta evidencia sobre la histología y desarrollo de las inflorescencias usando la técnica de microscopía de barrido.

Materiales y métodos

Material vegetal, medio de cultivo y condiciones ambientales de incubación. El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología agrícola del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Se usaron semillas sanas y de tamaño

In general, the main factor in the development of reproductive structures are phytohormones which are organic compounds synthesized by plants and influence on its development; are considered the main stimulus signals for flower induction. Their relationship at both levels of induction and morphogenesis of the flower indicates that its action is multifactorial (Bernier *et al.*, 1993; Perillelux and Bernier, 1997; Williams, 2004).

At physiological level the cytokinins have been determinant in the floral induction of many plant species; *in vitro* cultures cytokinins can induce floral development from various organs. In this regard, nodal explants *Ocimum basilicum* L. showed shoot proliferation after 7 to 10 d grown on MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 1.5 mg L⁻¹ of kinetin, 90% of these shoots were differentiated into flowers when subcultured on MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 5 mg L⁻¹ of Benzyl aminopurine and 1 mg L⁻¹ of indole acetic acid (IAA) (Sudhakaran and Sivasankari, 2002). Leal *et al.* (2002) found that the growth of maize female inflorescences was promoted by IAA to 1.5 mg L⁻¹ and Zeatin to 1 mg L⁻¹. Rohit *et al.* (2009) observed the development of female inflorescences generated of apical shoots in MS medium supplemented with 2 mg L⁻¹, after 42 d of incubation.

According to the above background, the objective of this research was to study the development of inflorescences during induction and *in vitro* multiplication of shoots of maize in presence of different doses and types of phytohormones. It also presents evidence on the histology and development of inflorescences using the technique of scanning microscopy.

Materials and methods

Plant material, culture medium and environmental conditions of incubation. The experiment was conducted in the laboratory of agricultural biotechnology from the Montecillo *Campus* of the Graduate College of Agricultural Sciences. Were used healthy seeds of and uniform size of ten experimental inbred lines: LE13, LE14, LE15, LE16, LE20, LE29, LE30, LE46, LE48, and LE78 generated in the genetic program of the Montecillo *Campus*, Graduate College of Science agriculture, through the project “formation of archetypes of corn”. We used the basic culture medium of

uniforme de diez líneas endogámicas experimentales: LE13, LE14, LE15, LE16, LE20, LE29, LE30, LE46, LE48, y LE78, generadas en el programa de genética del Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, a través del proyecto “formación de arquetipos de maíz”. Se usó el medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962), 30 g L⁻¹ sacarosa, 6.5 g L⁻¹ agar Merck®, y las fitohormonas según los tratamientos a evaluar. El pH fue ajustado a 5.7 y 5.8, según la etapa de evaluación con un potenciómetro (Orion Research Digital pH/milivoltmeter 611). El medio de cultivo se esterilizó en una autoclave vertical (AESA, modelo 300) a 121 °C y 1.1 kg cm⁻² presión durante 20 min. Los frascos y tubos con el material sembrado se colocaron en un cuarto de incubación con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad proporcionado por lámparas de luz blanca fría fluorescente de 75 W, (irradiación fotosintética de 45 µmol m⁻² s⁻¹), temperatura de 26 ± 2 °C y humedad relativa de 30%.

Análisis estadístico. Todos los análisis estadísticos se hicieron con el paquete estadístico SAS (Institute Inc., N.C. USA, 2000); para la comparación de medias se utilizó la prueba de tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Germinación *in vitro*. Semillas de diez líneas experimentales de maíz se desinfectaron de acuerdo a Iracheta *et al.* (2003). Las semillas desinfectadas fueron colocadas en tubos de ensayo de 75 mL con 10 mL del medio basal Murashige y Skoog (1962) pH a 5.7. El periodo de incubación fue de 12-15 d.

Evaluación de la respuesta genotípica y de la posición del explante en la inducción de brotes. Las diez líneas experimentales mencionadas anteriormente fueron comparadas en cuanto a su capacidad organogénica para formar brotes. De cada plántula se escindió el primer centímetro basal del coleóptilo, del cual se cortaron los primeros cinco discos (explantes) de 1 mm de grosor, conservando la posición del explante en la planta. Los explantes asépticos fueron colocados en frascos de 250 mL con 30 mL de medio de cultivo para la inducción de brotes; constituido por el medio básico MS (1962), y suplementado con 6.6 µM de BAP y 5.7 µM de AIA, pH de 5.8. A los 21 d de incubación se registró el número de explantes con brotes (NEB), número de brotes por explante (NBE), número de hojas por brotes (NHB), longitud del brote (LB) y porcentaje de supervivencia de explantes (SE). Las variables se analizaron con un diseño completamente al azar con 12 repeticiones.

Murashige and Skoog (1962), 30 g L⁻¹ sucrose, 6.5 g L⁻¹ agar Merck®, and the phytohormones according to evaluate treatments.

The pH was adjusted to 5.7 and 5.8, according to the evaluation stage with a potentiometer (Orion Research Digital pH / milivoltmeter 611). The culture medium was sterilized in a vertical autoclave (AESA, model 300) at 121 °C and 1.1 kg cm⁻² pressure for 20 min. The bottles and tubes with seeded material were placed in an incubation room with a photoperiod of 16/8 h light / dark provided by white lamps of 75 W fluorescent (photosynthetic irradiance of 45 µmol m⁻² s⁻¹), temperature of 26 ± 2 °C and relative humidity of 30%.

Statistical analysis. All statistical analyzes were performed using the statistical package SAS (Institute Inc., N.C. USA, 2000); for comparison of means was used the Tukey test with a significance level of $p \leq 0.05$.

Germination *in vitro*. Seeds of ten experimental maize lines were disinfected according to Iracheta *et al.* (2003). Disinfected seeds were placed in test tubes of 75 mL with 10 mL of the basal medium Murashige and Skoog (1962) pH 5.7. The incubation period was 12-15 d.

Genotypic response evaluation and position of the explant in the induction of shoots. The ten experimental lines mentioned above were compared for their organogenic capacity to form shoots. Of each seedling was cleaved the first centimeter from the base of the coleoptile, which was cut the first five discs (explants) of 1 mm thick, keeping the position of the explant on the plant. Aseptic explants were placed in 250 mL flasks containing 30 mL of culture medium for shoot induction; the basic medium consisting of MS (1962), and supplemented with 6.6 µM of BAP and 5.7 µM IAA, pH 5.8. At 21 d of incubation was recorded the number of explants with shoots (NEB), number of shoots per explant (NBE), number of leaves per shoot (NHB), shoot length (LB) and percentage survival of explants (SE). The variables were analyzed using a completely randomized design with 12 repetitions.

Effect of different types and doses of hormones in floral initiation during the induction of shoots. Aseptic seedlings of the experimental line L13, were extracted the first two segments (1 mm thick discs each) from the basal part of stem, and incubated in the basic medium MS (1962) pH 5.8 and factorial combinations according to treatments (Table 1). At 21 d of incubation were recorded NEB and the NBE. The

Efecto de diferentes tipos y dosis hormonales en la iniciación floral durante la de inducción de brotes.

De plántulas asépticas de la línea experimental L13, se extrajeron los dos primeros segmentos (discos de 1 mm grosor cada uno) de la parte basal del tallo, y se incubaron en el medio básico MS (1962) pH de 5.8 y combinaciones factoriales según tratamientos (Cuadro 1). A los 21 d de incubación se registró el NEB y el NBE. Los datos se analizaron mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial (5 x 3 x 2) con 12 repeticiones, correspondiente a las combinaciones de cinco citocininas entres dosis y dos dosis de AIA.

Efecto de diferentes tipos y dosis hormonales en la iniciación floral durante la multiplicación de brotes.

Brotes obtenidos en la etapa de inducción se transfirieron a un medio de multiplicación de brotes donde se usó el mismo medio, tipos y concentraciones hormonales empleados en la fase de inducción. Al terminar el periodo de incubación se registró la tasa de multiplicación de brotes TMB (número de brotes producidos a partir del brote inicial o tasa de multiplicación de brotes) y el número de inflorescencias por brote (NIB). Las variables se analizaron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 5 x 3 x 2 con 12 repeticiones.

Análisis microscópico de la iniciación floral *in vitro* a partir de brotes.

Para identificar el tiempo de inicio de los primordios florales por brote, se tomaron muestras de brotes por tratamiento (Cuadro 1) de la línea experimental L13 a los 10, 15 y 20 d después de la siembra de explantes en el medio de inducción. Los brotes se diseccionaron y observaron en un microscopio estereoscópico para observar el estado de desarrollo.

Análisis histológico de inflorescencias de maíz obtenidas *in vitro*.

Muestras tomadas durante las fases de inducción y multiplicación se fijaron en FAA (alcohol etílico absoluto, ácido acético glacial, formaldehído y agua destilada, en proporción 50:5:10:35 v/v) por un periodo de 72 h y se deshidrataron en alcohol etílico (50,70, 96 y 100%) e incluyeron Paraplast Sigma®. Los cortes histológicos de 12 µm de grosor se hicieron con un micrótopo rotatorio (Spencer 820), se colocaron en un baño de flotación (agua y grenetina) a 60 °C, se adherieron a portaobjetos y se tiñeron con safranina-verde rápido. Finalmente los cortes se montaron en resina sintética, se observaron y fotografiaron con un microscopio III Carl Zeiss con una cámara digital Pixera Profesional integrada.

data was analyzed using a completely randomized design with factorial arrangement (5 x 3 x 2) with 12 replications, corresponding to combinations of five cytokinins in three doses and two doses of IAA.

Cuadro 1. Tipos y dosis de citocininas en combinación con dos dosis AIA para evaluar la iniciación floral *in vitro* de la línea de maíz L13.

Table 1. Type and doses of cytokinins in combination with two doses IAA to evaluate *in vitro* floral initiation of maize line L13.

Tipo de citocinina		AIA	
	µM	5.7 µM	7.4 µM
BAP	2.2	T2	T5
	4.4	T3	T6
	6.6	T4	T7
	2.2	T8	T11
ZEA	4.4	T9	T12
	6.6	T10	T13
	2.2	T14	T17
	4.4	T15	T18
2iPA	6.6	T16	T19
	2.2	T20	T23
	4.4	T21	T24
	6.6	T22	T25
KIN	2.2	T26	T29
	4.4	T27	T30
	6.6	T28	T31
	0.0	0.0 T1*	0.0

BAP= bencilaminopurina; ZEA= zeatina; 2iPA= 6-dimetilalil-amino-purina; KIN=kinetina; TDZ= 1-fenil-3-(1,2,3-Tia-Diazol-5-il)-urea; AIA= ácido indol-3-acético; T1*= testigo sin hormonas.

Effect of different types and doses of hormones in floral initiation during shoot multiplication.

Shoots obtained in the induction stage were transferred to a shoot multiplication medium where the same medium was used, types and concentrations employed in hormonal induction phase. At the end of the incubation period was recorded shoot multiplication rate of TMB (number of shoots produced from the initial shoot or shoot multiplication rate) and number of inflorescences per shoot (NIB). The variables were analyzed in a completely randomized design with factorial 5 x 3 x 2 with 12 replications.

Microscopic analysis of floral initiation *in vitro* from shoots.

To identify the time of onset of floral primordia per shoot, shoot samples were taken per treatment (Table 1) of the experimental line L13 at 10, 15 and 20 d after seeding of

Observación del desarrollo floral *in vitro* mediante microscopía electrónica de barrido. Muestras de inflorescencias menores de 1 cm de tamaño y provenientes de la fase de multiplicación de brotes fueron fijadas por 24 h en glutaraldehído 3% y una solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH 7.4. Posteriormente las muestras fueron lavadas con agua destilada y deshidratadas mediante inmersiones consecutivas en soluciones de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% y 90% de alcohol, durante 15 min cada una. Después de la deshidratación las muestras se secaron a punto crítico con CO₂ en una secadora Sandri-780A® y se recubrieron con oro durante 4 min en una ionizadora JFC-1100®. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-35C®.

Resultados y discusión

Evaluación de la respuesta genotípica y de la posición del explante en la inducción de brotes. Se detectaron diferencias estadísticas entre las diez líneas de maíz en NEB, NBE y SE. Las líneas L13 y L14 mostraron la mayor capacidad organogénica en NEB, mientras que L29 y L30 presentaron la menor capacidad en NEB (Cuadro 2). En el NBE los genotipos L13, L14, L46, L48 y L78 mostraron los mayores valores. La máxima supervivencia de brotes fue 40% y ocurrió en las líneas L13 y L14. Por tanto, las variaciones en la capacidad organogénica se atribuyen a la variabilidad genética entre las líneas, asociada con variaciones en la concentración endógena de fitohormonas (López *et al.*, 1992). Otros autores (Armstrong y Green, 1985; Pareddy y Petolino, 1990) han señalado que la iniciación y el mantenimiento del cultivo de células y tejidos de maíz y la exitosa regeneración de las plantas, dependen del genotipo, además de factores fisiológicos y ambientales.

Efecto de la posición del explante. De los cinco discos consecutivos (1 a 5) cortados de la base del coleóptilo que se utilizaron como explante, sólo los dos primeros discos cercanos a la parte basal (2 mm) mostraron respuesta organogénica, esto debido a que la base del coleóptilo presenta una zona meristemática (Figura 1A) y; los discos más alejados de la base del coleóptilo, por no contener tallo, fueron incapaces de regenerar brotes, se oscurecieron y senescieron (Iracheta *et al.*, 2003) (Figura 1B). Esto también, fue reportado por Zhong *et al.* (1992 a, b) al observar que los explantes de brotes de maíz con mayor capacidad organogénica fueron las secciones del coleóptilo más cercanas al mesocótilo, generando brotes adventicios y brotes laterales de los entrenudos.

explants in the induction medium. The shoots were dissected and examined under a stereoscopic microscope to observe the state of development.

Histological analysis of inflorescences of corn obtained *in vitro*. Samples taken during the induction and propagation phase were fixed in FAA (absolute ethyl alcohol, glacial acetic acid, formaldehyde and distilled water in proportion 50:5:10:35 v/v) for a period of 72 h, dehydrated in alcohol ethyl (50, 70, 96 and 100%) and included Paraplast Sigma®. Histological sections of 12 µm thickness were made with a rotary microtome (Spencer 820), placed in a float bath (water and gelatin) at 60 °C, was adhered to slides and stained with safranin-fast green. Finally the sections were mounted in synthetic resin, were observed and photographed with Carl Zeiss III microscope with a digital camera integrated Pixera Professional.

Observation of floral development *in vitro* by scanning electron microscopy. Samples of inflorescences smaller than 1 cm in size and coming from the shoot multiplication phase were fixed for 24 h in glutaraldehyde 3% and phosphate buffer 0.2 M, pH 7.4. Subsequently the samples were washed with distilled water and dehydrated by successive immersion in solutions of 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% and 90% alcohol for 15 min each. After dehydration the samples were critical point dried with CO₂ in a dryer Sandri-780A® and coated with gold for 4 min in an ionizer JFC-1100®. The samples were observed in a scanning electron microscope JSM-35C®.

Results and discussion

Genotypic response evaluation and position of the explant in the induction of shoots. Statistical differences were detected among the ten lines of maize in NEB, NBE and SE. Lines L13 and L14 showed the highest organogenic capacity in NEB, while L29 and L30 had the lowest capacity on NEB (Table 2). In the NBE genotypes L13, L14, L46, L48 and L78 showed the highest values. The maximum survival of shoots was 40% and occurred in the lines L13 and L14. Therefore, variations in the organogenic capacity attributable to genetic variability between lines associated with variations in the concentration of endogenous phytohormones (López *et al.*, 1992). Other authors (Armstrong and Green, 1985; Pareddy and Petolino, 1990) have noted that the initiation and maintenance of cell culture and tissue of maize and the successful regeneration of plants depend on the genotype, in addition to physiological and environmental factors.

Cuadro 2. Respuesta organogénica de 10 líneas experimentales de maíz, durante la inducción de brotes en 6.6 µM de BAP y 5.7 µM de AIA.

Table 2. Organogenic response of 10 experimental maize lines during shoot induction at 6.6 µM BAP and 5.7 µM IAA.

Líneas	Número de explantes con brotes	Número de brotes por explante	Supervivencia del explante (%)
L13	2.0 a	1.0 a	40.0 a
L14	1.91 a	1.0 a	40.0 a
L48	1.75 ab	1.0 a	35.0 ab
L46	1.66 abc	1.0 a	33.33 ab
L78	1.66 abc	1.0 a	33.33 ab
L15	1.08 bcd	0.83 ab	21.66 bc
L16	0.91 cd	0.83 ab	18.33 c
L20	0.91 cd	0.75 ab	18.33 c
L29	0.58 d	0.50 b	11.66 c
L30	0.75 d	0.58 b	15.0 c

Medias con diferentes letras en la misma columna son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

Efecto de diferentes tipos y dosis hormonales en la iniciación floral durante la inducción de brotes. En este experimento se probaron 31 tratamientos resultantes de cinco citocininas (BAP, ZEA, KIN, 2iPA y TDZ), cada una en tres dosis (2.2, 4.4 y 6.6 µM), combinadas con dos dosis (5.7 y 7.4 µM) de la auxina AIA, en cuanto a su efecto en la inducción y multiplicación de brotes, y en el desarrollo de estructuras reproductivas de la línea de maíz L13 la cual presentó la mejor respuesta organogénica del resto de las líneas experimentales de maíz.

Se detectaron diferencias estadísticas entre tratamientos en el NEB y NBE por efecto de los tres factores: citocinina (CK), dosis de citocininas (DCK) y dosis de AIA (DA) y de las interacciones citocininas x dosis de citocininas (CKxDCK) y citocininas x dosis de auxinas (CKxDA) lo que evidencia fuertes efectos hormonales durante la inducción de brotes; para NBE sólo hubo diferencias estadísticas entre DCK. BAP fue la mejor citocinina para la inducción de brotes y 2iPA tuvo el menor efecto ($p \leq 0.05$). La inducción se incrementó conforme aumentó la dosis de citocininas de 2.2 a 6.6 µM, en NEB y en NBE; para AIA, 5.7 µM fue mejor dosis que 7.4 µM respecto a NEB ($p \leq 0.05$) (Cuadro 3).

Aunque para todas las citocininas se logró un incremento en el número de brotes al incrementar las dosis hasta 6.6 µM, el máximo número de brotes se logró con 6.6 µM BAP (Figura 2). Similarmente Wenbin *et al.* (2002) reportaron un incremento en el desarrollo de brotes de maíz *in vitro* en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) con 3.5 mg L⁻¹ BAP y 1.5 mg L⁻¹ 2,4-D, indicando que BAP juega un papel crítico durante el desarrollo floral de maíz; esto lo confirman Jana y

Effect of the position of the explant. Of the five consecutive disks (1 to 5) cut of the base of the coleoptile that were used as explants, only the first two disks near the basal part (2 mm) showed organogenic response, this due to the base of the coleoptile has a meristematic region (Figure 1A), and the disks farther from the base of the coleoptile, by not containing stem, were unable to regenerate shoots, darkened and senescent (Iracheta *et al.*, 2003) (Figure 1B). This also was reported by Zhong *et al.* (1992 a, b) by observing that explants corn shoots with higher organogenic capacity were the coleoptile sections closest to the mesocotyl, generating adventitious shoots, and internodes of side shoots.

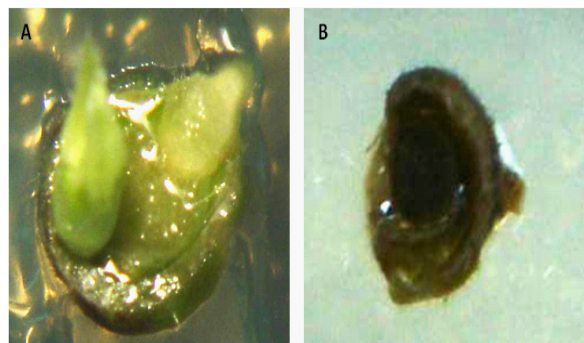


Figura 1. a) discos cercanos a la base del coleóptilo presentaron respuesta organogénica, y b) discos superiores a la base del coleóptilo sin respuesta organogénica.

Figure 1. a) Disks near the base of the coleoptile showing organogenic response; and b) disks above the base of the coleoptile without organogenic response.

Effect of different types and doses of hormones in floral initiation during the induction of shoots. In this experiment were tested 31 treatments resulting from five cytokinins (BAP,

Gyan (2011) en la floración *in vitro* en callos embriogénicos de *Anethum graveolens* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0.5 mg l⁻¹ de BAP.

Cuadro 3. Respuesta organogénica durante la inducción de brotes de la línea de maíz L13 en diversas combinaciones hormonales.

Table 3. Organogenic response during induction of shoots of maize line L13 in different hormonal combinations.

Tratamientos citocinina	Explantos con brotes	Brotes por explante
BAP	1.2 a	0.7 a
ZEA	0.9 ab	0.6 a
KIN	0.8 ab	0.6 a
TDZ	0.8 ab	0.6 a
2iPA	0.7 b	0.6 a
Dosis de citocinina (μM)		
6.6	1.5 a	0.9 a
4.4	0.9 b	0.6 b
2.2	0.4 c	0.3 c
Dosis de AIA (μM)		
5.7	1.0 a	0.6 a
7.4	0.8 b	0.4 a

Medias con diferentes letras en la misma columna son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

De acuerdo con Raman *et al.* (1980), el número de brotes axilares de maíz cultivado *in vitro* se incrementa con la aplicación kinetina en comparación con otras fitohormonas y con ZEA y BAP se indujeron estructuras reproductivas. Brotes *in vitro* de bambú (*Bambusa edulis*) derivados de espigas, desarrollados por embriogénesis somática, fueron inducidos para florecer sobre medio MS con 0.30 g L⁻¹ de sacarosa, diferentes hormonas fueron añadidas al medio de cultivo: 0.5 μM TDZ, 23.2 μM KIN, 16.2 μM BAP y 22.8 μM ZEA y varias concentraciones de ácido naftalen acético (ANA): 0, 2.7, 5.4, 26.9 y 53.8 μM, para probar sus efectos sobre la floración *in vitro*. Los resultados mostraron que ANA fue un regulador negativo dependiente de citocinina para la floración *in vitro*; TDZ incrementó la tasa de floración 47% al igual que BAP con 42.9%. ANA incrementó el enraizamiento pero inhibió el crecimiento reproductivo inducido por el TDZ así como el número de brotes reproductivos. Al incrementar la concentración de ANA a 53.8 μM, declinó la floración *in vitro* (Chuan *et al.*, 2003).

El efecto de cada citocinina en las dos dosis de AIA fue diferente (Figura 3). Por ejemplo el número de explantes con brotes inducido por TDZ y 2iPA se redujo considerablemente

ZEA, KIN, 2iPA and TDZ), each at three doses (2.2, 4.4 and 6.6 μM) combined with two doses (5.7 and 7.4 μM) of auxin IAA, as to their effect on the induction and shoot multiplication, and the development of reproductive structures of maize line L13 which presented the best organogenic response from the other experimental maize lines.

Statistical differences were detected between treatments in the NEB and the NBE as a result of three factors: cytokinin (CK), doses of cytokinins (DCK) and doses of IAA (DA) and interactions of the cytokinins x dose of cytokinins (CKxDCK) and cytokinins x dose of auxin (CKxDA) which shows strong hormonal effects during induction of shoots; for NBE were only statistical differences between DCK. BAP was the best cytokinin for shoot induction and 2iPA had the least effect ($p \leq 0.05$). The induction increased as the cytokinins dose increased from 2.2 to 6.6 μM, in NEB and NBE; for IAA, 5.7 μM dose was better regarding NEB 7.4 μM ($p \leq 0.05$) (Table 3).

While all cytokinins achieved an increase in the number of shoots by increasing the dose up to 6.6 μM, the highest number of shoots was achieved with 6.6 μM BAP (Figure 2). Similarly Wenbin *et al.* (2002) reported an increase in the maize shoot development *in vitro* on MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) with 3.5 mg L⁻¹ BAP and 1.5 mg L⁻¹ 2, 4-D, indicating that BAP plays a critical role during floral development of maize; this is confirmed by Jana Gyan (2011) *in vitro* flowering in embryogenic callus of *Anethum graveolens* on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 0.5 mg l⁻¹ BAP.

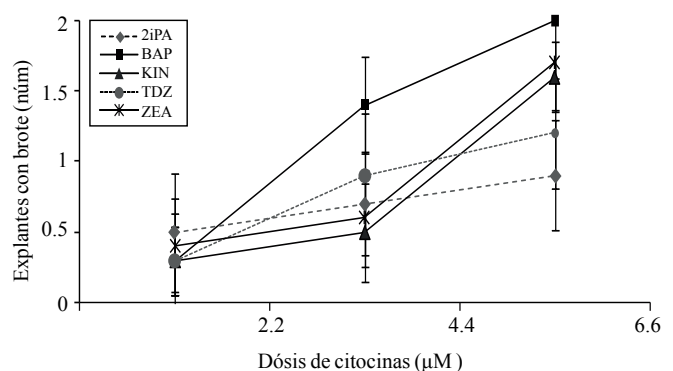


Figura 2. Efecto de la interacción CK x DCK en el NEB de la línea de maíz L13, durante la inducción de brotes. Los datos son medias de doce repeticiones y las barras representan el error estándar.

Figure 2. Effects of the interaction CK x DCK in the NEB of the maize line L13, during the shoot induction. Data are means of twelve replicates and bars represent the standard error.

al aumentar la dosis de AIA, mientras que para BAP, ZEA y KIN la dosis de AIA no afectó su desempeño en inducción de brotes (Figura 3); además, en ambos niveles de AIA, BAP produjo la mayor tasa de organogénesis. Britto *et al.* (2003; Williams, 1991) mencionan que el efecto de citocininas y auxinas en la morfogénesis *in vitro* varía entre especies y variedades, y principalmente depende del nivel endógeno de tales fitohormonas en la planta. Joshi y Nadgauda (1997) probaron el efecto de varias citocininas: AdS, BAP, 2iPA, KIN y ZEA en la floración *in vitro* de bambú; de todas ellas, BAP fue la que indujo floración *in vitro* al igual que KIN y AdS en combinación con BAP. 2iPA y ZEA presentaron un efecto antagonista.

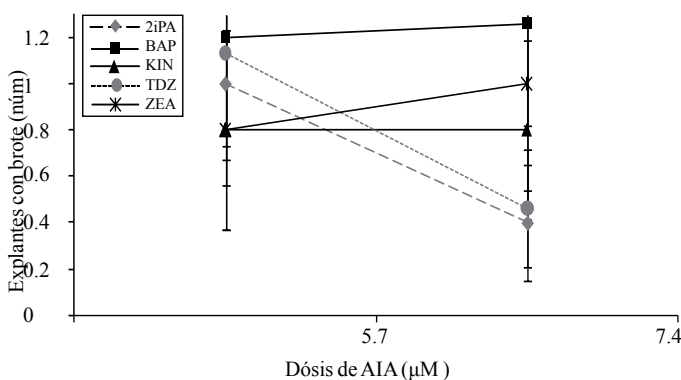


Figura 3. Efecto de la interacción CK x DA en el NEB de la Línea de maíz L13, durante la inducción de brotes. Los datos son medias de doce repeticiones y las barras representan el error estándar.

Figure 3. Effect of CK x DA interaction in the NEB of corn Line L13, during the induction of shoots. Data are means of twelve replicates and bars represent the standard error.

Efecto de tipos y dosis hormonales sobre la iniciación floral durante la multiplicación de brotes. Los brotes generados en la fase de inducción se incubaron en el mismo medio de cultivo con sus respectivos tratamientos hormonales (Cuadro 1) usado para la inducción de brotes. Se detectaron diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre CK y entre DCK tanto en TMB como en NIB, también hubo efecto de las interacciones CKxDCK para la TMB. En general, las citocininas BAP, ZEA, KIN y 2iPA mostraron mayores tasas de multiplicación de brotes que TDZ. Todas las citocininas probadas mostraron mayores tasas de multiplicación de brotes (número de brotes/brote inicial). Estos resultados fueron similares a los observados durante la inducción de brotes respecto a los diferentes tipos y dosis de citocininas (Figura 4).

According to Raman *et al.* (1980), the number of axillary shoots of maize grown *in vitro* increases with kinetin application compared with other phytohormones and with ZEA and BAP reproductive structures were induced. *In vitro* shoots of bamboo (*Bambusa edulis*) derived from spikes, developed by somatic embryogenesis were induced to flower on MS medium with 0.30 g L⁻¹ of sucrose, various hormones were added to the culture medium: 0.5 μM TDZ, 23.2 μM KIN, 16.2 μM BAP and 22.8 μM ZEA and various concentrations of naphthalene acetic acid (NAA): 0, 2.7, 5.4, 26.9 and 53.8 μM, to test their effects on flowering *in vitro*. The results showed that NAA was a negative regulator of cytokinin dependent for flowering *in vitro*; TDZ increased the rate of flowering 47% as BAP with 42.9%. NAA increased rooting but inhibited reproductive growth induced by TDZ and the number of reproductive buds. By increasing the concentration of NAA to 53.8 μM, declined *in vitro* flowering (Chuan *et al.*, 2003).

The effect of each cytokinin at the two doses of IAA was different (Figure 3). For example the number of explants with shoots induced by TDZ and 2iPA was significantly reduced with increasing doses of IAA, while for BAP, ZEA and KIN the dose of IAA did not affect their performance in shoot induction (Figure 3); also at both levels of IAA, BAP produced the highest rate of organogenesis. Britto *et al.* (2003; Williams, 1991) mention that the effect of cytokinins and auxins in morphogenesis *in vitro* varies among species and varieties, and mainly depends on the endogenous level of these phytohormones in the plant. Joshi and Nadgauda (1997) tested the effect of various cytokinins: AdS, BAP, 2iPA, KIN and ZEA *in vitro* flowering of bamboo; of all of them, BAP induced *in vitro* flowering as KIN and AdS in combination with BAP. 2iPA and ZEA had an antagonistic effect.

Effect of types and hormone doses during floral initiation on shoot multiplication. Shoots generated in the induction phase were incubated in the same culture medium with the respective hormone treatments (Table 1) used for shoot induction. Statistical differences were detected ($p \leq 0.05$) between CK and between DCK both TMB as NIB, there was also interaction effect of CKxDCK for TMB. In general, cytokinins BAP, ZEA, KIN and 2iPA showed higher rates of shoot multiplication than TDZ. All cytokinins tested showed higher rates of shoot multiplication (number of shoots / initial shoot). These results were similar to those observed during shoots induction respect to different types and doses of cytokinins (Figure 4).

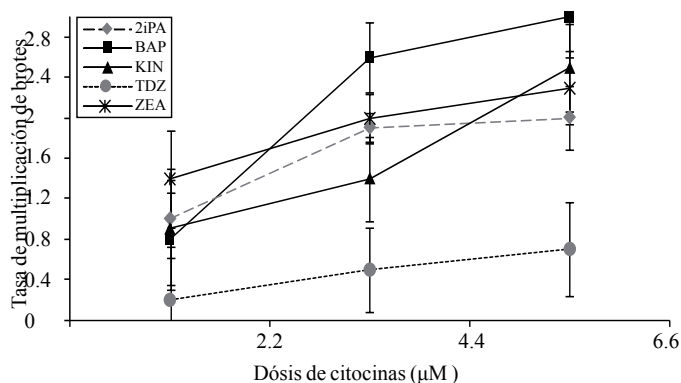


Figura 4. Efecto de la interacción entre tipos de citocininas (BAP, KIN, ZEA, 2iPA y TDZ) y sus diferentes dosis (2.2, 4.4 y 6.6 µM) en la TMB de la Línea de maíz 13. Los datos son medias de doce repeticiones y las barras representan el error estándar.

Figure 4. Effect of interaction between types of cytokinins (BAP, KIN, ZEA, TDZ and 2iPA) and its different doses (2.2, 4.4 and 6.6 µM) in the TMB of the corn Line 13. Data are means of twelve replicates and bars represent the standard error.

El NIB también fue fuertemente influenciado por la interacción entre tipo de citocininas y sus dosis. Para esta variable, 6.6 µM BAP indujo el mayor número de inflorescencias en relación a las otras citocininas evaluadas (Figura 5). Al incrementar las dosis hasta 6.6 µM de las citocininas BAP, KIN y TDZ, se incrementó el número de inflorescencias inducidas por brotes y se redujo el número de brotes vegetativos. Con ZEA y 2iPA no hubo desarrollo floral (Figura 5) lo que indica que estas hormonas estimulan la inducción y multiplicación de brotes en maíz, pero no están involucradas en inducción de floración. Nuestros resultados también indican que BAP estimula tanto el desarrollo de brotes como el desarrollo floral. Esto concuerda con lo encontrado por Sudarshana *et al.* (2008) con BAP a 2 mg L⁻¹ la mayor tasa de floración *in vitro* de *Boerhaavia diffusa* fue más evidente en comparado con otras fitohormonas; indicando que BAP es una hormona determinante para la floración *in vitro*.

De manera similar Xiong y Yazawa (1995) para la inducción y desarrollo floral *in vitro* de brotes de *Phalaenopsis* en medio MS (1962), con 2.2, 4.4, 5.7 y 7.8 µM de BAP; con BAP a 2.2 µM no se formaron brotes florales pero con 5.7 y 7.8 µM 70 % de los brotes formaron flores a los 121 días de cultivo. Según Patil *et al.* (1993) los niveles exógenos de BAP y kinetina estimulan floración *in vitro* al activar los contenidos endógenos de citocininas. Sin embargo, altas concentraciones de varias citocininas pueden inhibir

The NIB was also strongly influenced by the interaction between type of cytokinins and their dosages. For this variable, 6.6 µM BAP induced the highest number of inflorescences in relation to other cytokinins tested (Figure 5). By increasing the dose up to 6.6 µM of cytokinins BAP, KIN and TDZ, increased the number of inflorescences induced by shoots and reduced the number of vegetative shoots. With ZEA and 2iPA there was no floral development (Figure 5) indicating that these hormones stimulate the induction and shoot multiplication in maize, but not involved in induction of flowering. Our results also indicate that BAP stimulates both shoot development and floral development. This agrees with the findings of Sudarshana *et al.* (2008) with BAP at 2 mg L⁻¹ the highest rate *in vitro* flowering of *Boerhaavia diffusa* was more evident in comparison with other phytohormones, indicating that BAP is a crucial hormone for flowering *in vitro*.

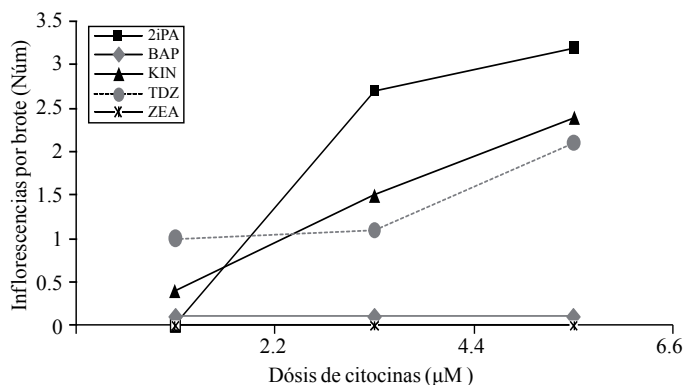


Figura 5. Efecto de la interacción entre citocininas (BAP, KIN, ZEA, 2iPA y TDZ) y sus diferentes dosis (2.2, 4.4 y 6.6 µM) en el desarrollo de inflorescencias por brote de la línea de maíz 13. Los datos son medias de doce repeticiones y las barras representan el error estándar.

Figure 5. Effect of the interaction between cytokinins (BAP, KIN, ZEA, 2iPA and TDZ) and different doses (2.2, 4.4 and 6.6 µM) in the development of inflorescences per shoot of the maize line 13. Data are means of twelve replicates and bars represent the standard error.

Similarly Xiong and Yazawa (1995) for induction and floral development *in vitro* shoots of *Phalaenopsis* on MS medium (1962), with 2.2, 4.4, 5.7 and 7.8 µM of BAP; with BAP at 2.2 µM did not form floral shoots but with 5.7 and 7.8 µM 70% of shoots formed flowers at the 121 days of culture. According to Patil *et al.* (1993) exogenous levels of BAP and kinetin stimulate flowering *in vitro* by activating the endogenous content of cytokinins. However, high concentrations of various cytokinins can inhibit floral induction and cause an effect on vegetative bud sprout (Kachonpadungkitti *et al.*, 2001, Galoch *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2005).

la inducción floral y ocasionar un efecto en la brotación de yemas vegetativas (Kachonpadungkitti *et al.*, 2001; Galoch *et al.*, 2002, Taylor *et al.*, 2005).

En la presente investigación también se estudio la interacción entre los diferentes tipos de citocinina y dos dosis de AIA, en el desarrollo de inflorescencias por brotes; KIN estimuló el desarrollo de inflorescencias por brote, al aumentar la dosis de 5.7 a 7.4 μM AIA; en cambio, con BAP el desarrollo floral disminuyó al incrementar la dosis de AIA. (Figura 6). Con ZEA y 2iPA no se encontró desarrollo de inflorescencias, lo que indica que estas hormonas estimulan la inducción y multiplicación de brotes en maíz, pero sin causar floración. Virupakshi *et al.* (2002) describieron la respuesta de callos derivados de explantes juveniles de *Saccharum officinarum* L. Var. CoC671 en la floración *in vitro*, a partir de hojas jóvenes cultivadas en medio MS suplementado con 3% de sacarosa, 3 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ ANA. La floración fue observada después de 180 días de cultivo y la iniciación de la floración fue explicada por la presencia de brotes florales iniciales en la región embriogénica y por la adición de BAP. De manera similar Zhong *et al.* (1992), observaron el mismo comportamiento en medio de cultivo suplementado con BAP. Srinivasan y Mullins, (1978) encontraron en *Vitis vinifera* L. que el desarrollo de flores fue dependiente de la combinación de BAP y ZEA con AIA, la formación de brotes aumentó de 30% a 75% al aumentar BAP de 2.0 a 5.4 μM .

Análisis microscópico de la iniciación floral *in vitro* a partir de brotes. A los 10 d se detectaron solamente brotes en estado vegetativo. Sin embargo, a los 15 d se observaron yemas axilares en los nudos (Figura 7A) en (T4, T22, T25 y T24) de los 31 tratamientos evaluados. Algunas yemas mostraron la iniciación de flores femeninas lo cual evidencia el inicio de la etapa reproductiva (Figura 7B). A los 20 d se observaron primordios de estructuras reproductivas femeninas (Figura 7 C, D) en estados tempranos y avanzados del desarrollo floral en los tratamientos (T4, T22, T25 y T29).

Análisis histológico de las inflorescencias de maíz obtenidas *in vitro*. En los cortes histológicos de brotes de maíz *in vitro* se observaron células meristemáticas probablemente originando las inflorescencias en la región del parénquima adyacente a los haces vasculares (Figura 8A). Las inflorescencias observadas en los cortes histológicos presentaron varios de los órganos típicos de las inflorescencias femeninas de maíz tales como megasporas, glumas internas

In the present investigation also studied the interaction between different types of cytokinin and two doses of IAA, in the development of inflorescences per shoot; KIN stimulated the development of inflorescences per shoot, by increasing doses of 5.7 to 7.4 μM IAA; however, with BAP floral development decreased when increasing the dose of IAA. (Figure 6). With ZEA and 2iPA found no development of inflorescences, indicating that these hormones stimulate the induction and shoot multiplication in corn, but without causing flowering. Virupakshi *et al.* (2002) described the response of callus derived from juvenile explants *Saccharum officinarum* L. Var. CoC671 in flowering *in vitro*, from young leaves cultured on MS medium supplemented with 3% of sucrose, 3 mg L⁻¹ of 2,4-D and 1 mg L⁻¹ NAA. Flowering was observed after 180 days of culture and initiation of flowering was explained by the presence of floral shoots early in the embryogenic region and by the addition of BAP. Similarly Zhong *et al.* (1992) observed the same behavior in culture medium supplemented with BAP. Srinivasan and Mullins (1978) found in *Vitis vinifera* L. that flower development was dependent on the combination of BAP and ZEA with IAA, shoot formation increased from 30% to 75% by increasing BAP from 2 to 5.4 μM .

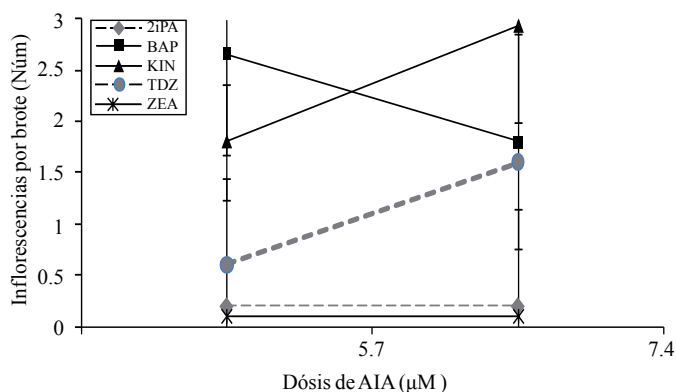


Figura 6. Efecto de la interacción entre citocininas (BAP, KIN, ZEA, 2iPA y TDZ) y dos dosis de AIA (5.7 y 7.4 μM) en el desarrollo de inflorescencias por brote de la línea de maíz L13; durante la multiplicación de brotes. Los datos son media de doce repeticiones y las barras representan el error estándar.

Figure 6. Effect of interaction between cytokinins (BAP, KIN, ZEA, 2iPA and TDZ) and two doses of IAA (5.7 and 7.4 μM) in the development of inflorescences per shoot of maize line L13; during the shoot multiplication. Data are mean of twelve replicates and bars represent the standard error.

y externas, primordio de carpelo y estambre (Figura 8B y C). Los cortes histológicos también mostraron regiones con aspecto meristemático (células pequeñas, redondas y con contenido citoplasmático denso) de células de procambium. Las células de las regiones meristemáticas presentaron gran actividad mitótica y núcleos prominentes (Figura 8 D). Mediante este análisis se puede inferir que las inflorescencias se originaron directamente de las yemas laterales de los brotes vegetativos inducidos previamente a partir de discos de tallo de maíz *in vitro*. Vasil *et al.* (1985) y Fransz y Schel (1994) mencionaron que la presencia de centros proembriogénicos cercanos al procambium puede estar relacionada con los altos niveles de fitohormonas y flujo de nutrientes en estos sitios. Esto podría explicar el origen histológico de las inflorescencias femeninas en el presente estudio.

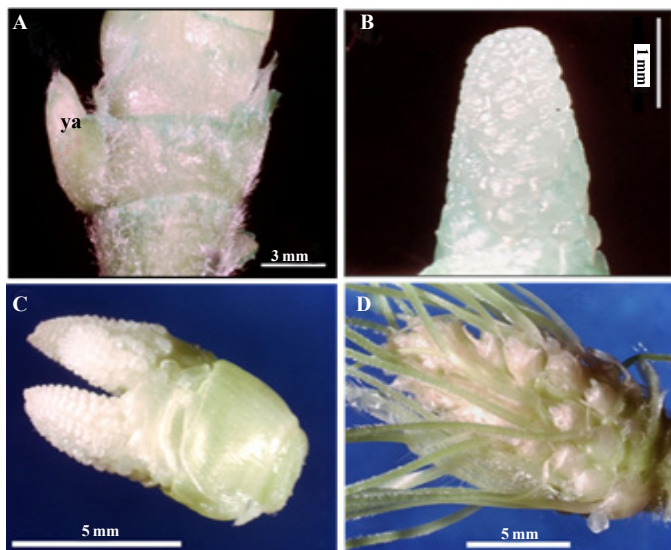


Figura 7. a) yema axilar (ya) a los 15 d de la inducción de brotes *in vitro*; b) iniciación floral femenina a los 15 d de la inducción de brotes. Inicio de primordios laterales en el raquis meristemático de la inflorescencia femenina de los cuales se diferenciarán las espiguillas; c) brote con dos inflorescencias femeninas, ambas en iniciación de pares de espiguillas; y d) elongación de estilos y diferenciación de estigmas.

Figure 7. a) axillary bud (*already*) at 15 d of *in vitro* shoot induction; b) female flower initiation at 15 d of shoot induction. Initiation of lateral primordia in the meristem rachis of the female inflorescence from which differentiated the spikelets; c) shoot with two female inflorescences, both in initiation of pairs of spikelets; and d) elongation of styles and stigma differentiation.

Microscopic analysis of floral initiation *in vitro* from shoots. At 10 d were detected only shoots in vegetative. However, after 15 days were observed axillary shoots at the nodes (Figure 7A) in (T4, T22, T25 and T24) of the 31 treatments tested. Some shoots showed the initiation of female flowers which shows the beginning of the reproductive stage (Figure 7B). At 20 d were observed primordia of female reproductive structures (Figure 7C, D) in early and advanced stages of floral development in treatments (T4, T22, T25 and T29).

Histological analysis of the inflorescences of maize obtained *in vitro*. In the histological sections of maize shoots *in vitro* were observed meristematic cells probably originating inflorescences in the region of parenchyma adjacent to vascular bundles (Figure 8A). The inflorescences observed in histological sections showed various typical organs of female inflorescences of corn such as megaspores, inner and outer glumes, carpel primordia and stamen (Figure 8B and C). The histological sections also showed meristematic regions-like (small cells, round and dense cytoplasm content) cells of procambium. The cells of the meristematic regions showed great mitotic activity and prominent nuclei (Figure 8D). Through this analysis can be inferred that the inflorescences originated directly from lateral buds of vegetative shoots earlier induced from stem disks of corn *in vitro*. Vasil *et al.* (1985) and Fransz and Schel (1994) indicated that the presence of proembryo centers close to procambium may be related to high levels of phytohormones and nutrients flow at these sites. This could explain the histological origin of the female inflorescences in this study.

Observation of floral development *in vitro* by scanning electron microscopy. For a better description of the female reproductive structures found *in vitro* made use of scanning electron microscopy, the results indicate a similar morphology of inflorescences developed from vegetative buds cultured *in vitro* to that observed *in vivo* (Figure 9A). It was observed different structures that make up the female inflorescence of maize as: spikelet meristems (*me*), which initiates the development of glume primordia (Figure 9B); spikelet meristem (*me*) who develops a meristem of flowers (*mf*) and in turn develop the primordia of glumes; outer glume (*ge*) (Figure 9C); also observed the development of floral organs including three anthers (*an*) and pistil primordium (*pp*) (Figure 9D).

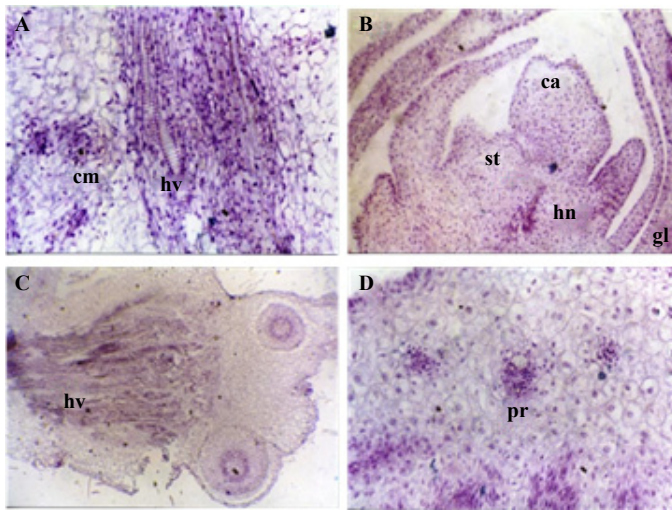


Figura 8. Desarrollo de inflorescencias en brotes originados a partir de discos de tallo de maíz en las fases de inducción, y multiplicación de brotes. a) corte longitudinal del tallo de donde se desarrollaron las inflorescencias; haces vasculares (hv), células meristemáticas (cm); b) corte longitudinal de inflorescencia femenina mostrando diferentes estructuras: carpelo (ca); estambre (st); lema (lm), y gluma (gl); c) corte transversal de un brote mostrando haces vasculares; y d) corte transversal mostrando centros meristemáticos (cm) y procambium (pr).

Figure 8. Development of inflorescences in shoots originated from stem disks of corn in the phases of induction and shoot multiplication. a) longitudinal section of stem from which it developed inflorescences, vascular bundles (hv), meristematic cells (cm); b) longitudinal section of female inflorescence showing different structures: carpel (ca), stamen (st), lemma (lm) and glume (gl); c) cross section of a shoot showing vascular bundles; and d) cross-section showing meristematic centers (cm) and procambium (pr).

Observación del desarrollo floral *in vitro* mediante microscopía electrónica de barrido. Para una mejor descripción de las estructuras reproductivas femeninas encontradas *in vitro* de hizo uso de la microscopía electrónica de barrido, los resultados indican una morfología similar de inflorescencias desarrolladas a partir de brotes vegetativos cultivados *in vitro* a la observada *in vivo*, (Figura 9A). Se pudo observar diferentes estructuras que componen a la inflorescencia femenina del maíz como son: Meristemos de espiguillas (me), el cual da inicio al desarrollo primordios de glumas (Figura 9B); Meristemo de espiguilla (me) que desarrolla un meristemo de florecillas (mf); a su vez se desarrollan los primordios de glumas; gluma externa (ge)

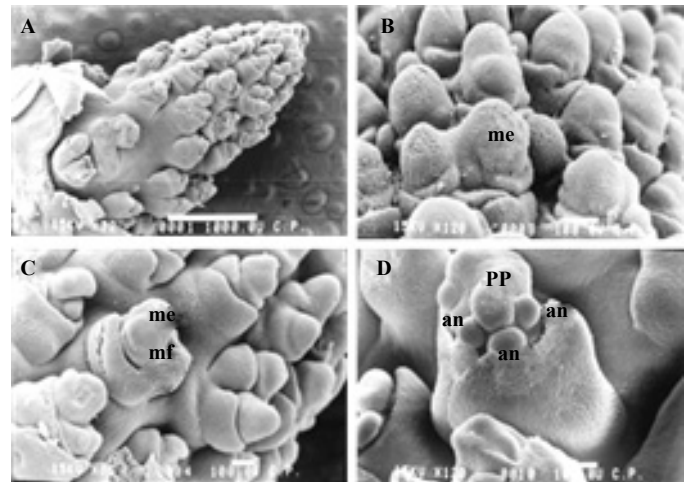


Figura 9. Morfología de inflorescencias femeninas de maíz *in vitro*. a) inflorescencia femenina de apariencia normal; b) meristemo de espiguilla (me); c) meristemo de espiguilla (me) y meristemos de florecillas (mf); y d) anteras (aa) y primordio de pistilo (pp).

Figura 9. Morfología de inflorescencias femeninas de maíz *in vitro*. a) inflorescencia femenina de apariencia normal; b) meristemo de espiguilla (me); c) meristemo de espiguilla (me) y meristemos de florecillas (mf); y d) anteras (aa) y primordio de pistilo (pp).

Conclusions

Organogenic capacity in vegetative shoot induction was differentially expressed in eight experimental maize lines (L13, L14, L15, L16, L20, L46, L48 and L78). Lines L13 and L14 showed the highest organogenic capacity expressed as vegetative shoots, while L29 and L30 lines showed the lowest capacity. During induction of shoots on the line L13, the number of explants with shoots varied depending on the type of cytokinins and their doses, and thus the hormonal response in decreasing order was: BAP > ZEA > KIN and TDZ > 2iPA, being the best dose 6.6 μ M of all cytokinins in combination with IAA (7.4 μ M).

The development of maize female inflorescences occurred during the *in vitro* induction of shoots from the base of the coleoptile (3 mm). The formation of inflorescences varied depending on the type and hormonal dose. The development of female inflorescences of maize *in vitro*, observed during the shoot multiplication stage, varied between types of

(Figura 9C); también se observó el desarrollo de órganos florales incluyendo tres anteras (*an*) y primordio de pistilo (*pp*) (Figura 9D).

Conclusiones

La capacidad organogénica en inducción de brotes vegetativos fue expresada de manera diferencial en ocho líneas experimentales de maíz (L13, L14, L15, L16, L20, L46, L48 y L78). Las líneas L13 y L14 mostraron la mayor capacidad organogénica expresada como brotes vegetativos, mientras que las líneas L29 y L30 presentaron la más baja capacidad. Durante la inducción de brotes en la línea L13, el número de explantes con brotes varió dependiendo del tipo de citocininas y de sus dosis, y así la respuesta hormonal en orden decreciente fue: BAP > ZEA > KIN y TDZ > 2iPA, siendo la mejor dosis 6.6 µM de todas las citocininas en combinación con AIA (7.4 µM).

El desarrollo de inflorescencias femeninas de maíz ocurrió durante la inducción *in vitro* de brotes a partir de la base del coleóptilo (3 mm). La formación de inflorescencias varió en función del tipo y dosis hormonal. El desarrollo de inflorescencias femeninas del maíz *in vitro*, observada durante la etapa de multiplicación de brotes, varió entre tipos de citocininas (de mayor a menor respuesta): BAP > KIN > TDZ. Con las citocininas ZEA y 2iPA no hubo desarrollo de inflorescencias femeninas *in vitro*. Las inflorescencias femeninas del maíz se originaron de las yemas axilares del tallo.

Literatura citada

- Armstrong, C. L. and Green, C. E. 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164:207-214.
- Bernier, G.; Havelange, A.; Houssa, C.; Petitjean, A. and Lejeune, P. 1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 5:1147-1155.
- Britto, S.; Natarajan, J. E. and Arockiasamy, D. I. 2003. *In vitro* flowering and shoot multiplication from nodal explants of *Ceropegia bulbosa*. *Taiwania* 48:106-111.
- Chuo, S.; Chung, C. and Ching, W. 2003. *In vitro* flowering of *Bambusa edulis* and subsequent plantlet survival. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 72:71-78.
- Fransz, P. F. and Schel, H. 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. 25:50-65.
- Galoch, E.; Czaplowska, J.; Burkacka, L. E and Kopcewicz, E. J. 2002. Induction and stimulation of *in vitro* flowering of *Pharbitis nil* by cytokinin and gibberellin. *Plant Growth Regul.* 37:199-205.
- Iracheta, D. L.; López, P. M.; González, H. V. A. and Cárdenas, S. E. 2003. *In vitro* characterization of organogenic capacity in maize: induction, maintenance, rooting and histological origin of shoots. *Agrociencia* 37:451-465.
- Jana, S. and Gyan, S. 2011. Plant growth regulators, adenine sulfate and carbohydrates regulate organogenesis and *in vitro* flowering of *Anethum graveolens*. *Acta Physiol Plant.* 33(2):305-311.
- Joshi, M. S. and Nadgauda, R. S. Cytokinin and *in vitro* induction of flowering in bamboo: *Bambusa ruginosa*. *Current Sci.* 73:523-526.
- Kachonpadungkitti, Y.; Romchatngoen, S.; Hasegawa, K. and Hisajima, S. 2001. Efficient flower induction from cultured buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.) node segments *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 35:37-45.
- Leal, L. V.; López, P. M. and González, H. V. *In vitro* development of young maize ears. 2002. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 71:133-139.
- López, P. M.; Sánchez, C. I. y Muñoz, L. S. 1992. Propagación *in vitro* de jitomate. In: *Memorias del XIV Congreso Nacional de Citogenética*. UNACH. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 17 p.
- Montero, C. W. y Jiménez, V. M. 2009. Floración *in vitro*. Revisión de literatura. *Biología Vegetal*. 9(1):3-18 p.

End of the English version



- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15:473-497.
- Nadgauda, R. S.; Parasharami, V. A.; and Mascarenhas, A. F. 1990. Precocious flowering and seeding behavior in tissue cultured bamboos. *Nature* 344:335-336.
- Nadhi, S. and De Wet, J.M. 1995. *In vitro* regeneration of *Sorghum bicolor* lines from shoot apices. *Int. Sorghum and Millets Newsletter* 36:88-90.
- Pareddy, D. R. and Petolino, J. F. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. *Plant Sci.* 67:211-219.
- Patil, M.; Ramaswamy, N. M. and Rangasamy, S. R. 1993. *In vitro* flowering in sun flower *H. annuus* L. *Current Sci.* 65:565-569.
- Perilleux, C. and Bernier, G. 1997. Leaf carbohydrate status in *Lolium temulentum* during the induction of flowering. *New Phytologist* 135:59-66.
- Raman, K. D.; Walden, B. and Greyson, R. I. 1980. Propagation of *Zea mays* L. by shoot tip culture: A feasibility study. *Annal Bot.* 45:183-189.
- Roca, W. y Mroginski, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Regeneración de plantas en cultivo de tejidos, embriogénesis somáticas y organogénesis. CIAT. Colombia. 970 p.
- Rohit, J.; Alok, S. and Pramod, K. 2009. *In vitro* flowering hill maize: a novel technique for future. *Indian J. Plant Physiol.* 14(3):299-302.
- Statistical Analysis System (SAS Institute) 2000. SAS/STAT User' Guide. Release 6.03. Cary, N.C USA.
- Scorza R. 1982. *In vitro* flowering. *Horticultural Reviews* 4:106-127.
- Srinivasan, C. and Mullins, M. G. 1978. Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). Formation of inflorescences *in vitro* by isolated tendrils. *Plant Physiol.* 61:127-130.
- Sudarshana, M. S.; Niranjan, M. H. and Girish S. T. 2008. *In vitro* flowering somatic embryogenesis and regeneration in *Boerhaavia diffusa* L. *Global J. Biotechnol. Biochem.* 3(2):83-86.
- Sudhakaran, S. and Sivasankari, V. 2002. *In vitro* flowering response of *Ocimum basilicum* L. *J. Plant Biotech.* 4:181-183.
- Taylor, N. J.; Light, M. E.; and Staden, J. 2005. *In vitro* flowering of *Kniphofia leucocephala*: influence of cytokinins. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 83:327-333.
- Vasil, V.; Lu, C.; and Vasil, I. K. 1985. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Protoplasma* 127:1-8.
- Virupakshi, S.; Manjunatha, B. and Naik, R. 2002. *In vitro* flower induction in callus from a juvenile explant of suarcane, *Saccharum officinarum* L., Var. CoC671. *Current Sci.* 83:1195-1197.
- Wenbin, L. I.; Masilamany, P.; Kasha, and Pauls, P. 2002. Developmental, Tissue culture and genotypic factors affecting plant regeneration from shoot apical meristems of germinated *Zea mays* L., seedlings. *In vitro Cellular and Devevelopmental Biology- Plant.* 38:285-292.
- Williams, M. A. 2004. Hormonal regulation of plant growth and development. *Acta Hort.* 53:36-39.
- Williams, R. R. 1991. Factors determining mineral uptake *in vitro*. *Acta Hort.* 289:165-166.
- Xiong, D. and Yazawa, C. 1995. Floral induction and development in *Phalaenopsis in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 43:71-74.
- Zhong, H.; Srinivasan, C. and Sticklen, M. B. 1992A. *In vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L.). Differentiation of ear and tassel cluster from cultured shoot apices and immature inflorescences. *Planta* 187:483-489.
- Zhong, H.; Srinivasan, C. and Sticklen, M. B. 1992B. *In vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L.). Differentiation of multiple shoots clumps and somatic embryos from shoot tips. *Planta* 187:490-495.