

MICROPROPAGACIÓN DE CHAYOTE (*Sechium edule* Jacq. SW.) A PARTIR DE BROTES VEGETATIVOS¹

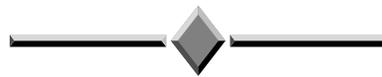
Ana Abdelnour², Carlos Ramírez³, Florent Engelmann⁴

RESUMEN

Micropropagación de chayote (*Sechium edule* Jacq. S.W.) a partir de brotes vegetativos. El chayote (*Sechium edule*) es una importante fuente de divisas para los países exportadores, entre los que Costa Rica mantiene el liderazgo mundial. Entre los factores más limitantes para su producción se encuentra el material de siembra, tradicionalmente la semilla, que por su naturaleza no permite la obtención de una producción morfológicamente homogénea de frutos (color, forma y textura de la epidermis) motivo de los altos porcentajes de rechazo en las plantas empacadoras. El establecimiento de una metodología de propagación vegetativa de la especie ayudaría a resolver los problemas de heterogeneidad. Por lo anterior, la presente investigación se dirigió a desarrollar un método de micropropagación a partir de brotes vegetativos. Se evaluó el efecto de varios desinfectantes y concentraciones de reguladores de crecimiento en las etapas de establecimiento, multiplicación y enraizamiento de dos cultivos comerciales. Se observó que una desinfección con hipoclorito de calcio al 4% permitió el mayor porcentaje de explantes establecidos asepticamente bajo condiciones *in vitro* (49%). También se observó que durante las etapas posteriores de la micropropagación, los requerimientos de reguladores de crecimiento fueron muy bajos (0,1 mgL⁻¹ de BA en la etapa de brotación de yemas y de 0,1 a 0,2 mgL⁻¹ de AIB durante el enraizamiento) o no se requirieron (etapa de multiplicación de microestacas).

ABSTRACT

Micropropagation of waterpear (*Sechium edule* Jacq. S.W.) from vegetative shoots. Waterpear (*Sechium edule*) is an important source of revenue for the exporting countries, being Costa Rica the leading producer. Among the main limiting factors for its production are the planting materials, traditionally the seed, that because of its nature it does not allow the production of morphologically homogeneous fruits (color, shape and epidermal texture), which results in high percentages of rejected fruits at the packing plant. The establishment of a protocol for vegetative propagation of this species will help to solve the heterogeneity problems. The present research was directed to develop a micropropagation protocol from shoots. The effect of various disinfectants and concentration of growth regulators during the *in vitro* establishment, multiplication and rooting phases were evaluated. Disinfections with 4% calcium hypochlorite allowed the highest percentage of aseptically established explants under *in vitro* conditions. There was also observed that during the following phases of micropropagation the requirements of growth regulators were very low (0.1 mgL⁻¹ BA during bud sprouting and 0.1 to 0.2 mgL⁻¹ AIB during rooting) or were not required (microcutting multiplication).



INTRODUCCIÓN

El chayote (*Sechium edule*) (Cucurbitaceae), es una planta herbácea, monoica y trepadora que constituye uno de los principales alimentos en México, América

Central y Sur América Tropical. Los frutos, hojas tiernas y raíces tuberosas se consumen como verdura, aunque el consumo del fruto es el más difundido. También se emplean en la industria para la elaboración de alimentos infantiles, jugos, salsas y pastas y como forraje para

¹ Recibido para publicación el 13 de marzo del 2002. Parte de la Tesis de Doctorado de la primera autora, presentada al Sistema de Estudios de Postgrado de la Universidad de Costa Rica.

² Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Email aabdelnour@iter.ac.cr

³ Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

⁴ IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute), Roma, Italia..

la alimentación del ganado. Se le atribuye propiedades medicinales para disolver cálculos renales y como auxiliar en el tratamiento de hipertensión, arterioesclerosis y la retención de orina (Newstron 1990). Debido al hábito de crecimiento y su siembra en barbacoa, en algunos países se ha incluido plantas de chayote en plantaciones mixtas para la recuperación y la conservación de suelos. El chayote es una fuente importante de divisas para Costa Rica, Guatemala, México y República Dominicana, entre los que Costa Rica mantiene el liderazgo mundial en las exportaciones (Lira 1996).

Entre los factores más limitantes en la producción de chayote se encuentra el material de siembra, tradicionalmente la semilla. Este tipo de propagación, aunque facilita la manipulación del material de siembra, no permite obtener la calidad deseada en la producción; el mercado internacional exige una producción morfológicamente homogénea, que descarta la posibilidad de incorporar al mercado la notable variabilidad de frutos producida en los sistemas tradicionales de cultivo. De acuerdo con productores de chayote de la zona de Ujarrás, provincia de Cartago, Costa Rica, en algunos casos el rechazo de frutos puede alcanzar hasta 80%. El establecimiento de una metodología para la propagación vegetativa de chayote es muy ventajoso porque permite la producción de clones de materiales seleccionados y con esto el incremento en la uniformidad y en la aceptación del fruto en las plantas empacadoras.

La micropropagación o propagación clonal *in vitro* es una de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales que tiene gran potencial para solventar esta limitante en la producción de chayote. Consiste en cultivar pequeños esquejes como puntas de tallos y yemas laterales bajo condiciones asépticas, para multiplicar masivamente el material de interés y obtener plantas fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta de origen (Ashmore 1997). Alvarenga y Morera (1992) experimentaron en la micropropagación de chayote utilizando el embrión sexual como material inicial, sin embargo, una vez en el campo, las plantas producidas mostraron variabilidad en crecimiento, forma del fruto y presencia de espinas propia de la propagación por semilla, lo que motivó la realización de algunos experimentos preliminares utilizando brotes vegetativos como material inicial para la micropropagación (Alvarenga *et al.* 1999).

El objetivo de la presente investigación consistió en desarrollar un método eficiente para la propagación vegetativa de chayote utilizando como técnica el cultivo *in vitro* de brotes vegetativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material

El material inicial para el establecimiento *in vitro* de chayote consistió de brotes vegetativos de plantas seleccionadas en la finca del Sr. Claudio Bonilla en Ujarrás de Cartago, Costa Rica. Los brotes fueron llevados al laboratorio de cultivo de tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, donde se llevó a cabo el presente trabajo durante los años 1999 y 2000.

Desinfección y establecimiento *in vitro*

Para estas pruebas cada experimento consistió de tres tratamientos de desinfección con cuatro repeticiones. La unidad experimental utilizada fue de ocho explantes. Cada ensayo se repitió tres veces en el tiempo. Para la desinfección, los brotes se lavaron con agua y detergente y se enjuagaron con abundante agua. Luego, los brotes se incubaron con base en tres tratamientos desinfectantes: cloro comercial ($\text{Na}(\text{OCl})_2$ al 2,5% i.a. por seis minutos), hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 4% i.a. por seis minutos) o Kilol (extracto de semilla de toronja) (11% i.a. por 30 minutos). Pasado este periodo, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, bajo condiciones asépticas, en la cámara de transferencia de flujo laminar. Se procedió a reducir los brotes eliminando las hojas más externas, de manera que se estableció *in vitro* el meristema, incluyendo dos o tres pares de hojas (yema), por frasco de cultivo.

Medio de cultivo

El medio básico de cultivo para el establecimiento *in vitro*, la multiplicación y el enraizamiento de chayote consistió de las sales minerales descritas por Murashige y Skoog (MS) (1962), con 30 gL^{-1} de sacarosa y $2,3 \text{ gL}^{-1}$ de Phytigel. El pH se ajustó a 5,8 antes del autoclavado. Se dispensó un volumen de 20 ml en cada frasco de cultivo (frascos grandes de la marca comercial Gerber). Durante la etapa de establecimiento también se adicionaron benciladenina (0, 0,05 y 0,1 mgL^{-1} BA) y ácido giberélico (0,05 y 0,1 mgL^{-1} GA3) y para las etapas de multiplicación y enraizamiento el medio se enriqueció con benciladenina (0, 0,1, 0,2, 0,5 mgL^{-1} BA) y ácido indolbutírico (0, 0,1, 0,2, 0,3, y 0,5 mgL^{-1} AIB) respectivamente. Los experimentos se evaluaron después de ocho a nueve semanas en cultivo.

Multiplicación

Durante esta etapa de la micropropagación se utilizaron las plántulas obtenidas durante la etapa de establecimiento *in vitro*. Estas plántulas se seccionaron en los entrenudos, de manera que cada explante consistió de un nudo con una yema. Los explantes se inocularon en el medio de cultivo MS enriquecido con benciladenina (BA), en concentraciones de 0, 0,1, 0,2 y 0,5 mgL⁻¹ según el tratamiento a evaluar. La evaluación se efectuó después de nueve semanas con base en la longitud del brote desarrollado, el número de nuevas yemas (o número de nudos) y el porcentaje de plantas con raíz.

Enraizamiento

Se utilizaron los brotes obtenidos durante la multiplicación. El explante a enraizar consistió del brote apical con uno o dos nudos y se inoculó en el medio de cultivo básico enriquecido con ácido indolbutírico (AIB) en concentraciones de 0, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,5 mgL⁻¹, según el tratamiento a evaluar. Las evaluaciones se realizaron después de cinco semanas de cultivo con base en el porcentaje de brotes enraizados y el número de raíces por brote.

Para analizar los resultados obtenidos en cada fase del proyecto, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y pruebas de comparación de medias entre tratamientos (Tukey).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección y establecimiento *in vitro*

El Hipoclorito de sodio (NaOCl₂ al 2,6% de i.a.) y el Kilol (11% i.a.) no permitieron altos porcentajes de explantes establecidos asépticamente (22% y 8% respectivamente) (Figura 1), lo que parece indicar que las concentraciones, el periodo de incubación o los productos no fueron los más adecuados para lograr este objetivo. Por otra parte, la incubación de las yemas en Hipoclorito de calcio (Ca(OCl₂)₂) permitió la obtención del mayor porcentaje de explantes asépticos (49%). El hipoclorito de sodio y el hipoclorito de calcio son productos comúnmente recomendados para la desinfección superficial de los explantes a establecer *in vitro* y aún cuando el primero es de fácil adquisición y manejo, para algunas especies el hipoclorito de calcio resulta menos tóxico a mayores concentraciones, permitiendo una desinfección más efectiva (George y Sherrington 1984, Navarro y Perea 1996).

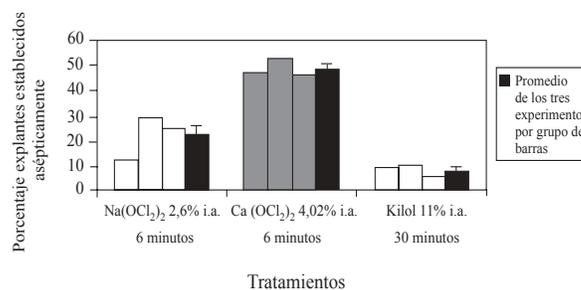


Figura 1. Efecto del tratamiento de desinfección sobre el establecimiento *in vitro* de brotes de chayote (*Sechium edule*). Cartago, Costa Rica.

Los brotes de chayote pueden considerarse explantes difíciles de desinfectar, ya que los brotes están rodeados de varias capas de primordios foliares, donde se alojan no solo microorganismos, sino también pequeños insectos. Por lo tanto, el desinfectante más efectivo debe ser aquel que cumpla con el requisito de ser suficientemente fuerte para eliminar los agentes contaminantes sin dañar al tejido u órgano a desinfectar (CIAT 1991). Para la desinfección de brotes Alvarenga *et al.* (1999) utilizaron dos desinfecciones consecutivas con Ca(OCl₂)₂ (al 4% y 6% respectivamente); sin embargo, en las pruebas realizadas durante la presente investigación, una sola desinfección con Ca(OCl₂)₂ al 4% de i.a. resultó el tratamiento más efectivo para lograr el objetivo propuesto.

Una vez realizada la desinfección, se disectaron las yemas (meristemas con dos pares de hojas). En esta etapa se utilizó el medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog (1962)(MS), sin reguladores de crecimiento. Aproximadamente el 50% de las yemas establecidas asépticamente mostraron algún grado de crecimiento y únicamente un 5% fue capaz de desarrollar una planta completa en este medio de cultivo. Por lo anterior, se realizaron varias pruebas adicionales para encontrar un medio que permitiera un mayor porcentaje de yemas desarrolladas. Se evaluó el efecto de adicionar varias concentraciones de BA y GA3 al medio de cultivo básico para inducir la brotación de las yemas. Algunos de estos resultados se muestran en el Cuadro 1.

Multiplicación

Los Cuadros 2 y 3 muestran el efecto de las concentraciones de BA adicionadas al medio de cultivo básico sobre la multiplicación de los brotes de chayote.

Los brotes del cultivar 13 no requirieron de la presencia del regulador del crecimiento tipo citocinina

Cuadro 1. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el porcentaje de brotes y callos formados a partir del cultivo de yemas de chayote (*Sechium edule*) cv Claudio. Cartago, Costa Rica.

Tratamiento (mgL ⁻¹)	% de brotes desarrollados ± ee	% de formación de callos ± ee
BA 0,05	65 ± 3,5	0
BA 0,10	70 ± 0,0	10 ± 7,0
BA 0,05 + GA ₃ 0,10	75 ± 3,5	25 ± 3,5
BA 0,10 + GA ₃ 0,10	77 ± 1,8	20 ± 0,0

ee: error estándar

(BA) para formar una planta completa bajo condiciones *in vitro* (Cuadro 2). También se observó que con este tratamiento se obtuvo el mayor porcentaje de plantas enraizadas. El enriquecimiento del medio de cultivo con BA redujo tanto la longitud de los brotes formados, como el número de nuevas yemas formadas (plantas potenciales) y el porcentaje de plántulas con raíces.

Cuadro 2. Efecto de la concentración de benciladenina (BA) sobre la multiplicación y el enraizamiento de chayote (*Sechium edule*) cv. 13. Cartago, Costa Rica.

Concentración BA (mgL ⁻¹)	Longitud brote (cm)	Nuevas yemas (#)	Plántulas con raíz (%)
0	5,53 a *	4,6 a	69 a
0,05	3,63 b	3,03 b	54 a
0,10	2,66 bc	2,63 b	30 b
0,20	2,40 bc	2,53 b	10 bc
0,50	1,90 c	2,00 b	0 c

* Medias seguidas de una misma letra no se consideran distintas ($p \leq 0,05$) según prueba de Tukey.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Alvarenga *et al.* (1999) para este clon. Sin embargo, estas investigadoras informaron sobre el crecimiento vigoroso de otros clones de chayote en un medio MS enriquecido con 0,1 mgL⁻¹ de BA y 0,5 mgL⁻¹ de GA₃.

En el cultivar Claudio, se observó un crecimiento de plántula menor que para el cultivar 13 con todas las concentraciones evaluadas (Cuadro 3). Sin embargo, este clon produjo el mayor número de nuevas yemas y un mayor porcentaje de plantas enraizadas en el medio sin BA. La concentración 0,05 mgL⁻¹ de BA no tuvo un efecto negativo en el número de nuevas yemas formadas ni en el número de plántulas con raíz, ya que no difieren estadísticamente de aquellas cultivadas en ausencia del regulador del crecimiento.

Cuadro 3. Efecto de la concentración de benciladenina (BA) sobre la multiplicación y el enraizamiento de chayote (*Sechium edule*) cv. Claudio. Cartago, Costa Rica.

Concentración BA (mgL ⁻¹)	Longitud brote (cm)	Nuevas yemas (#)	Plántulas con raíz (%)
0	3,80 a *	5,50 a	85 a
0,05	3,25 b	5,25 a	70 a
0,10	2,35 c	4,25 b	15 b
0,20	2,25 c	4,10 b	5 b
0,50	1,50 d	2,70 c	0 b

* Medias seguidas de una misma letra no se consideran distintas ($p \leq 0,05$) según prueba de Tukey.

Para ambos cultivares (13 y Claudio), las concentraciones de BA mayores que 0,50 mgL⁻¹ indujeron la formación de callos en todas las microestacas cultivadas. Las respuestas obtenidas, tanto en estas pruebas como en las efectuadas para el cultivo de yemas, parecen indicar que para la micropropagación de chayote no se requiere la adición de reguladores de crecimiento o se requieren en concentraciones muy bajas.

Enraizamiento

En todos los cultivares evaluados (13, CI y JM) el cultivo de brotes de chayote en ausencia de enraizadores permitió el desarrollo de raíces (Datos para los clones 13 y CL se muestran en los Cuadros 2 y 3). Sin embargo, cuando los brotes fueron cultivados en presencia de ácido indolbutírico (AIB) se observó que el porcentaje de plantas enraizadas aumentó al 100%. Como se muestra en el Cuadro 4, el porcentaje de plantas enraizadas fue de 100% en los brotes cultivados en 0,1 y 0,2 mgL⁻¹ de AIB y el número de raíces desarrolladas fue significativamente mayor (8,9 y 9,7 raíces por plántula

Cuadro 4. Efecto de la concentración de ácido indolbutírico (AIB) sobre el enraizamiento de brotes de chayote (*Sechium edule*) cv. 13. Cartago, Costa Rica.

Tratamiento (mgL ⁻¹ de AIB)	Plantas enraizadas (%)	# Raíces/planta* (Promedio)
0	75	1,8 b
0,1	100	8,9 a
0,2	100	9,7 a
0,3	92	6,3 ab
0,5	67	4,0 ab

** Medias seguidas de una misma letra no se consideran distintas ($p \leq 0,01$) según prueba de Tukey.

respectivamente) que en aquellos brotes cultivados en ausencia del regulador de crecimiento (1,8 raíces por plántula). Resultados similares se han encontrado en otras especies vegetales, donde la adición al medio de cultivo de soluciones similares a las utilizadas en este estudio incrementaron el número de raíces desarrolladas (González y Vilca 1998, Kannan y Jasrai 1996). El promedio de la longitud de la raíz más larga no se consideró un parámetro importante, ya que esta variable no presentó diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Las plantas producidas *in vitro* fueron aclimatadas en condiciones de invernadero.

Los resultados de la presente investigación mostraron la factibilidad de propagar varios materiales de chayote utilizando el cultivo *in vitro*. Además, pone a disposición de los productores y mejoradores una nueva herramienta para multiplicar masivamente materiales seleccionados manteniendo la calidad de los mismos.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Internacional para los Recursos Fitogenéticos (IPGRI) y a la Vicerrectoría de Investigación del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) por el apoyo financiero al proyecto y al Señor Claudio Bonilla por facilitar el material vegetal.

LITERATURA CITADA

- ALVARENGA, S.; FLORES, D.; ABDELNOUR-ESQUIVEL, A. 1999. Micropropagación de fenotipos seleccionados de chayote (*Sechium edule*). Tecnología en Marcha 13: 9-15.
- ALVARENGA, S.; MORERA, J. 1992. Micropropagación *in vitro* del chayote. Tecnología en Marcha. 11: 31-42.
- ASHMORE, S.E. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Roma, Italia. 67p.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. (CIAT) 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia. 970p.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exergenes, Inglaterra. pp. 3-6.
- KANNAN, V.; JASRAI, Y. 1996. Micropropagation of *Gmelina arborea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46: 269-271.
- GONZALEZ, C.; VILCA, J. 1998. Micropropagación vegetativa *in vitro* de aliso (*Alnus acuminata*). Asociación Civil para la Investigación y Desarrollo Forestal (ADEFOR). Caja Marca, Perú. 41p.
- LIRA, R. 1996. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Chayote (*Sechium edule* Jacq.) SW. IPGRI. Roma, Italia. 58p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- NAVARRO, W.; PERA, M. 1996. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. EUNA, Costa Rica. pp. 15-17.
- NEWSTROM, L.E. 1990. Origen and Evolution of Chayote. In: Bates, Robinson and Charles (eds.) Biology and Utilization of the Cucurbitaceae. Cornell University Press. pp. 141 -149.