

Método rápido para la obtención de maíz axénico a partir de semillas

Morales García Y. E.
Pazos Rojas L. A.
Bustillos Cristales M. R.
Krell T.
Muñoz Rojas J.

El maíz es una planta a partir de la cual se obtienen muchos productos comerciales⁷ y que frecuentemente se usa como modelo para ensayar la capacidad colonizadora de bacterias,⁸ evaluar su capacidad promotora del crecimiento de plantas¹⁵ e incluso en estudios del diálogo molecular entre microorganismos y raíces.⁹ Para estos ensayos es necesario contar con semillas de maíz axénicas, libres del microorganismo que se desea estudiar. Así se han propuesto distintas formas de esterilizar semillas, por ejemplo usando hipoclorito de sodio.¹⁰ Las semillas estériles se colocan en agar-agua o papel filtro húmedo para su germinación. Bajo estas circunstancias el porcentaje de germinación no es muy alto y muchas veces las semillas sufren una contaminación que no es fácil detectar debido a que las bacterias u hongos no crecen de forma rápida bajo estas condiciones y algunas semillas tienen que colocarse en medios ricos para monitorear su esterilidad. Por esta razón en el presente trabajo se plantea una forma alternativa para la obtención de maíz axénico de diversas variedades, donde la contaminación puede observarse fácilmente.



© Rosa Borrás, de la serie *Ajos*, 2010.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo el maíz (15 semillas de cada variedad) es sometido a un lavado en agua corriente, después es desinfectado con etanol al 70%, durante 10 minutos en un frasco hermético. Después el alcohol es decantado y el maíz se enjuaga con agua destilada estéril. Entonces se agrega cloro-bromo-dimetil-glicolil-urea (Dialcon S. A. de C. V. Reg. S.S.A. No. 135003-D) al 0.15% P/V, durante 20 minutos para la esterilización de las semillas. La solución de cloro-bromo-dimetil-glicolil-urea es decantada bajo condiciones de flujo laminar y el maíz es enjuagado 5 veces con agua destilada estéril, durante 3 minutos en cada lavado. El agua es descartada y las semillas resultantes estériles son colocadas en placas que contienen medio MSJ3; que es un medio MS¹² que contiene glucosa (20 mM) y sacarosa (30 mM) como fuente de carbono. Este medio contiene 2 g de fitagel por litro, el cual proporciona un soporte suave que permite la correcta germinación del maíz. Para permitir una humedad constante se coloca un círculo de papel servitoalla en la tapa de las placas con 2 ml de agua destilada estéril. La tapa de las placas es colocada en la base que contiene las semillas y la placa es sellada con parafilm o con film de cocina. El agua que se evapora llega a la tapa de las placas que tienen

agua y entonces al saturarse de humedad hay un reflujo de agua. Finalmente las placas son colocadas a 30°C el tiempo suficiente para la germinación del maíz en dependencia de la variedad.

Cinco semillas germinadas de cada variedad en buen estado (sin contaminación visual), fueron colocadas en 5 ml de agua destilada estéril y vortexadas vigorosamente. La suspensión obtenida se sometió a diluciones seriadas 1:10 y el número de bacterias fue determinado en medio MESMA⁶ mediante el método de goteo en placa.⁵

Las semillas germinadas axénicas se colocan en vermiculita estéril y se riegan con MSJ1 (MS libre de fuente de carbono, vitaminas y myo-inositol). Las plántulas se crecen en condiciones de cámara de plantas, bajo un fotoperiodo luz/obscuridad 16/8 a 25°C y 60% de humedad relativa. A los 15 días de crecimiento las plantas fueron fotografiadas.

RESULTADOS

En nuestro trabajo se germinaron cinco variedades de maíz criollo y dos variedades comerciales: maíz Girona y maíz palomero marca Morelos, observando que el método es efectivo para germinar a las semillas de todas las variedades, en un tiempo entre 3 a 5 días (Tabla 1). En este trabajo se observa también que cuando se contamina una semilla en el proceso o no es bien esterilizada, el microorganismo contaminante crece rápidamente y su crecimiento es perfectamente visible (no mostrado), por lo que estas semillas se pueden descartar para estudios posteriores. Después del proceso de germinación, todos los germinados estuvieron libres de microorganismos cultivables; ya que no se observó crecimiento en medio MESMA. Los germinados de maíz

Tipo de maíz	Procedencia	Tiempo de germinación en días
Blanco-Criollo	San Diego Buena Vista, Papalotla, Tlaxcala.	4
Azul-Criollo	San Diego Buena Vista, Papalotla, Tlaxcala.	5
Rojo-Criollo	San Diego Buena Vista, Papalotla, Tlaxcala.	3
Rosa-Criollo	San Diego Buena Vista, Papalotla, Tlaxcala.	3
Pozolero	Tixtla, Guerrero, México	5
Palomero	Marca Morelos, USA	8
Girona	Variedad ampliamente cultivada en España	3

Tabla 1. Tiempo de germinación del maíz, usando la metodología propuesta en este trabajo.

colocados en vermiculita crecen correctamente y el vigor de las plantas fue apropiado.

DISCUSIÓN

El cloro-bromo-dimetil glicolil urea es un compuesto conocido también como cloro-bromo-dimetil-glicolil-hidantoina;⁴ que ha sido utilizado como desinfectante para alimentos de consumo humano como vegetales y en este trabajo se observa que es eficaz para la esterilización superficial de maíz. Así, el protocolo que se muestra es una forma efectiva y exitosa para obtener maíz axénico de distintas variedades, que podría usarse para diversos estudios. En particular, en nuestro laboratorio estamos trabajando intensamente en estudios de interacción raíz de maíz-microorganismo debido a que es un modelo de fácil reproducibilidad. Evaluamos la capacidad de diversas bacterias benéficas para adherirse, colonizar, promover el crecimiento de plantas de maíz¹¹ o como modelo de rizorremediación⁹. Sin embargo, el modelo de maíz también es usado para realizar estudios de interacción con bacterias patógenas.¹³ El método podría aplicarse para la obtención de plantas axénicas de otras especies para propósitos de reforestación o de conservación de plantas de interés médico como la “chía”.² A pesar de que en nuestro trabajo no detectamos bacterias superficiales después de la germinación de las semillas de maíz no se debe descartar la posibilidad de la existencia de bacterias “no cultivables”¹ que podrían estar presentes y cuya evaluación requiere de pruebas de biología molecular. En este trabajo las plantas crecieron hasta los 15 días con un buen vigor y no fue evaluada la presencia de bacterias endófitas.¹⁴ No obstante, algunas bacterias endófitas podrían albergarse en el interior de las semillas y ellas podrían visualizarse en estados más avanzados de crecimiento de las plantas bajo condiciones controladas de esterilidad. Así, esta forma de obtención de germinados podría tener aplicaciones versátiles tanto científicas como aplicadas.

CONCLUSIÓN

La obtención de plántulas axénicas es de interés para varias áreas y de ahí la importancia de divulgar esta metodología. Algunos ejemplos donde se podría utilizar esta técnica son:

- Para la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento de plantas.
- Para la rizorremediación de compuestos contaminantes, donde las plantas se acoplan con bacterias de interés capaces de remediar un ambiente.
- Para la inoculación de plantas con bacterias que desencadenan la respuesta de defensa vía ISR (resistencia sistémica inducida por rizobacterias, una vía dependiente de etileno e independiente del ácido salicílico).
- Para el cultivo de plántulas sanas en invernaderos; donde se cultivan plantas de interés agrícola.
- Para el cultivo (en invernaderos) de plantas de ornato libres de patógenos.
- Para la obtención de plantas sanas destinadas para extraer metabolitos.
- Para la obtención de plantas que serán destinadas a reforestación
- Para obtención de plantas domésticas sanas.

Además, la metodología es muy sencilla, por lo que se puede practicar también en aulas estudiantiles y en laboratorios donde sea rutina la obtención de dichas plantas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la VIEP-BUAP, al BBVA y PROMEP (BUAP-PTC-116), por el apoyo recibido para desarrollar este trabajo, Laura Abisaí Pazos-Rojas es becaria CONACYT, por lo que agradecemos el apoyo de esta institución.



© Rosa Borrás, de la serie *Ajos*, 2010.



© Rosa Borrás, de la serie Ajos, 2010.



REFERENCIAS

- ¹ Amann RI, Ludwig W and Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59 (1995) 143-169.
- ² Ayerza R. The seed's protein and oil content, fatty acid composition and growing cycle length of a single genotype of chia (*Salvia hispanica* L.) as affected by environmental factors. *Journal of Oleo Science* 58 (2009) 347-354.
- ³ Böltner D, Godoy P, Muñoz Rojas J, Duque E, Moreno-Morillas S, Sánchez L and Ramos JL. Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*. *Microbial Biotechnology* 1 (2008) 87-93.
- ⁴ De Oliveira SM, Da Silva BP, Hernandez MZ, Alves de Lima MC, Galdino SL and da Rocha Pitta I. Structure, reactivity and biological properties of hidantoines. *Quim, Nova* 31 (2008) 614-622.
- ⁵ Herigstad B, Hamilton M and Heersink J. How optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 44 (2001) 121-129.
- ⁶ Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J, Sepúlveda J and Martínez-Romero E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiology Ecology* 29 (1999) 117-128.
- ⁷ Lawrence CJ, Harper LC, Schaeffer ML, Sen TZ, Seigfried TE and Campbell DA. MaizeGDB: the maize model organism database for basic, translational, and applied research. *International Journal of Plant Genomics* 2008 (2008) 1-10.
- ⁸ Liu X, Zhao H and Chen S. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiology* 52 (2006) 186-190.
- ⁹ Mantilla MA, Espinosa-Urgel M, Rodríguez-Herva JJ, Ramos JL and Ramos-González MI. Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biology* 8: R179 (2007) 1-13.
- ¹⁰ Miché L and Balandreau J. Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2001) 3046-3052.
- ¹¹ Morales-García YE, Aguilera-Méndez N, Huerta-Gómez AC, Fuentes-Ramírez LE y Muñoz-Rojas J. "Evaluación del antagonismo entre bacterias de interés agrícola y formulación de un inoculante multiespecies" en Memoria VI Encuentro "Participación de la Mujer en la Ciencia". *In extenso*. Biotecnología y Ciencias. Agropecuarias. México.
- ¹² Murashige T, Skoog FA. Revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 (1962) 473.
- ¹³ Pérez-y-Terrón R, Villegas MC, Cuellar A, Muñoz-Rojas J, Castañeda-Lucio M, Hernández-Lucas I, Bustillos-Cristales R, Bautista-Sosa L, Munive JA, Caicedo-Rivas R, and Fuentes-Ramírez LE. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico. *Australasian Plant Disease Notes* 4 (2009) 96-99.
- ¹⁴ Seghers D, Wittebolle L, Top EM, Verstraete W. and Siciliano SD. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004) 1475-1482.
- ¹⁵ Vyas P and Gulati A. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology* 9 (2009) 174: 1-15.