

# Propagación Vegetativa *in vitro* del Chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.). Fase de Establecimiento<sup>1</sup>

G. Somarribas\*; J. Sandoval\*\*, L. Müller\*\*

## ABSTRACT

By meristem, apex and shoot segment cultures, which contained an axillary bud, possibilities for obtaining rapid *in vitro* propagation in chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) was explored. It became apparent that there existed a strong tendency to form callus indistinctly between the types of explant employed. It was found that shoot apices showed the best growth response. Complete plantlets were regenerated in Murashige and Skoog medium, supplemented with 1 mg  $.01^{-1}$  ANA, 0.3 mg  $.01^{-1}$  BA and 0.2 mg  $.01^{-1}$  K. The morphogenic responses were studied histologically.

Keys words: *Sechium edule*, micropropagation.

## COMPENDIO

Mediante el cultivo de meristemas, ápices y segmentos de tallo con una yema axilar, se exploró la posibilidad de lograr una multiplicación rápida *in vitro* del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.). Se observó una fuerte tendencia a la formación de callo, indistintamente del tipo de explante utilizado. Se determinó que los ápices fueron los explantes que mostraron mayor respuesta al crecimiento. Se obtuvieron plantas completas en medio Murashige y Skoog suplementado con 1 mg  $.01^{-1}$  ANA, 0.3 mg  $.01^{-1}$  BA and 0.2 mg  $.01^{-1}$  K. Los patrones de morfogénesis observados fueron estudiados histológicamente.

Palabras clave: *Sechium edule*, micropropagación

## INTRODUCCION

El chayote es un producto no tradicional de exportación de Costa Rica, apetecido en mercados internacionales. Los países compradores poseen normas rigurosas para la calidad de los productos que importan. Desde este punto de vista, el chayote no es la excepción y los problemas fitosanitarios son con frecuencia una limitante a su exportación. En consecuencia, es prioritario un trabajo de mejoramiento genético, mediante el cual se puedan seleccionar tipos más productivos y de mejor calidad; sin embargo, la investigación en esta área es incipiente.

El chayote pertenece a la familia de las cucurbitáceas y es una planta alógama, que causa la producción de descendencias heterogéneas. Poblaciones homogéneas, previamente seleccionadas, pueden obtenerse mediante propagación asexual. La experimentación del uso de esquejes en este aspecto es escasa. Una alternativa sería establecer una metodología para la micropropagación del chayote, utilizando varias partes de la planta como explante, para poder obtener su multiplicación asexual rápida.

Otros representantes de esta familia han sido estudiados y cultivados *in vitro* (17, 18). Así, por ejemplo, Jelaska (8, 10) informó sobre la inducción de callo y la diferenciación de embrioides a partir de segmentos de hipocótilo en *Cucurbita pepo*, obtenidos de plántulas germinadas *in vitro*. Jelaska (8) también logró la formación de embrioides en *C. pepo* por medio del cultivo de secciones de un cotiledón. Este autor, en la mayoría de sus experimentos, utilizó el medio de Murashige y Skoog.

Nadolska y Malepszy (14) usaron como explantes secciones de hojas de *Cucumis sativus* y obtuvieron plantas enteras al inocular los explantes en medio de Murashige y Skoog más 0.1 mg  $.01^{-1}$  de ANA y cinetina. Otros autores (11) han informado la inducción de callo en varias cucurbitáceas, usando como explantes, en la mayoría de los casos, los cotiledones o el hipocótilo.

Coutts y Wood (4) aislaron protoplastos de *C. sativus* y, luego, obtuvieron respuesta organogénica al observar la regeneración de raíces. Recientemente, Alvarenga y Villalobos (1) propusieron la metodología *in vitro* como una alternativa para la conservación de germoplasma de *S. edule*. Al igual que otros miembros de importancia económica de la familia Cucurbitaceae, el chayote no ha sido investigado *in vitro*. Según Jelaska (9, 11), es posible lograr éxito en cucurbitáceas después de una adecuada selección y manipulación de

<sup>1</sup> Recibido para publicación el 20 de marzo de 1990.

\* Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), San José, C.R.

\*\* Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, C.R.

explantes y apropiadas condiciones de cultivo. Tomando esta sugerencias en consideración, en este trabajo, se trató de investigar las bases para establecer una adecuada metodología para una micropropagación rápida y eficiente de esta verdura.

### MATERIALES Y METODOS

Los explantes utilizados (meristemas, ápices, segmentos de tallos con yema axilar), provenían de plantas establecidas en el campo en el área de colecciones vivas del CATIE (Cabiria). Para cada serie experimental se muestreó una sola planta, con el propósito de minimizar el error debido a la heterogeneidad del material. Una vez escogidas las plantas, donadoras de explantes, fueron atomizadas cada cinco días durante dos meses con una mezcla de fungicidas con base en Benlate (Du Pont® Benomyl = Metil-1-(butilcarbomil)-2-benzimidazol-carbamato) y Ridomil (Ciba-Geigy® N-(2,6-Dimetilfenil)-N-(metoxiacetil)-alanina metil éster) en dosis de  $1 \text{ g} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  y  $2 \text{ g} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$ , respectivamente. A esta mezcla se le agregó  $1.5 \text{ ml} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  de Triton (Rohm and Hass® surfactante) como adherente. Simultáneamente se aplicó el insecticida metilparatió en dosis de  $3 \text{ ml}^{-1}$ .

Luego, en laboratorio, se practicaron cuatro tratamientos desinfectantes con 50 repeticiones cada uno:

- ápices y segmentos de tallo se colocaron durante 15 min en solución acuosa de Savlon 0.5% (Imperial Chemical Industries® Cetrimida 15%, gluconato de clorhexidina 1.5%). Posteriormente, el material permaneció 1 h en solución de Benlate  $1.5 \text{ g} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$ , Ridomil  $1.5 \text{ g} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  más Triton  $2 \text{ ml} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$ . Después se lavó tres veces con agua destilada estéril;
- material se sumergió en Savlon al 0.05% durante 20 min, se lavó con agua y se transfirió a la mezcla de Benlate  $0.05 \text{ g} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$ , Ridomil  $0.05 \text{ g} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  y Triton  $2 \text{ ml} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  por espacio de 15 min;
- porciones de tallo con su yema axilar se colocaron en una solución de hipoclorito de calcio al 5% durante 15 minutos. Después fueron lavados tres veces con agua destilada estéril. Este tratamiento se practicó únicamente para segmentos de tallo de 1.5 cm de longitud;
- material fue sumergido en alcohol de 70% por espacio de 10 segundos. Luego fue puesto en solución de bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) al 0.1% durante un minuto; inmediatamente se lavó el material tres veces con agua destilada estéril y se sumergió en hipoclorito de sodio (blanqueador comercial "Ajax cloro" diluido 1:1) (2.5%), más tres

gotas de Tween 20, durante 10 minutos. Por último se lavó el material tres veces con agua destilada estéril.

En condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se inocularon los explantes en el respectivo medio de cultivo. Se utilizaron tubos de vidrio de 100 mm x 23 mm que contenían alícuotas de 10 ml de medio cada uno. Se usó el medio basal de Murashige y Skoog (13), más inositol  $100 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$ , glicina  $2 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$ , ácido nicotínico  $0.5 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$ , piridoxina  $0.5 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$ , tiamina  $0.1 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$ , riboflavina  $0.1 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$ , sacarosa  $30 \text{ 000 mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$ , y los reguladores de crecimiento AIA, ANA, BA, GA<sub>3</sub>, desde  $0.1 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  hasta  $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  solos y en combinaciones. La consistencia semisólida del medio se logró con la adición de  $7000 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  de Bacto-Agar (Difco). El pH se ajustó a 5.8 y luego el medio fue esterilizado en autoclave durante 15 min a  $1.5 \text{ kg}$  de presión por  $\text{cm}^2$  ( $121^\circ\text{C}$ ).

Después de su inoculación, los explantes fueron incubados en un ambiente controlado:  $27^\circ\text{C}$  durante el día,  $25^\circ\text{C}$  durante la noche, fotoperíodo de 16/8 h, iluminancia de 3000 lux al nivel de los cultivos y humedad relativa del 80 por ciento.

Durante la incubación de los cultivos se determinó el desarrollo, brotación y enraizamiento de yemas axilares; el crecimiento de meristemas y ápices; formación de callo; porcentaje de supervivencia del material, de contaminación de los explantes, y del grado de oxidación del material. Además, para estudiar histológicamente las respuestas observadas en el material cultivado *in vitro*, se practicó el método usual de infiltración en parafina, corte con micrótopo y microscopía de luz (15).

### RESULTADOS Y DISCUSION

El alto porcentaje de contaminación endógena del material escogido y tratado como explante (Cuadros 1 y 2) limitó el establecimiento de las metodologías de micropropagación de *S. edule* en este experimento. Constantine (3) manifestó que la contaminación ocurre usualmente por una inadecuada manera de trabajar en condiciones asépticas, por el uso de una insuficiente desinfección superficial del explante y por la presencia de microorganismos endógenos. En este experimento el porcentaje de contaminación aumentó conforme se incrementó el tamaño del explante utilizado. El principal problema fue la aparición de bacterias endofíticas que causaron contaminaciones blanquecinas o rojizas; luego ocurrió la muerte de los explantes. Resultados similares fueron obtenidos por Alvarenga y Villalobos (datos sin publicar, 1988), al trabajar con cultivo de ápices para el establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro*.

**Cuadro 1.** Resultados de la contaminación *in vitro* después de diferentes intervalos de incubación, en explantes tratados y no tratados con fungicidas sistémicos en el campo.

Tratamiento	Material	Días de incubación	Contaminación (%)
Sin tratamiento en el campo	Apices y meristemas	6	47
		15	65
		30	82
	Yemas laterales	6	71
		15	75
		30	83
Con tratamiento en el campo	Apices y meristemas	6	38
		15	62
		30	70
	Yemas laterales	6	52
		15	70
		30	75

En cuanto al cultivo de meristemas, éstos se desarrollaron lentamente y no se logró observar diferenciación de un vástago completo. Fue muy evidente la tendencia a la formación de callo con los tratamientos: a)  $5 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  AIA; b)  $2 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  AIA; +  $0.5 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  ANA +  $1 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  K; c)  $5 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  AIA +  $2 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  K y d)  $0.5 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  ANA +  $1 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  K. Resultados similares han sido informados por otros autores (7, 12) con otros representantes de la familia Cucurbitaceae.

Los ápices de aproximadamente 5 mm de tamaño, crecieron lentamente debido, posiblemente, a la interferencia por contaminación. Se notó también una tendencia hacia la formación de callo y algunos explantes desarrollaron raíces cuando el medio fue enriquecido con auxinas, especialmente ANA. Se logró un crecimiento relativo de 3 cm en dos meses de cultivo, en un medio Murashige y Skoog, suplementado con  $1 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  ANA +  $0.3 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  BA +  $0.2 \text{ mg} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  K +  $0.5 \text{ g} \cdot 0 \text{ l}^{-1}$  de carbón activado; no se observó rizogénesis. En algunos cultivos (22%) se notó una pérdida de coloración verde en hojas y tallos, los que se tornaron amarillentos, luego blanquecinos y traslúcidos (vitricación) y posteriormente necróticos.

En el cultivo de segmentos de tallo con la yema axilar, fue evidente la formación de raíces alimenticias

**Cuadro 2.** Efecto de varios tratamientos desinfectantes en explantes de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) cultivados *in vitro* (N = 50).

Tratamiento	Explante	Tiempo de cultivo (d)	Contaminación (%)	Explantes limpios (%)
A*	ápices y segmentos de tallo con yema axilar	15	75	25
B**	ápices y segmentos de tallo con yema axilar	15	73	27
C***	Segmentos de tallo con yema axilar	15	85	15
D****	ápices y segmentos de tallo con yema axilar	15	82	18

**Notas:**

- \* Savlon (Cetrimida 15%, gluconato de clorohexidina 1.5%) 0.5% durante 15 min; más permanencia durante una hora en solución de Benlate  $1.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , Ridomil  $1.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , Triton  $2 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ ; más tres lavados con agua estéril.
- \*\* Savlon al 0.05% durante 20 min; más dos lavados con agua estéril; más tratamiento con la mezcla Benlate 0.05  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ , Ridomil 0.05  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  y Tritón  $2 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$  por espacio de 15 min; más dos lavados con agua estéril.
- \*\*\* Hipoclorito de calcio al 5% durante 15 min; más tres lavados con agua estéril.
- \*\*\*\* Inmersión en alcohol de 70% por espacio de 10 s; más permanencia en solución de bicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) al 0.1% durante un minuto; más tres lavados con agua estéril; más inmersión de 10 min en hipoclorito de sodio 2.5%; más tres lavados con agua estéril.

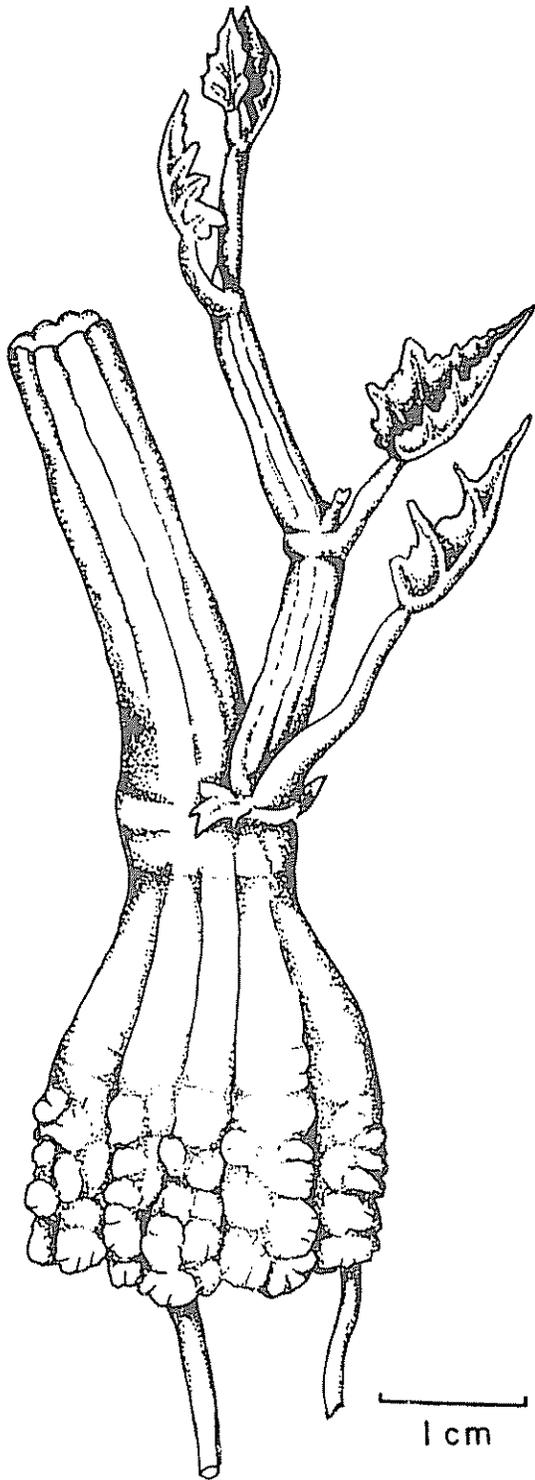
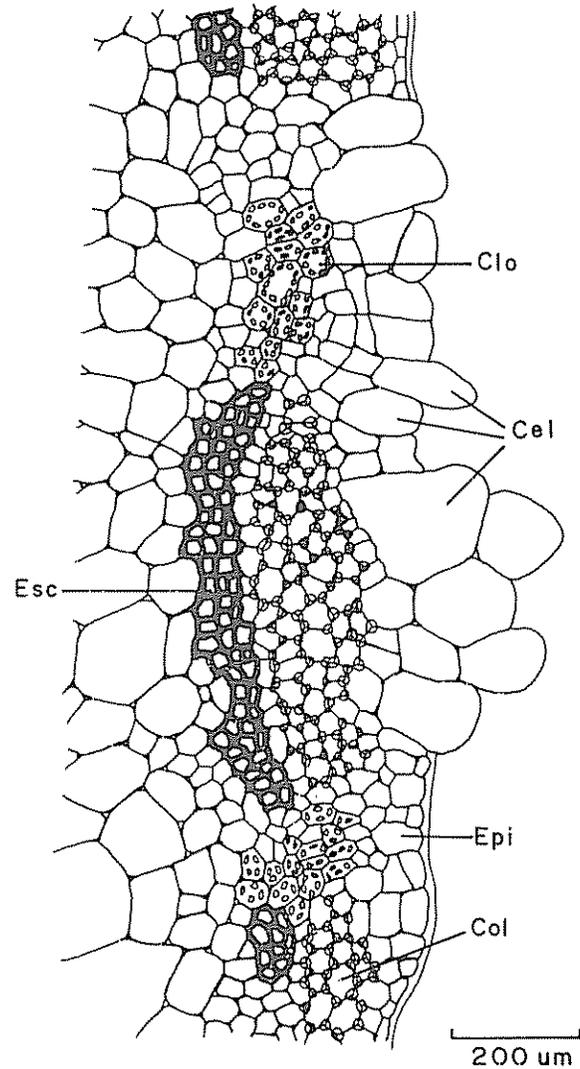


Fig. 1. Explante de *S. edule* constituido por un segmento de tallo con yema axilar, después de dos meses de cultivo. La yema se transforma en un brote, se inician raíces en la base, en que se nota hinchamiento y formación de callosidades.

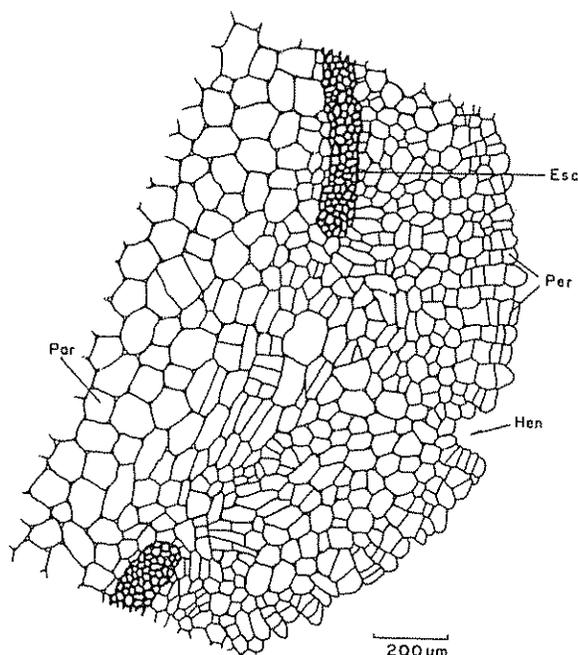
y la aparición de callo en la base del explante (Fig. 1). Exámenes histológicos demostraron que este callo se inicia en células epidérmicas y subepidérmicas (Fig. 2). Al dividirse éstas, se forman células con dimensiones muy superiores a las células madres. En un estado más avanzado (Fig. 3) se aprecia que la parte externa de callo es morfológicamente similar a la del súber. La posición en serie de las células hijas, especialmente cerca de la superficie, confirma este hecho.



**Leyenda:**

- Cel: células epidérmicas y subepidérmicas modificadas (iniciales de callo).
- Clo: clorénquima
- Col: colénquima angular.
- Epi: epidermis
- Esc: esclerenquima lignificado.

Fig 2 Corte transversal del tallo de *S. edule* in vitro. el cual muestra el inicio de la formación de callo.



#### Leyenda:

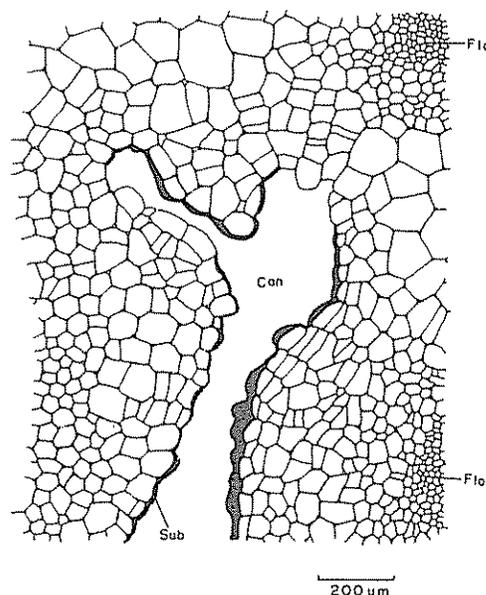
Esc: esclerenquima lignificado  
Hen: hendidura.  
Par: parénquima medular.  
Per: peridermis en formación.

Fig. 3. Corte transversal del tallo de *S. edule in vitro* en que se nota formación avanzada de callo.

En la Fig. 3 aparece una hendidura en la superficie del callo. Tales hendiduras, que corresponden a los surcos del tallo, pueden transformarse en canales profundos en un estado más avanzado del callo. En dichos canales (Fig. 4) las células expuestas al aire son derivadas típicamente de células cambiales del tipo felógeno, con amplia capa de suberina en la pared externa; estos cambios no se observan en un tallo crecido en el campo (Fig. 5).

En caso de una raíz joven producida en medio de cultivo (Fig. 6), ésta muestra poca diferenciación. Al envejecer (Fig. 7) se diferencia la estructura tetrarca. Sin embargo, no se distinguen bien la endodermis y el periciclo, como ocurre en una raíz desarrollada en suelo (Fig. 8). Pero la mayor diferencia entre una raíz *in vitro* y una formada en el campo, la constituyen los pelos radicales cortos y exageradamente inflados y deformados.

Se estudió también la anatomía de la hoja de un explante con 25 d de permanencia en cultivo *in vitro*



#### Leyenda:

Can: hendidura en forma de canal  
Flo: floema  
Sub: suberización

Fig. 4. Corte transversal del tallo de *S. edule in vitro*. Se aprecia la presencia de hendiduras en forma de canales profundos y suberización en las células superficiales del callo.

(Fig. 9). Al hacer la comparación con una hoja desarrollada en condiciones naturales (Fig. 10), y del mismo estado de madurez, se aprecia en la primera que la superficie adaxial muestra mayor densidad de tricomas, lo que se debe a la superficie de la lámina muy reducida. Los parénquimas no se diferenciaron bien y mostraron hipertrofia. El mesófilo parece parénquima fundamental, sin espacios aeríferos grandes y pocos cloroplastos; y no se observaron estomas (Fig. 9).

Las anteriores observaciones concuerdan con los resultados de otros autores (2, 5, 6, 16), los cuales han encontrado que condiciones *in vitro* favorecen cambios anatómicos y morfológicos en los explantes.

#### CONCLUSIONES

En esta investigación los explantes que presentaron una mayor capacidad de morfogénesis, y que posibilitarían la micropropagación del *S. edule*, fueron los ápices y segmentos de tallo con una yema axilar. Sin embargo, su desinfección superficial resultó difícil, incluso después del tratamiento repetido de la planta madre con fungicidas sistémicos antes de la excisión, o después de un tratamiento de sumersión en estos fungicidas.

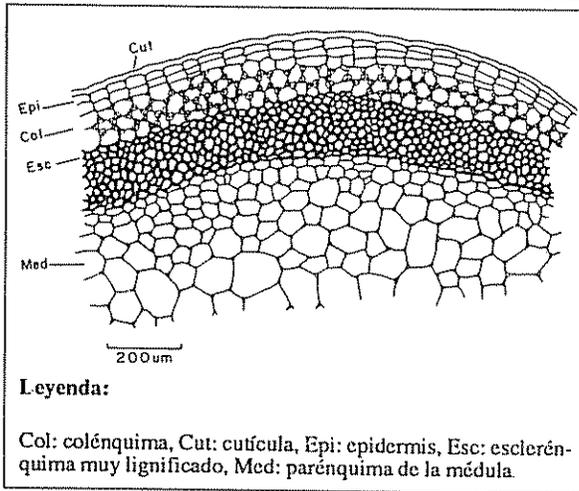


Fig. 5 Corte transversal del tallo de *S. edule* crecido en el campo.

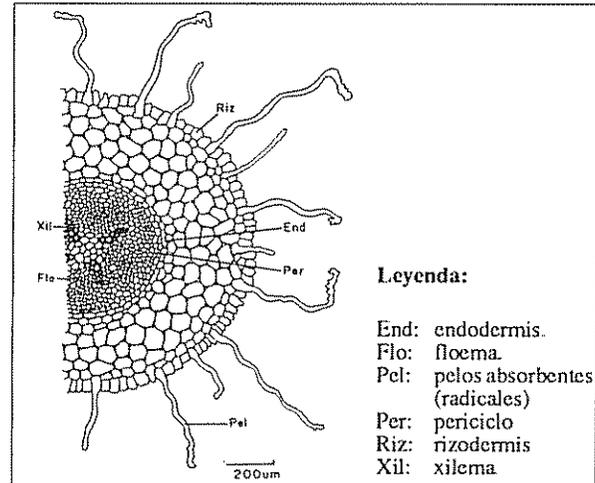


Fig. 8 Corte transversal de una raíz adulta de *S. edule* crecida en el campo.

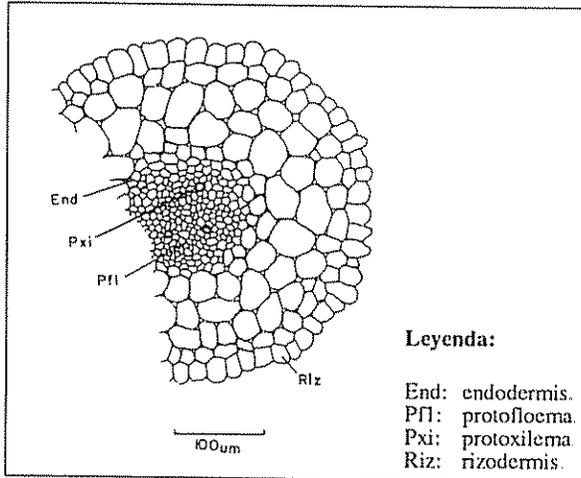


Fig. 6 Corte transversal de una raíz *in vitro* muy joven de *S. edule*.

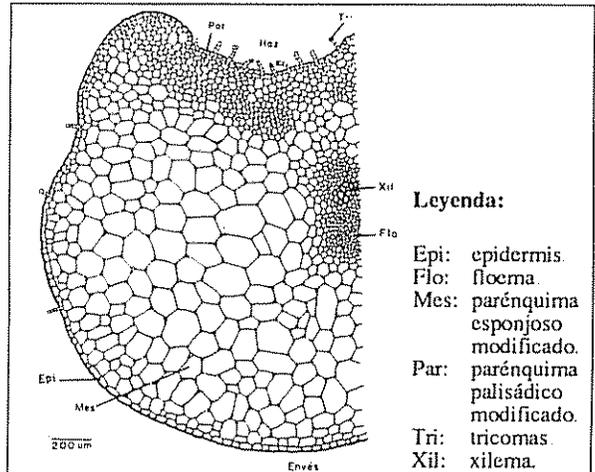


Fig. 9 Corte transversal de una hoja adulta de explante *in vitro* de *S. edule*.

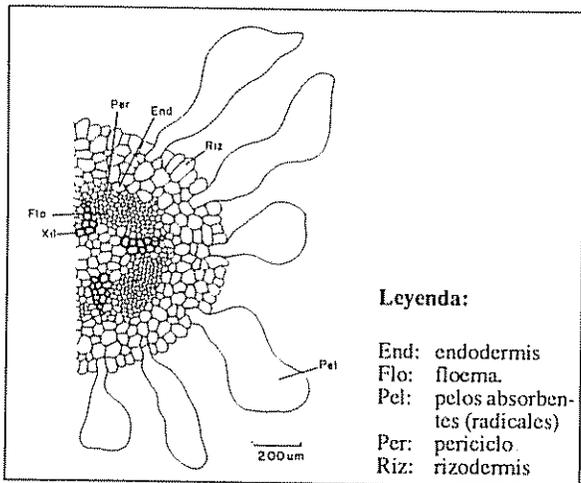


Fig. 7. Corte transversal de una raíz *in vitro* vieja de *S. edule*

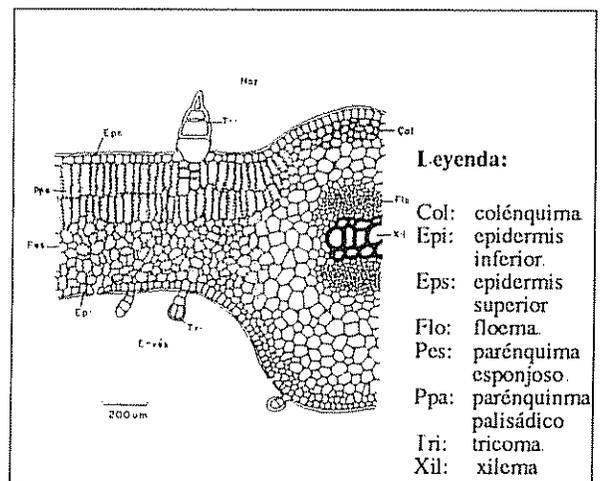


Fig. 10 Corte transversal de una hoja adulta crecida en campo de *S. edule*

El efecto de la adición de reguladores de crecimiento al medio debe ser críticamente observado para evitar la tendencia hacia la formación de callo, la cual limitaría la obtención de una multiplicación clonal. Se encontró que, a menor tamaño de explante utilizado, menores fueron los problemas de contaminación, pero resultó en una deficiente respuesta morfogénica. No hubo presencia o interferencia en el desarrollo de los explantes causada por liberación y oxidación de polifenoles.

El menor crecimiento se produjo en el medio sin reguladores de crecimiento, lo cual sugiere que los reguladores exógenos son necesarios para un rápido desarrollo *in vitro* del ápice del chayote.

#### LITERATURA CITADA

1. ALVARENGA, S.; VILLALOBOS, V. 1988. Estudio morfogénico de chayote (*Sechium edule*). In Reunión del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios (34., 1988) Resúmenes. San José, C.R. 112 p.
2. BONNEL, E.; DEMARLY, Y.; ESSAD, S. 1983. Evolution anatomique des tissus foliaires de canne à sucre (*Saccharum* sp.) cultivés *in vitro*. Canadian Journal of Botany 61:830-836.
3. CONSTANTINE, D. 1986. Micropropagation in the commercial environment. In Plant tissue culture and its agricultural applications. Withers L., Alderson, P. Butterworths (Eds.) London. p. 175-186.
4. COUTTS, R.; WOOD, K. 1975. The isolation and culture of cucumber mesophyll protoplasts. Plant Science Letters 4:189-193.
5. DONNELLY, D.; VIDAVER, W.; LEE, K. 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. Plant Cell, Tissue, Organ Culture 4:43-50.
6. GROUI, B.; ASTON, M. 1978. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. Annals of Botany 42:993-995.
7. HANDLEY, L. W.; CHAMBLISS, O. 1979. *In vitro* propagation of *Cucumis sativus* L. HortScience 14(1):22-23.
8. JELASKA, S. 1972. Embryoid formation by fragments of cotyledons and hypocotyls in *Cucurbita pepo*. Planta 103:278-280.
9. JELASKA, S. 1974. Embryogenesis and organogenesis in pumpkin explants. Physiologia Plantarum 31:257-261.
10. JELASKA, S. 1980. Growth and embryoid formation in *Cucurbita pepo* callus culture. In Réunion Eucarpia: Application de la culture *in vitro* à l'amélioration des plantes potagères. Doré C. (Ed.) Versailles, INRA, Section Legumes. p. 172-178.
11. JELASKA, S. 1986. Cucurbits. In Biotechnology in agriculture and forestry: Crops. Y.P.S. Bajaj (Ed.). Berlin, Heidelberg, Springer Verlag v. 23. p. 371-386.
12. LAZARTE, J. E.; SASSER, C. 1982. Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of *Cucumis sativus* L. HortScience 17(1):88.
13. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3):473-497.
14. NADOLSKA; MALEPSZY 1984. *In vitro* culture of *Cucumis sativus*. II. Histological aspects of plant differentiation. In International Symposium Plant Improvement. Proceedings. F. Novak, L. Havel, J. Dolezel. Prague, Czechoslovakia, Institute of Experimental Botany. p. 187-188.
15. SASS, J. E. 1958. Botanical microtechnique. 3 ed. Iowa State College Press, Ames. 228 p.
16. SUTTER, E.; LANGHANS, R. 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. Journal of the American Society for Horticultural Science 104:493-496.
17. VAJRANABHAI, S.; MEHTA, A. 1977. Effects of kinetin on growth and nucleic acid metabolism in suspension cultures of *Cucumis melo* L. Annals of Botany 41:483-491.
18. WEHNER, R.; LOCY, R. 1981. *In vitro* adventitious shoot and root formation of cultivars and lines of *Cucumis sativus* L. HortScience 16(6):759-760.