



## MORFOLOGÍA Y RENDIMIENTO DE PLANTAS DE MAÍZ OBTENIDAS MEDIANTE CULTIVO DE EMBRIONES INMADUROS Y POR SEMILLAS

### MORPHOLOGY AND YIELD OF MAIZE PLANTS OBTAINED BY IMMATURE EMBRYO CULTURE AND BY SEEDS

José Manuel Escutia-Ponce<sup>1</sup>, J. Guadalupe García-Rodríguez<sup>1</sup>, Mariano Mendoza-Elos<sup>1</sup>, Salvador Montes-Hernández<sup>2</sup>, Juan Gabriel Ramírez-Pimentel<sup>1</sup>, Marisa Rivera-Arredondo<sup>3</sup>, Francisco Chablé-Moreno<sup>1</sup> y Alfredo Josué Gámez-Vázquez<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Roque, Celaya, Guanajuato, México. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Celaya, Guanajuato, México. <sup>3</sup>Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato, Valle de Santiago, Guanajuato, México.

\*Autor de correspondencia (gamez.josue@inifap.gob.mx)

#### RESUMEN

Tradicionalmente el maíz se propaga por semillas, pero los avances en técnicas como el cultivo *in vitro* de embriones inmaduros han generado interés debido a sus posibles ventajas, como menor tiempo para la obtención de genotipos élite, la reducción de enfermedades transmitidas por semillas y la aceleración de los ciclos de mejoramiento genético. Pocos estudios han evaluado el comportamiento de las plantas derivadas de estos dos métodos de propagación. Esta investigación tuvo como objetivo comparar las características morfológicas y el rendimiento de genotipos de maíz propagados a partir de semillas y de embriones inmaduros, con la finalidad de estimar posibles diferencias entre ambas metodologías. Se realizó un experimento con 14 poblaciones de maíz obtenidas del cruzamiento de las líneas E60-10 y CML-529. Estas poblaciones se obtuvieron tanto por semillas como por embriones inmaduros y se sembraron en un diseño experimental de bloques completos al azar. Las variables evaluadas incluyeron días a floración masculina (DFM) y femenina (DFF), altura de planta (ALP, cm), número de hojas (NTH), índice de área foliar (IAF) y rendimiento de grano (R, kg ha<sup>-1</sup>), entre otras. Los resultados mostraron diferencias significativas en días a floración, producción de biomasa y rendimiento entre las plantas propagadas por semillas y aquellas derivadas de embriones inmaduros. Las poblaciones P<sub>2</sub>, P<sub>1</sub> y RC<sub>2</sub>, obtenidas por embriones inmaduros, incrementaron en 23.9, 8.0 y 7.4 % su IAF, respectivamente, además de presentar incrementos en el rendimiento de 44.5, 4.8 y 16.5 %, respectivamente. Este estudio aporta información que sugiere que las plantas obtenidas a partir del cultivo de embriones inmaduros de maíz no igualaron la respuesta obtenida de aquellas provenientes de semillas generadas a través de polinizaciones manuales.

**Palabras clave:** *Zea mays*, propagación *in vitro*, polinización manual.

#### SUMMARY

Maize is traditionally propagated by seed, but advances in techniques such as *in vitro* culture of immature embryos have generated interest due to their potential advantages, including shorter time to obtain elite genotypes, reduction of seed-borne diseases, and acceleration of breeding cycles. Few studies have evaluated the performance of plants derived from these two propagation methods. This research aimed to compare the morphological characteristics and yield of maize genotypes propagated from seeds and from immature embryos in order to estimate possible differences between the two methodologies. An experiment was conducted with 14 maize populations obtained from the crossing of lines E60-10 and CML-529. These populations

were obtained from both seeds and immature embryos and were planted in a randomized complete block experimental design. The variables evaluated included days to male flowering (DMF) and female flowering (DFF), plant height (PH, cm), number of leaves (NL), leaf area index (LAI) and grain yield (GY, kg ha<sup>-1</sup>), among others. Results showed significant differences in days to flowering, biomass production and yield when comparing plants propagated from seeds to those derived from immature embryos. Populations P<sub>2</sub>, P<sub>1</sub> and RC<sub>2</sub>, obtained from immature embryos, increased their LAI by 23.9, 8.0 and 7.4 %, respectively, in addition to presenting increases in yield of 44.5, 4.8 and 16.5 %, respectively. This study provides information that suggests that maize plants obtained from immature embryo culture did not match the response obtained from seeds generated through hand pollination.

**Index words:** *Zea mays*, hand pollination, *in vitro* propagation.

#### INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente el maíz se ha propagado a través de semilla debido a su simplicidad, confiabilidad, bajo costo y adopción generalizada (Sheoran *et al.*, 2022). Este método también representa una fuente de suministro confiable y disponibilidad constante de material de calidad (Ye *et al.*, 2022); sin embargo, la biotecnología ha dado lugar a técnicas de propagación alternativas, como el cultivo *in vitro* de embriones inmaduros (Liotino *et al.*, 2019), el cual consiste en utilizar medios de cultivo apropiados para reemplazar las funciones del endospermo, permitiendo que éste continúe su crecimiento fuera de la semilla (Akmal, 2021). Esta técnica ofrece la rápida multiplicación de genotipos élite, permite obviar las etapas R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> en maíz, lo que posibilita obtener 2.7 generaciones por año (Liotino *et al.*, 2019), eliminar las semillas enfermas en fases tempranas del desarrollo y detectar enfermedades transmitidas por las semillas a través de la prueba de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) (Kausch *et al.*, 2021); asimismo, esta técnica hace posible la formación de callo embriogénico con el cual mediante el bombardeo de micropartículas o la infección por *Agrobacterium* se podrían mejorar los caracteres deseados; además,

puede reducir el tiempo de los ciclos en los programas de mejoramiento genético convencional (Liotino *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2023).

Las plantas de maíz y otras especies regeneradas a partir del cultivo de embriones inmaduros pueden presentar cambios en el genotipo y fenotipo, atribuidos principalmente a modificaciones epigenéticas, inducidas por las condiciones a las que se exponen durante la regeneración *in vitro*, como la acumulación de CO<sub>2</sub> y etileno, que provocan la metilación del ADN (Kumar y Van Staden, 2017). Se han reportado variaciones en las plantas de maíz regeneradas a partir de embriones inmaduros, ya sea en su tamaño (Chablé-Moreno *et al.*, 2017; Liotino *et al.*, 2019), estructura, o en el desarrollo del sistema radicular (McFarland y Kaeppler, 2024).

Es esencial evaluar las características morfológicas y el potencial de rendimiento de las plantas de maíz derivadas de embriones inmaduros respecto a las propagadas a partir de semillas; por lo anterior, y con base en la falta de información, el presente estudio tuvo como objetivo realizar un análisis morfológico y del rendimiento de diferentes progenitores de maíz empleados en el mejoramiento genético, provenientes de cultivo *in vitro* de embriones inmaduros y de semillas. Con la comparación del desempeño de las plantas obtenidas por estos dos métodos de propagación se busca identificar las diferencias en los rasgos morfológicos de éstas, en su rendimiento y sus componentes, así como evaluar el potencial de las plantas derivadas de embriones inmaduros para su uso en programas de mejoramiento de maíz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y ubicación experimental

El material experimental consistió en dos grupos de siete poblaciones originadas a partir del cruzamiento entre las líneas E60-10 (P<sub>1</sub>) y CML-529 (P<sub>2</sub>). El primer grupo se obtuvo mediante el método convencional de propagación de semillas (P<sub>1-sem</sub>, P<sub>2-sem</sub>, F<sub>1-1-sem</sub>, F<sub>1-2-sem</sub>, F<sub>2-sem</sub>, RC<sub>1-sem</sub> y RC<sub>2-sem</sub>); el segundo grupo se generó a partir de un ciclo de cultivo *in vitro* de embriones inmaduros tomados a partir de mazorcas resultantes de polinizaciones manuales realizadas en cada población, durante el mismo ciclo de producción (P<sub>1-emb</sub>, P<sub>2-emb</sub>, F<sub>1-1-emb</sub>, F<sub>1-2-emb</sub>, F<sub>2-emb</sub>, RC<sub>1-emb</sub> y RC<sub>2-emb</sub>). El estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato (UTSOE), ubicada en Valle de Santiago, Guanajuato, México en las coordenadas 20° 23' 54.13" N y -101° 13' 2 1.49" W.

### Rescate de embriones inmaduros

El experimento *in vitro* se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica de Semillas de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Roque (ITR) en Celaya, Guanajuato, México, con ubicación geográfica 20° 34' 51.7" N y 100° 49' 40.2" W. Durante el ciclo de producción del año 2023 se obtuvieron 60 embriones inmaduros a los 20 días después de la polinización (DDP), provenientes de dos plantas por cada genotipo. Los embriones inmaduros fueron colocados en un medio de cultivo que contenía las sales basales de Murashige y Skoog (1962) al 100 % de su concentración, al que se agregó 3 % de sacarosa, 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-acético (AIA), 0.5 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0.6 % de agar (Bioxon®); el pH se ajustó a 5.6 ± 0.01. La preparación del medio de cultivo, el proceso de extracción y la incubación de los embriones se realizaron de acuerdo con Chablé-Moreno *et al.* (2017). Los embriones permanecieron en dicho medio hasta que la plúmula alcanzó 7 cm y la radícula 4 cm. La obtención de plantas completas a partir de embriones inmaduros involucró tres etapas críticas: germinación del 90 % en medio de cultivo, aclimatación del 60 % de las plantas en sustrato, y su establecimiento en campo (80 % del total de plantas). De las plantas sobrevivientes, se recolectaron 4 a 5 mazorcas por genotipo para formar los lotes de semilla.

### Establecimiento y manejo agronómico

En 2024, las semillas de las siete poblaciones de las dos familias fueron sembradas bajo un diseño de bloques completos al azar con dos repeticiones de cada población. Cada unidad experimental estuvo conformada por cuatro surcos de 0.75 m de ancho y cinco m de longitud, con una densidad de población de 66,600 plantas ha<sup>-1</sup>. Durante el ciclo del cultivo, las temperaturas promedio máximas y mínimas fueron de 29.3 y 10.8 °C, respectivamente, con una precipitación acumulada de 97.4 mm (FGP, 2024). Para el manejo agronómico del ensayo, los riegos se dieron por 3 h cada tercer día, con cintilla de riego RO DRIP 8 mil (Rivulis Irrigation Inc., San Diego, California, EUA) de 0.2 mm de espesor y 16 mm de diámetro, con emisores a 0.2 m y un caudal de 0.5 L h<sup>-1</sup> por emisor. El cultivo se fertilizó con una formulación 240-40-00, la mitad del nitrógeno y todo el fósforo se aplicó en la siembra y el resto del nitrógeno en la etapa de antesis (Chablé-Moreno *et al.*, 2017).

### Variables de respuesta

Las variables de respuesta fueron los días a floración femenina (DFF, días) y días a floración masculina (DFM, días), altura de planta (ALP, cm) medida desde la base de la planta hasta la punta de la espiga, el número total de

hojas (NTH), largo (LH, cm) y ancho de la hoja (AH, cm) y el índice de área foliar (IAF, cm<sup>2</sup>) al inicio de la floración, de acuerdo con Tinoco *et al.* (2008); cada variable se evaluó en 10 plantas con competencia completa. En la madurez fisiológica, con un radio de 30 cm alrededor del tallo, se extrajeron del suelo cinco plantas por repetición; después de enjuagar las raíces, las plantas se seccionaron en raíces (MS Raíz), tallos (MS Tallo), hojas (MS Hoja), espiga (MS Espiga), grano (MS Grano), Brácteas (MS Brácteas) y olote (MS Olote); las muestras obtenidas se secaron en un horno a 70 °C, durante 72 h, hasta un peso constante y luego se determinó la materia seca de la planta (MS Total, g por planta) de acuerdo con Huang *et al.* (2017). Para evaluar el rendimiento de grano (R, kg ha<sup>-1</sup>) se cosecharon los surcos centrales de cada población, y éste se ajustó con base en las plantas faltantes. Con estos datos, el rendimiento de grano ajustado al 14 % de humedad se calculó de acuerdo con lo descrito por García *et al.* (2020).

#### Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza, contrastes ortogonales para comparar cada genotipo de acuerdo con su origen (semilla vs. embriones inmaduros).

Se realizó análisis de componentes principales (Swapnil *et al.*, 2021) a partir de la matriz de correlaciones. Los análisis se llevaron a cabo con el software SAS versión 9.4.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Análisis de varianza

El análisis de varianza (Cuadros 1 y 2) mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ ) entre las poblaciones de maíz en las variables DFM, DFF, NTH, LH, IAF, MS Espiga, MS Tallo, MS Hoja, MS Raíz, MS Mazorca, MS Bráctea, MS Grano, MS Total y R. No se observaron diferencias significativas en las variables AH y ALP. Los coeficientes de variación (CV) reflejaron confianza en la ejecución del experimento (Rodríguez *et al.*, 2020), ya que fueron menores de 10 % en todas las variables, excepto en MS Raíz y MS Bráctea, que oscilaron entre 10 y 20 %.

#### Contrastes ortogonales

El análisis de contrastes ortogonales (Cuadro 3) mostró que las poblaciones  $P_{2-sem}$ ,  $F_{1-1-sem}$  y  $RC_{2-sem}$  provenientes de semilla, fueron más precoces ( $p \leq 0.01$ ) para DFM y DFF

**Cuadro 1. Cuadros medios del análisis de varianza para las variables morfológicas evaluadas en 14 poblaciones de maíz provenientes de semillas y de embriones inmaduros.**

| Fuentes de variación | GL | Días a floración |           | Hojas   |          |       | ALP    | IAF          |
|----------------------|----|------------------|-----------|---------|----------|-------|--------|--------------|
|                      |    | Masculina        | Femenina  | Número  | Largo    | Ancho |        |              |
| Bloques              | 1  | 14.29            | 26.04     | 1.29    | 0.72     | 0.002 | 205.7  | 269,965      |
| Generación           | 13 | 1140.43**        | 1162.61** | 38.62** | 828.4 ** | 7.35  | 2230.4 | 22,334,406** |
| Error                | 13 | 61.71            | 13.46     | 2.62    | 110.16   | 8.15  | 1648.9 | 3,037,546    |
| Total                | 27 | 1216.43          | 1324.46   | 42.53   | 939.31   | 15.51 | 4085.1 | 25,641,919   |
| CV (%)               |    | 2.8              | 4.1       | 3.7     | 3.9      | 9.7   | 6.2    | 9.6          |

\*, \*\*: significativo con  $P \leq 0.05$  y  $0.01$ , respectivamente, GL: grados de libertad, IAF: índice de área foliar, ALP: altura de planta, CV: coeficiente de variación.

**Cuadro 2. Cuadros medios del análisis de varianza para las variables materia seca y rendimiento de grano evaluadas en 14 poblaciones de maíz provenientes de semillas y de embriones inmaduros.**

| Fuentes de variación | GL | Materia seca |          |          |        |         |           |           |          | R         |
|----------------------|----|--------------|----------|----------|--------|---------|-----------|-----------|----------|-----------|
|                      |    | Espiga       | Tallo    | Hoja     | Raíz   | Bráctea | Mazorca   | Grano     | Total    |           |
| Bloque               | 1  | 0.01         | 5.14     | 16.26    | 13.3   | 5.7     | 13.4      | 2.5       | 16.2     | 58.1      |
| Generación           | 13 | 33.97**      | 8956.4** | 3457.6** | 906.6* | 1389.8* | 35225.8** | 29817.4** | 102046** | 97815.9** |
| Error                | 13 | 1.14         | 189      | 239.98   | 159.2  | 248.2   | 1323.4    | 1310.6    | 6171     | 2544.1    |
| Total                | 27 | 35.13        | 9150.6   | 3713.8   | 1079.2 | 1643.7  | 36562.6   | 31130.5   | 108234   | 100418.2  |
| CV (%)               |    | 8.52         | 6.97     | 7.85     | 14.3   | 16.3    | 6.8       | 8.36      | 6.9      | 6.0       |

\*, \*\*: significativo con  $P \leq 0.05$  y  $0.01$ , respectivamente, GL: grados de libertad, R: rendimiento de grano y CV: Coeficiente de variación.

en comparación con sus contrapartes, que fueron más tardías. Por lo anterior, las poblaciones obtenidas a partir de embriones inmaduros retrasaron la liberación de polen entre 2 ( $RC_{1-sem}$ ) y 13 días ( $F_{1-1-sem}$  y  $RC_{2-sem}$ ). En cuanto a la aparición de los estigmas, las poblaciones provenientes de semilla iniciaron entre 3.5 ( $RC_{1-sem}$ ) y hasta 13.5 y 15.5 días ( $RC_{2-sem}$  y  $P_{2-sem}$  respectivamente), antes que las derivadas de embriones inmaduros. La precocidad en la planta de maíz se estima mediante los días desde la siembra hasta la liberación del polen y la aparición de los estigmas en la planta, y se relaciona con una eficiencia fotosintética alta, adecuada distribución de asimilados, menor altura de planta, alto índice de cosecha y menor rendimiento, en comparación con los cultivares tardíos (Hernández-Trejo *et al.*, 2023).

Las diferencias en LH no fueron significativas, lo que también sucedió en el IAF en todas las poblaciones evaluadas. Es importante destacar que las poblaciones mostraron respuestas variables en la producción de follaje, mientras que  $P_{1-sem}$ ,  $P_{2-sem}$  y  $RC_{2-sem}$  presentaron menores IAF, los genotipos  $F_{1-1-sem}$ ,  $F_{1-2-sem}$ ,  $F_{2-sem}$  y  $RC_{1-sem}$  mostraron mayores valores, esto en comparación con sus homólogos obtenidos a partir de embriones inmaduros. Al tomar como referencia inicial el IAF de las poblaciones provenientes de semilla, se observó que las poblaciones provenientes de embriones inmaduros  $P_{2-emb}$ ,  $P_{1-emb}$  y  $RC_{2-emb}$  experimentaron un incremento en el IAF de 23.9, 8.0 y 7.4 %, respectivamente. Por otro lado, las poblaciones  $RC_{1-emb}$ ,  $F_{1-1-emb}$ ,  $F_{1-2-emb}$  y  $F_{2-emb}$  disminuyeron su IAF en 22.7, 16.7, 15.3 y 12.7 %, respectivamente (Cuadro3). El

incremento o disminución del IAF fue relevante debido a que las hojas son los principales órganos fotosintéticos de los cultivos, responsables de generar el 95 % de la materia seca cosechada (Li *et al.*, 2022).,Generalmente la mayor acumulación de materia seca resulta en mayor rendimiento de grano (Liu *et al.*, 2017), por lo que el IAF es una variable importante para estimar la productividad de los cultivos, ya que está correlacionada positivamente con el rendimiento (Szabó *et al.*, 2022).

En cuanto a la MS, se observaron diferencias significativas en la mayoría de los órganos de la planta (Cuadros 3 y 4), con excepción de la MS Olate. Las poblaciones  $F_{1-1-sem}$  y  $F_{2-sem}$  obtenidas por semilla, mostraron una disminución significativa en MS Espiga, con pérdidas de 2.0 y 1.2 g, respectivamente, mientras que en el resto de los genotipos no se encontraron diferencias significativas. Por otro lado, las poblaciones  $P_{1-sem}$  y  $P_{2-sem}$  mostraron valores significativamente menores en MS Tallo (40 y 17.7 g por planta, respectivamente), mientras que los genotipos  $F_{1-1-sem}$  y  $F_{2-sem}$  disminuyeron significativamente su peso en el mismo órgano (20 y 24.7 g por planta, respectivamente). Solo dos poblaciones presentaron efectos significativos, en MS Hoja:  $P_{1-sem}$  perdió 23 g por planta, mientras que  $F_{1-1-sem}$  elevó su peso en 20 g por planta.

La población  $P_{1-sem}$  proveniente de semilla (Cuadro 4) presentó menor MS de Raíz ( $P \leq 0.01$ ) en comparación con su homólogo proveniente de embriones inmaduros. En la MS Mazorca se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en los genotipos  $P_{2-sem}$ ,  $F_{1-1-sem}$ ,  $RC_{1-sem}$  y  $P_{2-sem}$

**Cuadro 3. Contrastes ortogonales para variables vegetativas de siete genotipos de maíz comparados con base en su origen (semilla vs. embriones inmaduros).**

| Contrastes |           | DFM<br>(días) |       | DFF<br>(días) |       | LH<br>(cm) |       | IAF<br>(cm <sup>2</sup> ) |         | MS Espiga<br>(g/planta) |       | MS Tallo<br>(g/planta) |        | MS Hoja<br>(g/planta) |       |
|------------|-----------|---------------|-------|---------------|-------|------------|-------|---------------------------|---------|-------------------------|-------|------------------------|--------|-----------------------|-------|
| Semilla    | Embrión   | Diferencia    | SC    | Diferencia    | SC    | Diferencia | SC    | Diferencia                | SC      | Diferencia              | SC    | Diferencia             | SC     | Diferencia            | SC    |
| $P_1$      | $P_1$     | -4            | 16    | -4.5          | 20    | -6         | 40    | -509                      | 259517  | -0.9                    | 0.8   | -40                    | 1600** | -23                   | 544** |
| $P_2$      | $P_2$     | -12           | 144** | -15.5         | 240** | -10        | 105   | -1109                     | 1230306 | -0.7                    | 0.4   | -18                    | 312*   | -12                   | 144   |
| $F_{1-1}$  | $F_{1-1}$ | -13           | 169** | -9.5          | 90    | 7          | 44    | 904                       | 816491  | 2                       | 4**   | 20                     | 400*   | 20                    | 400*  |
| $F_{1-2}$  | $F_{1-2}$ | -6.5          | 42    | -9.5          | 90    | 9          | 79    | 1066                      | 1136748 | -0.05                   | 0.002 | -11                    | 132    | 2                     | 6     |
| $F_2$      | $F_2$     | -7.5          | 56    | -9.5          | 90    | 2          | 6     | 454                       | 206628  | 1.2                     | 1.4*  | 25                     | 608**  | 11                    | 114   |
| $RC_1$     | $RC_1$    | -2            | 4     | -3.5          | 12    | -3         | 10    | 870                       | 756769  | 0.8                     | 0.15  | 15                     | 235    | 15                    | 230   |
| $RC_2$     | $RC_2$    | -13           | 169** | -13.5         | 182** | -8         | 70.56 | -376                      | 141229  | -0.2                    | 0.06  | 4                      | 15     | -6                    | 40    |

\*, \*\*: significativo con  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ , respectivamente, DFM: días a floración masculina, DFF: días a floración femenina, NTH: número total de hojas, LH: largo de la hoja, AH: ancho de la hoja, IAF: índice de área foliar, SC: suma de cuadrados y MS: materia seca.

con un valor promedio menor (60.5 g/planta), mientras que en  $F_{1-1-sem}$  y  $RC_{1-sem}$  se observó un aumento de 98 y 43.7 g/planta, respectivamente. Entre las poblaciones sin diferencias significativas,  $F_{1-2-sem}$  y  $RC_{2-sem}$  presentaron tendencia a elevar la MS Mazorca en 25.7 y 25.5 g/planta, respectivamente. En lo que respecta a la MS Grano, sólo las poblaciones  $P_{2-sem}$  y  $F_{1-1-sem}$  presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a sus homólogas,  $P_{2-sem}$  obtenida por semilla redujo su valor en 50 g/planta, en contraste con su homóloga proveniente de embriones inmaduros; en tanto que  $F_{1-1-sem}$  la elevó en 83 g/planta. Cabe mencionar que la generación  $F_{2-sem}$ , proveniente de semilla mostró un incremento de 40 g/planta, aunque no fue significativo con respecto a su similar de embriones inmaduros (40.5 g/planta). En la MS Total, únicamente  $P_{2-sem}$  y  $F_{1-1-sem}$  presentaron un aumento y disminución significativos, respectivamente.  $P_{2-sem}$  mostró una reducción de 120.5 g/planta y  $F_{1-1-sem}$  un incremento de 158.3 g/planta.

Finalmente, la mayoría de las poblaciones homólogas mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) importantes entre sí en el rendimiento ( $P \leq 0.05$ );  $P_{2-sem}$  lo redujo en 2698 kg ha<sup>-1</sup> y  $F_{1-2-sem}$  lo incrementó en 2182 kg ha<sup>-1</sup>, mientras que  $F_{1-1-sem}$  y  $RC_{1-sem}$  elevaron su rendimiento en 1699 y 2048 kg ha<sup>-1</sup> con respecto a las poblaciones provenientes de embriones inmaduros. Las poblaciones que no presentaron diferencias estadísticas fueron  $P_1$ ,  $F_2$  y  $RC_2$ , cuyos rendimientos resultaron estadísticamente iguales para las obtenidas por semilla o por embriones inmaduros.

**Análisis de componentes principales (ACP)**

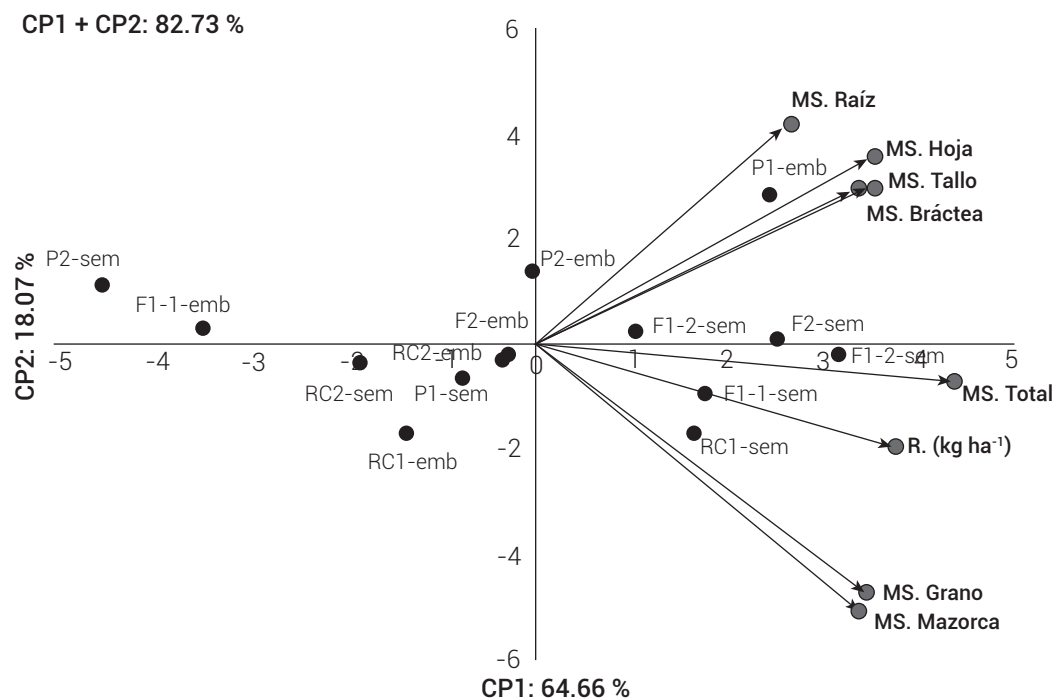
El ACP reveló que los tres primeros componentes explicaron más del 91 % de la variación en el conjunto de datos. El CP1 aportó 65 % de la variabilidad total, mientras que el CP2 explicó el 18 %; esto indica que estos tres componentes abarcaron la mayor parte de la variabilidad relacionada con el origen de las poblaciones de maíz y sus 16 características morfológicas evaluadas. En el plano cartesiano (Figura 1), se observa que las variables evaluadas presentaron tres patrones de respuesta, el primero se dio entre MS Raíz, MS Hoja y MS Tallo; es decir, que estuvieron correlacionadas positivamente y caracterizaron a la población  $P_{1-emb}$  que presentó los valores más altos. El segundo patrón de respuesta se observó entre el rendimiento de grano y la MS Total, que también correlacionaron positivamente y caracterizaron la respuesta de las poblaciones  $F_{1-2-emb}$ ,  $F_{2-sem}$  y  $F_{1-1-sem}$ , además de darle soporte al hecho relativo de que el rendimiento depende de una gran cantidad de genes que controlan los componentes del rendimiento del grano. El rendimiento de grano es un carácter cuantitativo que se expresa estrechamente con otros rasgos como la acumulación de MS (Pradhan *et al.*, 2022). En el presente estudio, las variables más relacionadas con el rendimiento correspondieron a la MS Total, como resultado de la mayor acumulación de materia seca en el grano, mazorca, tallo y hojas de la planta.

El tercer patrón de respuesta entre las variables estudiadas se obtuvo en la MS de grano y mazorca

**Cuadro 4. Contrastes ortogonales para materia seca de diferentes órganos y rendimiento de siete genotipos de maíz comparados con base en su origen (semilla vs. embriones inmaduros).**

| Contrastes |          | MS Raíz (g/planta) |       | MS Mazorca (g/planta) |        | MS Olote (g/planta) |      | MS Grano (g/planta) |        | MS Total (g/planta) |         | R (kg ha <sup>-1</sup> ) |           |
|------------|----------|--------------------|-------|-----------------------|--------|---------------------|------|---------------------|--------|---------------------|---------|--------------------------|-----------|
| Semilla    | Embrión  | Diferencia         | SC    | Diferencia            | SC     | Diferencia          | SC   | Diferencia          | SC     | Diferencia          | SC      | Diferencia               | SC        |
| $P_1$      | P1       | -20                | 413** | 16                    | 245    | -9.8                | 97   | 16                  | 251    | -79                 | 6276    | -414                     | 171.4     |
| $P_2$      | P2       | -12                | 136   | -60                   | 3660** | 1.7                 | 2.7  | -50                 | 2550*  | -120                | 14520** | -2698                    | 7279.9**  |
| $F_{1-1}$  | F1-1     | 2                  | 5.4   | 98                    | 9604** | 6.7                 | 44.4 | 83                  | 6889** | 158                 | 25068** | 1699                     | 4683.5**  |
| $F_{1-2}$  | vs. F1-2 | 2                  | 2.7   | -26                   | 659    | -10                 | 103  | -16                 | 251    | -47                 | 2182    | -3532                    | 12478.3** |
| $F_2$      | F2       | 7                  | 44    | 26                    | 693    | -14                 | 187  | 40                  | 1600   | 76                  | 5753    | 1189                     | 1414.6    |
| $RC_1$     | RC1      | 5                  | 30    | 44                    | 1907*  | 12                  | 148  | 30                  | 890    | 86                  | 7459    | 2048                     | 4195.8*   |
| $RC_2$     | RC2      | -8                 | 61    | -25                   | 650    | -11                 | 121  | -15                 | 230    | -39                 | 1513    | -1145                    | 1311.8    |

\*, \*\* Significativo con  $P \leq 0.05$  y  $0.01$  respectivamente, SC: suma de cuadrados, MS: materia seca, RC: retrocruza, R: rendimiento de grano.



**Figura 1. Biplot para la distribución de 14 poblaciones de maíz con base en los dos primeros componentes principales (CP). Los mayores coeficientes de autovectores en CP1: MS Total y Rendimiento; en CP2: MS Grano y MS Raíz.**

correlacionadas positivamente entre sí y que sobresalieron en la población  $RC_{1-sem}$  y  $F_{1-sem}$ , por lo que posiblemente ambas fueron las que mayor translocación de fotosintatos destinaron a la mazorca y grano, previa distribución a la raíz, hojas, tallo y brácteas. Estas ocho variables (MS Total, R, MS Tallo, MS Hojas, MS Grano, MS Mazorca, MS Brácteas y MS Raíz) fueron las que presentaron los valores más altos y las que tuvieron el mayor impacto en la agrupación de las poblaciones. Resultados similares fueron reportados por Swapnil *et al.* (2021), quienes encontraron una contribución negativa del peso de grano (-0.449) en el CP2 al analizar 32 genotipos de maíz utilizando 10 variables de respuesta. Por otro lado, Pradhan *et al.* (2022) observaron dentro del CP1 una contribución positiva (0.902) del peso de grano por planta al evaluar 33 genotipos de maíz con 11 variables de respuesta.

Una puntuación alta en un componente principal para un genotipo específico indica que dicho genotipo tiene valores elevados en las variables asociadas con ese componente (Swapnil *et al.*, 2021). Las siguientes poblaciones de maíz presentaron los valores positivos más altos para el CP1,  $F_{1-2-sem}$  (1.146),  $F_{2-sem}$  (2.518),  $P_{1-emb}$  (2.429),  $F_{1-1-sem}$  (1.747),  $RC_{1-sem}$  (1.648) y  $F_{1-2-sem}$  (1.04), por lo que dichas poblaciones presentaron valores superiores a las medias correspondientes a la acumulación de materia seca en la raíz, bráctea, mazorca, grano, tallo, hoja, materia seca total y el rendimiento de grano por hectárea. Por el contrario, los

valores más altos pero negativos se presentaron en los genotipos  $P_{2-sem}$  (-4.511),  $F_{1-1-emb}$  (-3.464),  $RC_{2-sem}$  (-1.828) y  $RC_{1-emb}$  (-1.329), lo que coincide con el hecho de que estas poblaciones fueron las que presentaron valores menores a la media de materia seca en raíz, bráctea, mazorca, grano, tallo, hoja, materia seca total y rendimiento de grano por hectárea. En el mismo contexto, para el CP2, los valores positivos más elevados se presentaron en los genotipos  $P_{1-emb}$  (2.868),  $P_{2-emb}$  (1.373) y  $P_{2-sem}$  (1.116), mientras que los valores negativos más elevados fueron para  $RC_{1-emb}$  (-1.693),  $RC_{1-sem}$  (-1.681) y  $F_{1-1-sem}$  (-0.933). El CP2 se caracterizó principalmente por la contribución positiva de las variables MS Raíz y MS Hoja, y la contribución negativa de las variables MS Mazorca y MS Grano, por lo que las poblaciones  $P_{1-emb}$ ,  $P_{2-emb}$  y  $P_{2-sem}$  presentaron valores más altos que la media de materia seca en la raíz y en la hoja de la planta, pero valores por debajo de la media de materia seca en la mazorca y el grano; una respuesta opuesta ocurrió en los genotipos  $RC_{1-emb}$ ,  $RC_{1-sem}$  y  $F_{1-1-sem}$ .

Con base en los resultados obtenidos, se considera necesario perfeccionar la metodología para el cultivo de embriones inmaduros con la finalidad de elevar el porcentaje de plantas sobrevivientes para evitar deriva genética, así como reducir el efecto de los reguladores del crecimiento con el fin de prevenir la sobre expresión fenotípica y con ello reducir las diferencias en su comportamiento con respecto a las generadas a partir de

polinizaciones manuales.

Al comparar cada generación de acuerdo con su origen, se observó que la generación  $P_{1-emb}$  presentó contribuciones positivas altas en los componentes CP1 y CP2, mientras que su homólogo  $P_{1-sem}$  presentó contribuciones negativas en ambos componentes, lo que significa que la generación  $P_1$ , producto de la metodología de embriones inmaduros incrementó la materia seca del tallo, hoja, raíz, bráctea, materia seca total y el rendimiento de grano por hectárea. Similar comportamiento se observó en las poblaciones  $P_{2-emb}$  y  $RC_{2-emb'}$  para las cuales también un ciclo de embriones inmaduros elevó los valores de las ocho variables contenidas en el plano cartesiano, en contraste con sus contrapartes provenientes de semilla, ello con base en el tamaño del vector de cada población con respecto al origen. Del mismo modo,  $F_{1-2-sem}$  al someterse a un ciclo de embriones inmaduros, aumentó los valores para todas las variables, excepto para materia seca de la hoja y de raíz de la planta. Las poblaciones  $F_{1-1-emb'}$ ,  $F_{2-emb}$  y  $RC_{1-emb'}$  obtenidas a través de embriones inmaduros, redujeron sus valores para estas ocho variables con respecto a aquellas generadas a través de semilla producto de polinizaciones manuales.

Los resultados de este estudio muestran diferencias fenotípicas relevantes entre las plantas de maíz derivadas del cultivo de embriones inmaduros y aquellas provenientes de semilla. Estas diferencias podrían deberse a la deriva genética, a las condiciones físicas y químicas artificiales durante el cultivo *in vitro*, entre las que se encuentra la aplicación de reguladores de crecimiento que pueden inducir cambios en las células vegetales (Kumar y Van Staden 2017; Han *et al.*, 2018), así como el crecimiento de las plantas en el invernadero, que en conjunto pueden afectar el número, tamaño y peso de los órganos como raíces, hojas, tallos, espigas, brácteas, mazorcas, granos, los días a floración y el rendimiento, como lo han observado otros autores (McFarland y Kaeppler, 2004; Chablé-Moreno *et al.*, 2017).

## CONCLUSIONES

El presente estudio reveló diferencias significativas entre las poblaciones de maíz homólogas provenientes de semillas y de embriones inmaduros en términos de días a floración, biomasa y rendimiento. Los genotipos provenientes de embriones inmaduros tienden a ser más tardíos en su floración masculina y femenina que las poblaciones obtenidas por semilla. Las diferencias en el índice de área foliar y la producción de biomasa fueron inconsistentes, ya que algunos genotipos mostraron incrementos y otros decrementos. Las variables de mayor impacto en las diferencias entre poblaciones fueron la

materia seca total, la biomasa en mazorca, grano y el rendimiento de grano. Las plantas de algunas de las poblaciones estudiadas, obtenidas mediante cultivo de embriones inmaduros, elevaron significativamente el rendimiento y la biomasa. Las plantas de maíz obtenidas a través del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros mostraron un fenotipo significativamente diferente con respecto al de las generadas mediante semillas, producto de polinizaciones manuales.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato (UTSOE) y al Instituto Tecnológico de Roque, por las facilidades brindadas para el establecimiento y manejo del experimento; al Ing. Josué Alegría Lesso, a los estudiantes Ximena Galilea Vera Ruiz y Alejandro Miranda Rivera de la UTSOE, al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT, ahora SECIHTI).

## BIBLIOGRAFÍA

- Akmal M. (2021) Embryo culture and embryo rescue in Brassica. In: Brassica Breeding and Biotechnology. A. K. M. A. Islam, M. A. Hossain and A. K. M. M. Islam (eds.). IntechOpen. London, UK. pp:1-14, <https://doi.org/10.5772/intechopen.96058>
- Chablé-Moreno F., D. Huerta-Santoyo, J. C. Raya-Pérez, J. G. Ramírez-Pimentel, C. L. Aguirre-Mancilla, A. A. Estrada-Luna y J. Covarrubias-Prieto (2017) Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de cruza interpopulacionales de maíz  $S_2$  con el empleo de BAP y AIA. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 5:1-11.
- FGP, Fundación Guanajuato Produce (2024) Red de estaciones agroclimáticas: datos históricos. Guanajuato, Celaya, Guanajuato, México. <https://www.estaciones.fundacionguanajuato.mx/alltxt/> (Agosto 2024).
- García M. V. M., J. Chura C. and J. Torres (2020) Combining ability and heterosis for yield, precocity and height in yellow maize genotypes. *Revista de la Facultad de Agronomía* 37:410-429, [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v37.n4.05](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v37.n4.05)
- Han Z., P. A. Crisp, S. Stelpflug, S. M. Kaeppler, Q. Li and N. M. Springer (2018) Heritable epigenomic changes to the maize methylome resulting from tissue culture. *Genetics* 209:983-995, <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300987>
- Hernández-Trejo A., J. A. López-Santillán, B. Estrada-Drouillet, Z. Reséndiz-Ramírez, J. M. Coronado-Blanco y R. A. Malvar (2023) Aptitud combinatoria y efectos recíprocos de la precocidad en poblaciones nativas de maíz de Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 14:171-183, <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i2.2990>
- Huang S., Y. Gao, Y. Li, L. Xu, H. Tao and P. Wang (2017) Influence of plant architecture on maize physiology and yield in the Heilongjiang River valley. *The Crop Journal* 5:52-62, <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.06.018>
- Kausch A. P., K. Wang, H. F. Kaeppler and W. Gordon-Kamm (2021) Maize transformation: history, progress, and perspectives. *Molecular Breeding* 41:38, <https://doi.org/10.1007/s11032-021-01225-0>
- Kumar V. and J. Van Staden (2017) New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. *Acta Physiologiae Plantarum* 39:194, <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2487-5>
- Li Y., B. Ming, P. Fan, Y. Liu, K. Wang, P. Hou, ... and R. Xie (2022) Quantifying contributions of leaf area and longevity to leaf area duration under increased planting density and nitrogen input regimens during maize yield improvement. *Field Crops Research* 283:108551, <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108551>
- Liotino M., A. Varangot, A. Y. Bezec, M. Auteri, A. E. Bossio, D. M. Lewi and

- P. D. Faccio (2019) Shortening of generation cycles in inbred lines of maize (*Zea mays* L.) through embryo rescue technique. *Maydica* 64:1-6.
- Liu G., P. Hou, R. Xie, B. Ming, K. Wang, W. Xu, ... and S. Li (2017) Canopy characteristics of high-yield maize with yield potential of 22.5 Mg ha<sup>-1</sup>. *Field Crops Research* 213:221-230, <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.08.011>
- McFarland F. L. and H. F. Kaeppler (2024) History and current status of embryogenic culture-based tissue culture, transformation and gene editing of maize (*Zea mays* L.). *The Plant Genome* 18:e20451, <https://doi.org/10.1002/tpg2.20451>
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pradhan P., B. Thapa, A. Ghosh, V. Subba and S. Kundagrami (2022) Trait association and principal component analysis in maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Environment and Ecology* 40:2527-2531.
- Rodríguez P. G., J. E. Treviño R., M. C. Ojeda Z., F. Cervantes O., M. A. Avila P. y A. J. Gámez V. (2020) Parámetros genéticos y aptitud combinatoria de líneas de maíz para grano. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* 11:1867-1878, <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i8.2085>
- Sheoran S., Y. Kaur, S. Kumar, S. Shukla, S. Rakshit and R. Kumar (2022) Recent advances for drought stress tolerance in maize (*Zea mays* L.): present status and future prospects. *Frontiers in Plant Science* 13:872566, <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.872566>
- Swapnil, R. Jaishreepriyanka, D. Singh and S. S. Mandal (2021) Principal component analysis in maize (*Zea mays* L.). *The Pharma Innovation Journal* 10:641-644.
- Szabó A., S. M. N. Mousavi, C. Bojtor, P. Ragán, J. Nagy, A. Vad and Á. Illés (2022) Analysis of nutrient-specific response of maize hybrids in relation to leaf area index (LAI) and remote sensing. *Plants* 11:1197, <https://doi.org/10.3390/plants11091197>
- Tinoco A. C. A., A. Ramírez F., E. Villarreal F. y A. Ruiz C. (2008) Arreglo espacial de híbridos de maíz, índice de área foliar y rendimiento. *Agricultura Técnica en México* 34:271-278.
- Ye X., A. Shrawat, E. Williams, A. Rivlin, Z. Vaghchhipawala, L. Moeller, ... and Y. Chen (2022) Commercial scale genetic transformation of mature seed embryo explants in maize. *Frontiers in Plant Science* 13:1056190, <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1056190>
- Zhang Y., Y. Cao, Y. Wang and X. Cai (2023) Somatic embryogenesis induction and genetic stability assessment of plants regenerated from immature seeds of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. *Forests* 14:473, <https://doi.org/10.3390/f14030473>