

# MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO EN CULTIVOS *in vitro* DE EMBRIONES INMADUROS Y MESOCOTILOS DE PLANTULAS DE MAIZ

M. A. Rapelá<sup>1,2</sup> y J. Herkovits (2, 3)

Recibido: 9/9/83

Aceptado: 2/2/84

## RESUMEN

La estructura en superficie y la organización de los cultivos *in vitro* iniciados a partir de embriones inmaduros y de mesocotilos de plántulas de maíz, fue observada utilizando la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Aunque los cultivos de tejidos parecieron crecer en forma de verdaderos callos, la observación con MEB, reveló que este crecimiento es una mezcla de células indiferenciadas (isodiamétricas) y en diferenciación (elongadas). Una aparente diferenciación al azar del xilema ocurre en los cultivos primarios. Estos cultivos responden a la inducción morfogenética en medios de cultivo modificados, formando centros meristemoides que contienen elementos conductores.

El análisis de secciones de cultivos iniciados a partir de mesocotilos con el escutelo, indica que el mesocotilo es el tejido de origen. Por ende, el escutelo parece no tener relación con la formación del callo.

## SCANNING ELECTRON MICROSCOPY ON *in vitro* CULTURES OF IMMATURE EMBRYOS AND MESOCOTYLS OF MAIZE PLANTLETS

### SUMMARY

The surface structure and organization of *in vitro* tissue cultures initiated either from immature maize embryos as from mesocotyl tissues taken from plantlets were observed using Scanning Microscopy (SEM). Although tissue cultures appeared to grow as true callus SEM examination, however, showed this growth to be a mix of undifferentiated (isodiametric) and differentiating (elongated) cells. An apparent random differentiation of xylem occur in primary cultures. Such cultures responded to morphogenetic induction on modified culture medium forming meristemoid centers containing vascular tissue.

Examination of sections of cultures initiated from the mesocotyl with scutellum indicated that the mesocotyl is the tissue of origin. Thus, the scutellum appears not involved in callus formation.

### INTRODUCCION

Una de las áreas más promisorias de la biología experimental la constituyen las técnicas de cultivo *in vitro* de vegetales, que han

permitido alcanzar conocimientos básicos y de inmediata aplicación en el campo agronómico. Así por ejemplo, mediante el cultivo de microsporas y anteras se han podido obtener plantas haploides y a partir de ellas di-

- 1) Instituto Fitotécnico de Santa Catalina. Universidad Nacional de La Plata.
- 2) Instituto de Biología de la Reproducción y Desarrollo Embrionario.
- 3) Director del Instituto de Biología de la Reproducción y Desarrollo Embrionario. Universidad Nacional de Lomas de Zamora.

95-105

ploides homocigóticos con un considerable ahorro de tiempo y espacio; a través de la hibridación somática se ha logrado la fusión de células de especie y géneros diferentes, logrando así superar la barrera de la incompatibilidad y aumentar la variabilidad génica del nuevo individuo; las técnicas de micropropagación *in vitro* han servido para establecer stocks de clones de plantas libres de enfermedades sobretodo en especies ornamentales y hortícolas; el cultivo de tejidos somáticos ha permitido incrementar los conocimientos básicos de la regulación de la dediferenciación y rediferenciación celular *in vitro* y aplicar los mismos en la utilización de sistemas de selección de mutantes y/o variantes, cultivo de embriones, criopreservación de germoplasma, etc. (Chaleff, 1983; Matthews y Schaeffer, 1982; Thomas *et al.* (1979).

Con respecto a la inducción de tejido indiferenciado y su posterior regeneración hasta obtener un nuevo individuo, a pesar de haberse trabajado con técnicas *in vitro* sobre casi todas las especies de cereales de gran cultivo, los resultados positivos se circunscriben a pocos casos (Ahloowalia, 1982; Cummings *et al.*, 1976; Dudits, *et al.*, 1975; Dunstan *et al.*, 1978; Green y Phillips, 1975; Harms *et al.*, 1976; Lu *et al.*, 1982; O'Hara y Street, 1978; Torne *et al.*, 1980). En el maíz, varios estudios han mostrado el espectro de respuestas de diversos genotipos al cultivo *in vitro*, lo que permite sugerir una estrecha correlación entre la regulación hormonal de la dediferenciación y la rediferenciación con el genotipo (Green y Phillips, 1975, Lu *et al.*, 1982; Rapela, 1983 a). El fenómeno de la rediferenciación en cultivos *in vitro* de maíz, puede producirse tanto por inducción hormonal secuencial de raíces y/o tallos como por embriogénesis somática (Green y Phillips, 1975; Lu *et al.*, 1982). Tanto en un caso como en otro, los estudios de la morfogénesis de los tejidos involucrados en estos procesos son esporádicos e incompletos.

El objetivo de este trabajo, el primero de una serie, es la descripción de la morfología externa de cultivos de tejidos *in vitro* en

maíz, desde el momento de la inducción de tejido indiferenciado, hasta su posterior crecimiento y rediferenciación, mediante la utilización del Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) En este primer trabajo, describimos el aspecto de diversos estadios de cultivos *in vitro* en maíz, obtenidos por dos métodos diferentes: a partir de embriones inmaduros, y a partir de mesocotilos de plántulas.

## MATERIALES Y METODOS

Para el presente estudio, se utilizaron líneas de maíz mutante *floury-a* de alta endocria. El gen mutante *floury-a*, es un modificador de la estructura del endosperma y además, en determinado medio génico, condiciona alta calidad proteica del grano (Magoja *et al.*, 1982; Rapela, 1982 a).

La inducción de tejido indeferenciado se realizó por dos métodos diferentes. En el primero, el tejido indeferenciado fue originado a partir de embriones inmaduros y, en el segundo, a través de mesocotilos de plántulas (embriones maduros germinados).

### a) Inducción a partir de embriones inmaduros

Se utilizó la técnica descrita por Rapela (1983 b). Para ello, las espigas fueron tomadas de plantas obtenidas en invernáculo, 17 días después de la polinización manual. Los cariopses fueron retirados de las mismas, se los esterilizó con hipoclorito de sodio al 2,5 por ciento durante 20 minutos y dos lavados posteriores con agua destilada estéril. Los embriones inmaduros fueron extraídos inmediatamente en forma aséptica y transferidos al medio de cultivo. La longitud promedio de los embriones de las líneas estudiadas fue de 3-3,5 mm. Los cultivos se iniciaron colocando los embriones, uno por tubo, en 10 ml de medio de cultivo para la inducción de callo. La posición de los embriones fue con el escutelo hacia arriba y el eje embrionario en contacto con el medio.

95-105

**b) Inducción a través de mesocotilos de plántulas (embriones maduros germinados)**

Las espigas fueron tomadas de plantas obtenidas en invernáculo, una vez que alcanzaron su madurez completa. La técnica de excisión y esterilización utilizada fue la descrita por Rapela (1982 b). Para ello, los cariopses fueron retirados de las espigas y sumergidos en agua destilada por 24 horas para ablandar los tejidos para la excisión. Los embriones maduros fueron extraídos en forma no aséptica de los cariopses. Luego, los embriones se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 2,5 por ciento seguido de dos lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, los embriones se llevaron a cajas de petri esterilizadas conteniendo doble papel de filtro húmedo, para inducir la germinación de los mismos. Al cabo de 5 días, los coleoptilos alcanzaron una longitud de 40 mm y las raíces de 80 mm. Los coleoptilos y las raíces fueron cortados y desechados, quedando un remanente de 4-5 mm de longitud correspondiente al mesocotilo. Esta región del mesocotilo, con el escutelo adjunto, fue llevada al medio de cultivo. La posición del cultivo en este caso, fue con el escutelo en contacto con el medio y el mesocotilo hacia arriba.

Para ambos métodos, el medio de cultivo estuvo compuesto por los componentes inorgánicos de Murashige-Skoog (1962). Los componentes orgánicos fueron los de Strauss (1958). Además, 20 g sacarosa/litro y 8 g agar/litro. El único regulador de crecimiento utilizado fue el 2,4-D (ácido 2,4-dicloro fenoxiacético), a razón de 2 mg/litro para la inducción de los embriones inmaduros y 15 mg/litro para la inundación de los mesocotilos de plántulas. El pH del medio se ajustó a 5,8 antes del autoclavado a 15 psi durante 20 minutos. Los cultivos se mantuvieron en la obscuridad a 28°C durante el período de inducción y con un fotoperíodo controlado de 12/12 hs a 28°C en los subcultivos siguientes. Dichos subcultivos se realizaron cada 28 días. En los subcultivos de embriones

inmaduros, la concentración del regulador se disminuyó a 1 mg/litro, y en los subcultivos de mesocotilos de plántulas, se disminuyó a 2 mg/litro.

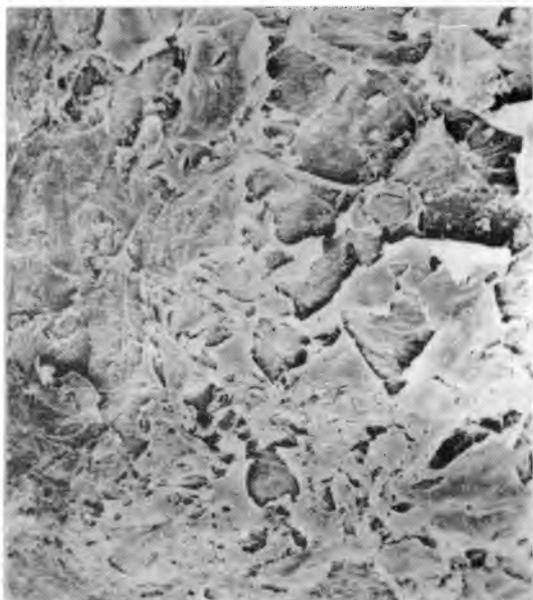
El material utilizado para los estudios de MEB, provino de cultivos *in vitro* en diversos estadíos de diferenciación, obtenidos por ambos métodos descriptos. Para el caso de los embriones inmaduros, las observaciones se realizaron a los 28, 56 y 84 días, designándose los mismos como Estadío 1, Estadío 2 y Estadío 3 respectivamente. De tal manera, las observaciones del Estadío 1 corresponden al fin del período de inducción de los cultivos, y los Estadíos 2 y 3 a los finales de los subcultivos posteriores. Para los mesocotilos de plántulas de maíz, las observaciones se realizaron a los 28 días, lo que corresponde al fin del Estadío 1. Los materiales fueron fijados en glutaraldehído al 2,5 por ciento en buffer fosfato 0,1 M, pH 7,2 durante 2-4 hs. Posteriormente fueron lavados con el mismo buffer y deshidratados en una serie de concentraciones ascendentes de acetona. A los especímenes deshidratados se les aplicó la técnica del punto crítico, y luego fueron recubiertos por oro-paladio. Las observaciones se realizaron con un microscopio Jeol JSM-U3 a 5-15Kv.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### a) Embriones inmaduros. Estadío 1

La secuencia de Figuras 1 (A-C), muestra la estructura exterior del tejido indiferenciado formado a partir del cultivo de embriones inmaduros, cuando el mismo presenta el aspecto de un calló típico sin diferenciación a ojo desnudo. En la Figura 1 A, se puede observar un sector del callo que se encuentra recubierto por una película de aspecto mucilaginoso, probablemente secretada por las mismas células del callo y que le da a éste su característico brillo. Esta película, aparece en la Figura 1 A, en forma rasgada, con dis-

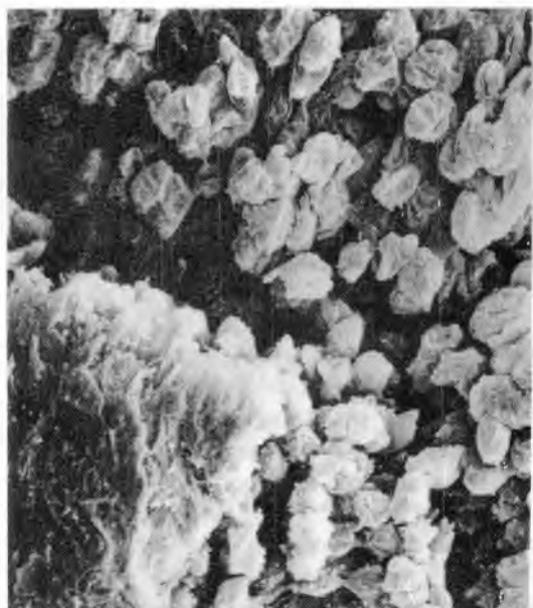
95-105



**1A**



**1B**



**1C**

Figura 1 (A-C). Observaciones con MEB de cultivos iniciados a partir de embriones inmaduros de maíz en el Estadío 1 (28 días). (A) Características de la película mucilaginosa que recubrió el callo (x500). (B) Película mucilaginosa rasgada que deja ver células isodiamétricas y alargadas con disposición aparentemente al azar (x150). (C) Sector de un callo con células de formas isodiamétricas a ovoides tanto turgentes como colapsadas (x300).

continuidades y zonas en proceso de desprendimiento. Esto lleva a pensar, que las discontinuidades de la película son producto del tratamiento de la muestra para la observación con MEB, y que dicha película recubre uniformemente el material sin tratar. Coincidentemente, Vuillaume y Deshayes (1977), trabajando con cultivos *in vitro* de maíz, describieron que los mismos están recubiertos por una substancia gelatinosa que les da una tonalidad amarillenta. Asimismo, Sharma y Lateef Bello (1982), trabajando con cultivos *in vitro* de triticale observaron bajo MEB, lo que ellos denominaron "substancia que se asemeja a una cutícula cerosa", que recubría el tejido indiferenciado. De tal manera, es posible inferir que la película mucilaginosa mencionada sea similar a la descrita en los trabajos citados precedentemente, y que dicha película sea además una característica general de los cultivos *in vitro*. En la Figura 1 B, pueden observarse restos de la misma película mucilaginosa mas destruidos, lo cual permitió dejar en descubierto la superficie celular del callo. Esta células presentan una variedad de formas, desde isodiamétricas hasta elongadas, con una disposición aparentemente al azar. La presencia de células elongadas, como se verá más adelante, podría reflejar zonas de elementos de conducción ya diferenciados, inmersos entre células indiferenciadas. Un corte neto de la película mucilaginosa se observa en la Figura 1 C, lo cual permitió dejar expuesto un sector del callo, en este caso formado por células isodiamétricas a ovoides tanto turgentes como colapsadas. La aparición de esta células ovoides podría ser la primera manifestación hacia la polaridad para la diferenciación de un elemento conductor. La presencia de células colapsadas en cultivos *in vitro* de rápido crecimiento como los aquí analizados es de difícil interpretación, ya que muy probablemente la aparición de esas formas resulten un artefacto de la preparación del material.

Las características morfológicas descritas son específicas de los cultivos durante el período de inducción (primeros 28 días), y

en subcultivos posteriores siempre que los mismos sean conducidos con un nivel similar o superior del regulador.

#### b) Embriones inmaduros. Estadío 2

En el subcultivo posterior de los cultivos iniciados a partir de embriones inmaduros, la disminución de la concentración del regulador a la mitad de la requerida para el período de inducción, provoca claros signos de diferenciación que se traducen en la aparición de estructuras organizadas observables a ojo desnudo. La microscopía electrónica permite observar en la secuencia de Figuras 2 (A-D), características de algunos de los procesos morfogénéticos que tienen lugar en las células del callo. En la Figura 2 A, se observan varias estructuras con aspecto de ápice más o menos cónico que serían meristemoides que dan origen a una raíz o a un vástago. El ápice que está al centro de la Figura 2 A, fue elegido para mostrar los detalles. En este ápice de 1 mm de altura aproximadamente, y en los restantes de la misma figura es posible identificar la presencia de células elongadas lo que indicaría que el proceso de diferenciación celular y el morfogénético se inician en etapas muy tempranas (algunos de los conos de la Figura 2 A tienen menos de 0,1 mm de altura). En la Figura 2 B, se observa que la mencionada estructura presenta una película mucilaginosa que la recubre parcialmente. Al igual que los callos observados en la secuencia de Figuras 1, esta capa presenta rasgaduras, y es probable, que la misma esté recubriendo todo el material original tal como se aprecia solamente en su vértice. El desgarramiento de la película mucilaginosa permite observar la disposición de las células subyacentes. En la base del cono, es fácilmente apreciable la presencia de dos tipos de células; unas relativamente pequeñas, isodiamétricas y turgentes, y otras elongadas probablemente pertenecientes al tejido del callo, estableciendo el nexo entre éste y el cono propiamente dicho. Distalmente a este tejido de la base, el cono está tapizado por 4 estra-



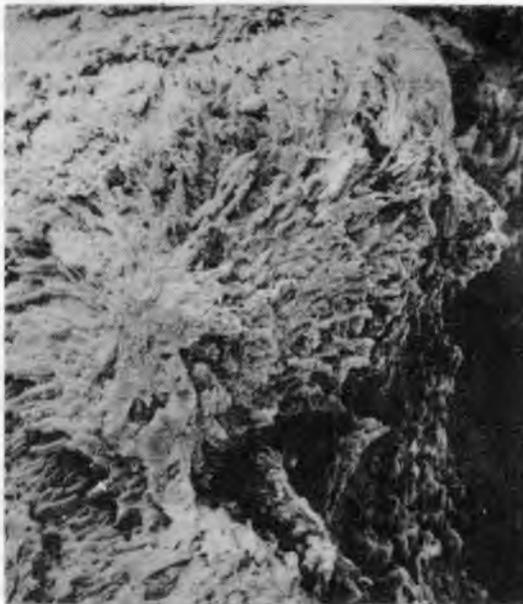
**2A**



**2B**



**2C**



**2D**

Figura 2 (A-D): Observaciones con MEB de cultivos iniciados a partir de embriones inmaduros de maíz en el Estado 2 (56 días). (A) Estructuras cónicas diferenciales, probables meristemoides (x20). (B) Estructura cónica central de la Fig. 2 A, tomada con mayor aumento (x100). (C) Zona de fractura de la misma estructura (x500). (D) La misma estructura tomada desde el ápice. Se observan además otras estructuras y los valles entre las mismas caracterizados por células alargadas e isodiamétricas respectivamente (x90).

tos de células alargadas en sentido axial. La zona donde falta la película mucilaginoso, y ésta en su configuración rasgada, pueden observarse con mayor aumento en la Figura 2 C. En esta Figura, está parcialmente reflejada la menor compactación celular presente en la zona de células isodiamétricas en comparación con las células distales del cono. En la Figura 2 D, se observa nuevamente el cono pero en este caso la foto fue tomada con el MEB desde su vértice. En dicha Figura, se aprecian las células elongadas que tapizan la estructura, las cuales presentan una clara orientación hacia el ápice o centro meristemoide. Es importante apreciar en esta Figura, la presencia de varias estructuras cónicas con células elongadas en proceso de diferenciación separadas entre sí por valles, en los que se observan células isodiamétricas presumiblemente aún no diferenciadas. Cabe mencionar aquí, que la organización inicial de las masas celulares en el mixomicete ameboide *Dictyostelium discoideum* durante la formación del pseudoplasmodio descrito por Koppachik (1982), presenta características externas similares bajo MEB a las mencionadas anteriormente en los cultivos *in vitro* de maíz. Esta similitud es interesante ya que la comparación del proceso de diferenciación entre un organismo superior y la agregación celular de *Dictyostelium* ya había sido sugerida por Brock (1970).

#### c) Embriones inmaduros. Estadío 3

La secuencia de Figuras 3 (A-C), fue tomada sobre tejidos en el final del 2º subcultivo, aunque muchas de las características también fueron comunes a observaciones sobre subcultivos posteriores. En este Estadío, la formación de estructuras diferenciadas de forma cónica fue generalizada sobre toda la masa del callo. Un corte de uno de esos conos diferenciados, permite observar el interior de los mismos formado en gran parte por elementos conductores. En la Figura 3 A, se observa la parte externa e interna de un cono diferenciado con el extremo secciona-

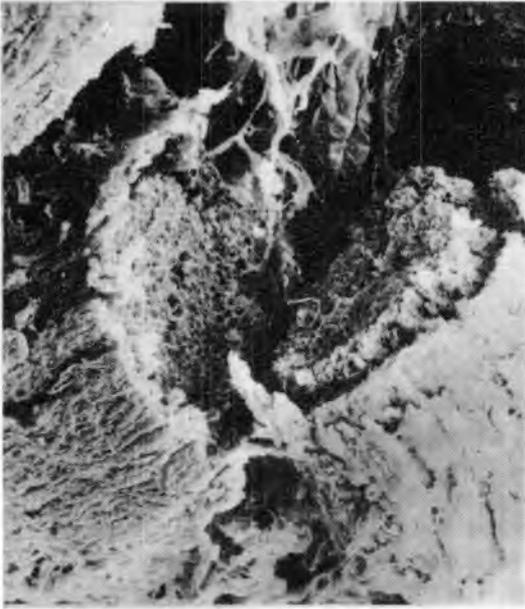
do en "V". En el exterior, las células alargadas diferenciadas parecen confluír hacia el vértice o centro meristemoide. En el interior, se observan con claridad los elementos conductores. En la Figura 3 C, un mayor aumento permite apreciar elementos del xilema, notándose la espiralización de la pared secundaria en el interior de un vaso.

#### d) Mesocotilos de plántulas. Estadío 1

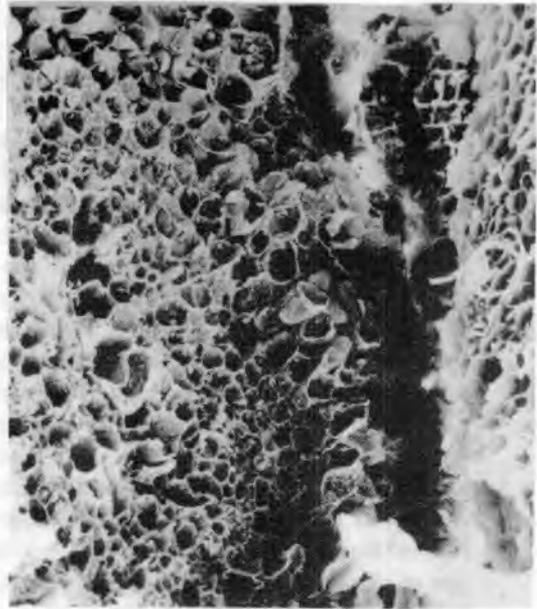
En el caso de los cultivos originados a partir de mesocotilos de plántulas (embriones maduros germinados), las características de los tejidos indiferenciados fue en algunos aspectos diferente a lo anteriormente descrito. En la Figura 4 A, se puede observar el tejido indiferenciado que se generó a partir del tejido original del explanto. En dicha Figura, se aprecian los restos del tejido conductor del mesocotilo y el callo originado a partir de este.

En los cultivos originados a partir de mesocotilos, no se observaron procesos de diferenciación celular tan notables como en los cultivos originados a partir de embriones inmaduros. Esto pudo deberse en parte, a que la película mucilaginoso que recubre las células del callo (Figura 4 B), resistió el proceso de tratamiento del material para las observaciones con MEB, e impidió una visión más profunda del interior de la masa celular. Además, es posible que este tipo de cultivos requiera un tiempo más prolongado *in vitro* para observar algún tipo de proceso morfogénico.

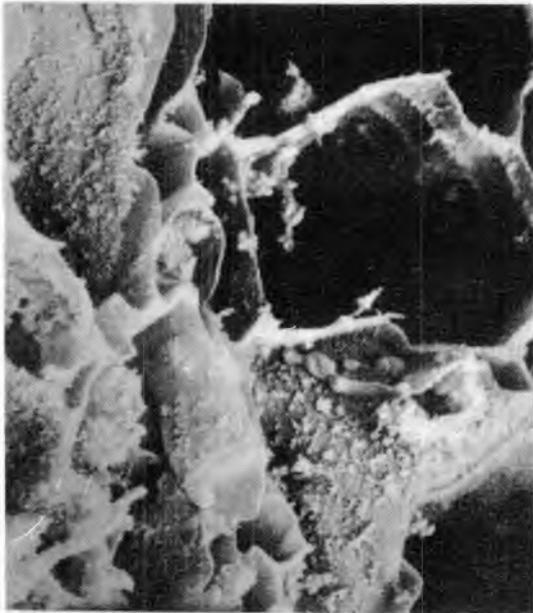
Tal como se ha mencionado en Materiales y Métodos, los cultivos *in vitro* de embriones inmaduros se realizaron colocando los mismos con el escutelo hacia arriba y el eje embrionario en contacto con el medio, al tiempo que los cultivos de mesocotilos se realizaron en posición inversa. En concordancia con estudios previos (Rapela, 1983 a, 1983 b), estas orientaciones son las que arrojan los mayores porcentajes de producción de callo. Green y Phillips (1975) y Harms *et al.* (1976), fueron los primeros en describir



3A



3B

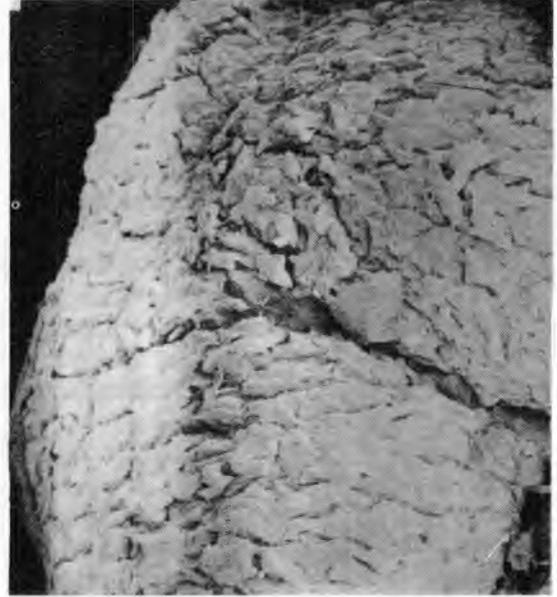


3C

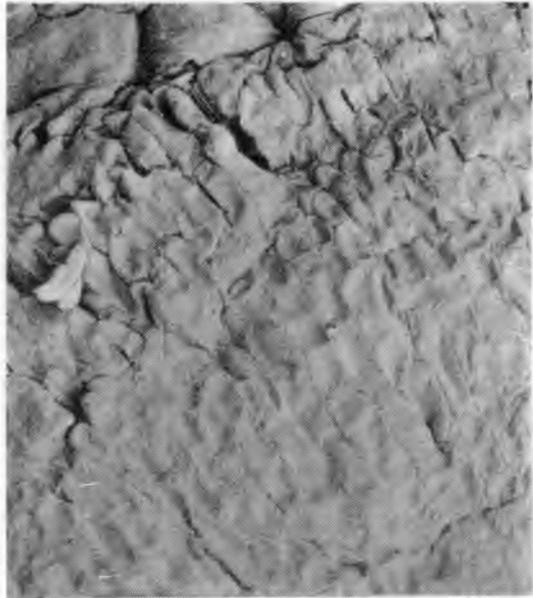
Figura 3 (A-C): Observaciones con MEB de cultivos iniciados a partir de embriones inmaduros de maíz en el Estadío 3 (84 días). (A) Corte en "V" de un cono diferenciado con células alargadas en el exterior confluyendo hacia el centro meristemoide y elementos de conducción en el interior (x150). (B) Elementos conductores en el interior de un cono (x300). (C) Espiralización de la pared secundaria en el interior de un vaso del mismo cono (x2000).



**4A**



**4B**



**4C**

Figura 4 (A-C): Observaciones con MEB de cultivos iniciados a partir de mesocotilos de plántulas de maíz en el Estadio 1 (28 días). (A) Mesocotilo de maíz con callos originados a partir del primero (x70). (B) Película mucilaginosa que recubre el mismo callo (x100). (C) La misma película tomada con mayor aumento recubriendo totalmente la masa celular (x350).

este tipo de fenómenos. Para el caso del cultivo de embriones inmaduros, se han aportado evidencias de que el escutelo es el tejido involucrado en la formación del callo (Springer *et al.*, 1979). Esto, explicaría el porqué cultivando los embriones inmaduros con el escutelo hacia arriba se obtienen los mayores porcentajes de formación de callo. Sin embargo, hasta el presente nada se ha dicho al respecto para el caso en que el explanto original lo constituyen mesocotilos con el escutelo adherido. De acuerdo a la Figura 4 A, y a otras microfotografías no presentadas, el tejido involucrado en estos casos parecería pertenecer al propio mesocotilo, al tiempo que el escutelo no intervendría en la formación del callo. Se requieren otros estudios para definir cual o cuales de los tejidos del mesocotilo origina (n) dicho callo. Utilizando un razonamiento similar que para el caso de los embriones inmaduros, esto explicaría el porqué cultivando los mesocotilos de plántulas con el escutelo hacia abajo, se favorece la producción del callo.

De acuerdo a las microfotografías presentadas para el caso de los cultivos iniciados a partir de embriones inmaduros (Figura 1 B), la masa celular originada estaría formada por células en distinto período de diferenciación. La diferenciación al azar del xilema (Halperin, 1969), la proliferación de tejidos a partir de una región meristemática subepitelial que los autores (Springer *et al.*, 1979) denominan zona cambial, o crecimientos aberrantes con formas parecidas a raíces (Mott y Cure, 1978), han sido fenómenos descritos detalladamente en cultivos *in vitro* de maíz. Esto ha llevado a algunos autores a considerar que los cultivos *in vitro* de maíz no son verdaderos callos, o masas indiferenciadas de células, sino que mas bien representan la generación y propagación de un grupo organizado de tejidos (Mott y Cure, 1978; Springer *et al.*, 1979).

El agrupamiento o asociación de una serie de elementos diferenciados (Figura 2 B, 3 A, 3 B), que aparentemente ya estarían preformados dentro de la masa indiferenciada

(Figura 1 B), conduciría a la morfogénesis de estructuras inclasificables al momento de nuestras observaciones (Figuras 2 A, 2 D). De acuerdo a la Figura 2 D, la orientación de los elementos conductores en los valles que se encuentran entre las estructuras cónicas generadas, podría responder a una información o control emanado de ápices o centros meristemoides cuyas células asumirían el rol de organizadores en el cultivo. La probable existencia de estos centros meristemoides en cultivos *in vitro* ya ha sido revisada por Halperin (1969). Se requieren estudios adicionales para detectar las características iniciales de las células formadoras de un centro meristemoides como asimismo para evaluar la ulterior diferenciación de las estructuras descritas en vástagos o raíces.

#### AGRADECIMIENTOS

Los estudios de MEB se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del CONICET con la muy valiosa colaboración de Jorge Hofmann. Los autores agradecen además, la colaboración de la Ing. Agr. Ana María Broccoli con los cultivos *in vitro*. Parte de los materiales utilizados se adquirieron con fondos de la CIC y SUBCYT.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Ahloowalia, B. S., 1982. Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Sci.* 22: 405-410.
- 2) Brock, T. D., 1970. Biology of microorganisms. *Prentice Hall*. U.S.A.
- 3) Cumming, D. P.; C. E. Green and D. D. Stutham, 1976. Callus induction and plant regeneration in oats. *Crop Sci.* 16: 465-470.
- 4) Chaleff, R. S., 1983. Isolation of agronomically useful mutants from plants cell cultures *Science*, 219: 676-682.
- 5) Dudits, D.; G. Nemet and Z. Haydu, 1975. Study of callus growth and organ formation in wheat (*Triticum aestivum*) tissue cultures. *Can J. Bot.* 53: 957-963.

- 6) Dunstan, D. E.; K. C. Short and E. Thomas, 1978. The anatomy of secondary morphogenesis in cultured scutellum tissues of Sorghum bicolor. *Protoplasma*, 97: 251-260.
- 7) Green C. E. and R. L. Phillips, 1975. Plant regeneration form tissue culture of maize. *Crop Sci.* 15: 417-421.
- 8) Halperin, W., 1969. Morphogenesis in cell cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 20: 395-418.
- 9) Harms, C. T.; H. Lorz and I. Potrykus, 1976. Regeneration of plantlets from callus cultures of *Zea mays L.* *Z. Pflanzenzucht.* 77: 347-351.
- 10) Kopachik, W., 1982. Orientation of cells during slug formation in *Dictyostelium*. *Wilhelm Roux'Archives*, 191: 348-354.
- 11) Lu, C.; I. K. Vasil and P. Ozias-Akins. 1982. Somatic embryogenesis in *Zea mays L.* *Theor. Appl. Genet.* 62: 109-112.
- 12) Magoja, J. L.; A. A. Nivio y M. A. Rapela, 1982. Maíces de alta calidad proteica con genotipo normal. *Mendeliana*, 5: 71-80.
- 13) Matthews, B. F. and G. W. Schaeffer, 1982. Agricultural applications of in vitro plant cultivation. In *Advances in Cell Culture*. Vol. 2: 267-303. Academic Press, N.Y.
- 14) Mott, R. L. and W. W. Cure, 1978. Anatomy of maize tissue cultures. *Physiol. Plant*, 43: 139-145.
- 15) Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.
- 16) O'Hara, J. F. and H. E. Street, 1978. Wheat callus culture: the initiation, growth and organogenesis of callus derived from various explant sources. *Ann. Bot.* 42: 1029-1038.
- 17) Rapela, M. A., 1982 a. Un nuevo enfoque para el estudio y el mejoramiento nutricional del maíz. 1er. Premio 10<sup>o</sup> Certámen Bolsa Com. Rosario "Ciencia y tecnología aplicadas al maíz". Separata, 15 págs.
- 18) Rapela, M. A. 1982 b. Growth inhibition by lysine plus threonine: comparative inhibition profiles between *floury-a* and normal maize embryos. *Plant Cell Physiol.* 23: 285-291.
- 19) Rapela, M. A., 1983 a. Factors involved in callus formation and growth of mutant maize embryos. *Maize Genet. Coop. N. Lett.* 57: 57-58.
- 20) Rapela, M. A., 1983 b. Condiciones para la callogénesis a partir del cultivo de tejidos de embriones inmaduros de maíz *floury-a* *Rev. Fac. Agr. U.N.L.P.* 59: 125-131.
- 21) Sharma, G. C. and L. Bello, 1982. A scanning electron microscope study of surface differentiation in triticale callus. *Crop Sci.* 22: 428-430.
- 22) Springer, W. D.; C. E. Green and K. Kohn, 1979. A histology examination of tissue culture initiation from immature embryos of maize. *Protoplasma*. 101: 269-281.
- 23) Straus, J., 1958. Spontaneous changes in corn endosperm tissue cultures. *Science*, 128: 537-538.
- 24) Thomas, E.; P. J. King and I. Potrykus., 1979. Improvement of crop plants via single cells in vitro: an assessment. *Z. Pflanzenzucht.* 82: 1-30.
- 25) Torne, J. M.; M. A. Santos; A. Pons and M. Blanco, 1980. Regeneration of plants from mesocotyl tissue cultures of immature embryos of *Zea mays L.* *Plant Sci. Lett.* 17: 330-344.
- 26) Viillaume, E. et A. Deshayes, 1977. Initiation de cals in vitro a partir de fragments de méso-cotyle et de coléoptile chez de mais. *Ann. Amélior. Plant.* 27: 657-674.