

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA  
SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE POSGRADO

MICROPROPAGACIÓN Y ESTUDIO DE ALGUNAS OPCIONES PARA LA  
CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA DE CHAYOTE  
(*Sechium edule* Jacq. Sw.) in vitro

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico  
Académico del Programa de Estudios de Posgrado en  
Fitomejoramiento del Centro Agronómico Tropical de  
Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

*Magister Scientiae*

por

SILVANA ALVARENGA VENUTOLO

CATIE  
Turrialba, Costa Rica  
1990

Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE, y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

COMITE ASESOR:




Jorge Morera, Ph.D.  
Profesor Consejero



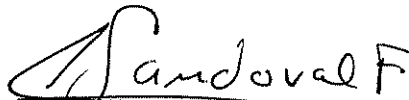
---

Víctor Villalobos, Ph.D.  
Miembro del Comité




---

Marc Berthouly, Ph. D.  
Miembro del Comité



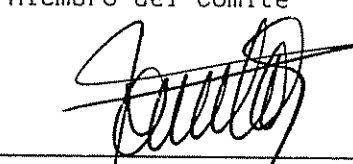
---

Jorge Sandoval, MSc.  
Miembro del Comité



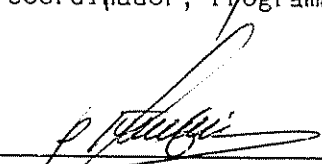
---

Ana Abdelnour, MSc.  
Miembro del Comité



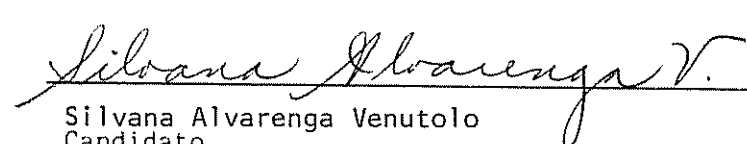
---

Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.  
Coordinador, Programa de Estudios de Posgrado



---

Dr. José Luis Parisi  
Subdirector General Adjunto de Enseñanza



---

Silvana Alvarenga Venutolo  
Candidato

## DEDICATORIA

A mis hijas Laura y  
María Isabel, con  
todo mi amor.

A mis padres, por su ejemplo  
de honestidad y trabajo

## AGRADECIMIENTOS

La autora expresa su sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

A Víctor Villalobos Ph.D., Jefe del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales del CATIE y a Ramón Lastra Ph.D., Coordinador de Posgrado, por sus enseñanzas y por hacer posibles mis estudios de Maestría en el CATIE.

A Jorge Morera Ph.D. por su confianza y apoyo al trabajo realizado.

A Jorge Sandoval M. Sc. por las valiosas ideas y la ayuda brindada.

A Ana Abdelnour M.Sc. por su apoyo constante y su sincera amistad.

A Marc Berthouly Ph.D. por la amplia colaboración brindada.

Al Instituto Tecnológico de Costa Rica y en especial a la Lic. Ana María Fournier y al Departamento de Química por su apoyo y comprensión.

A la Lic. Nelly Vásquez por su invaluable ayuda en el trabajo histológico y en la preparación de la exposición.

A la M.Sc. María Elena Aguilar por su apoyo y amistad brindada durante el tiempo de estudio.

A Gilberth, Luis, Rodolfo, Juan Luis, Edgar, William, Maritza, personal de la Unidad de Biotecnología por su apoyo logístico, y valiosa colaboración y amistad.

A Ludwing Müller Ph.D., el gran maestro por sus enseñanzas en el campo científico y en la vida diaria.

Al M.Sc. Jorge Arce por su inestimable ayuda.

A Hernán por su apoyo constante y su gran amistad a lo largo de estos dos años.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	viii
SUMMARY.....	x
1. INTRODUCCION .....	1
2. REVISION DE LITERATURA .....	4
2.1 Ubicación taxonómica y aspectos rele- vantes del chayote .....	4
2.2 Micropropagación .....	6
2.2.1 Micropropagación de cucurbitáceas .....	7
2.2.2 Cultivo de embriones.....	9
2.2.3. Cultivo de embriones de cucur- bitáceas .....	11
2.3 Inducción de callo, regeneración y obtención de metabolitos secundarios .....	12
2.4 Conservación de germoplasma .....	14
2.4.1 Efecto de baja temperatura sobre los sistemas biológicos. ....	18
2.4.2 Aplicación de bajas temperaturas <i>in vitro</i> como método de conservación .....	21
2.4.3 Empleo de la sacarosa en conser- vación .....	24
2.4.4 Metabolismo de la sacarosa .....	26
2.4.5 Influencia de la sacarosa en la morfogénesis .....	28
2.4.6 Incidencia de la sacarosa en la síntesis de clorofila .....	31
2.4.7 Inducción de la producción de metabolitos secundarios .....	31
2.4.8 Inhibidores o retardadores del crecimiento .....	34
2.4.9 Aplicación del ácido acetil sali- cílico (AAS) .....	34
2.5 Estabilidad genética de los sistemas <i>in vitro</i> .....	37
2.6 Técnicas de evaluación utilizadas en conservación .....	40

3.	MATERIALES Y METODOS .....	41
3.1	Micropropagación .....	41
3.1.1	Selección de explantes y desinfección	41
3.1.2	Crecimiento y aclimatación .....	45
3.2	Conservación de germoplasma .....	45
3.2.1	Selección de variables .....	46
3.2.2	Efecto de la temperatura versus AAS y sacarosa .....	47
3.2.3	Diseño experimental .....	48
4.	RESULTADOS.. .....	50
4.1	Micropropagación .....	50
4.1.1	Control de la contaminación .....	50
4.1.2	Respuestas morfogénicas pro- ducidas por la interacción de los medios de cultivo y los tipos de explante .....	53
4.2	Conservación de germoplasma .....	58
4.2.1	Efecto de la concentración de sacarosa .....	58
4.2.1.1	Incidencia de la saca- rosa en el crecimiento .....	60
4.2.2	Efecto de los niveles de AAS sobre el crecimiento y la morfogénesis .....	68
4.2.3	Efecto de los niveles de tempe- ratura sobre el crecimiento y morfogénesis en explantes de <i>S. edule</i> .....	77
4.2.4	Efecto general de los tratamien- tos de sacarosa, AAS y temperatura ...	83
4.3	Ensayo de interacción Temperatura-Sacarosa y temperatura-AAS .....	86
4.3.1	Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento .....	86

4.3.2	Efecto de la temperatura vs. sacarosa y vs. AAS sobre la inducción de hojas, brotes y raíces ..	88
5.	DISCUSION DE RESULTADOS .....	98
5.1	Micropropagación .....	98
5.1.1	Control de la contaminación .....	98
5.2	Respuestas morfogénéticas .....	100
5.3	Efecto de la concentración de sacarosa y AAS y del factor temperatura .....	104
5.3.1	Efecto de la sacarosa .....	104
5.3.2	Efecto del AAS .....	110
5.3.3	Efecto de la temperatura .....	113
5.4	Efecto de la interacción de factores .....	115
6.	CONCLUSIONES .....	117
7.	RECOMENDACIONES .....	119
8.	BIBLIOGRAFIA .....	121



## RESUMEN

Esta investigación se realizó en la Unidad de Biotecnología del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales del CATIE, con la finalidad de establecer el protocolo de micropropagación del chayote *Sechium edule*, para posteriormente desarrollar la metodología de conservación *in vitro* para el establecimiento de un futuro banco de germoplasma.

El protocolo de micropropagación se desarrolló utilizando microestacas de aproximadamente 5mm de longitud, las que fueron sembradas en un medio que contenía las sales de Murashige y Skoog (MS)(1962), complementado con ácido nicotínico (0,5 mg/l), piridoxina (0,5 mg/l), Tiamina-HCl (0,1 mg/l), inositol (100 mg/l), caseína hidrolizada (200 mg/l), sacarosa (30 g/l) y Gel-Rite (1,5 g/l).

La inhibición del crecimiento se logró sometiendo los explantes durante un mes a estrés osmótico (4 a 8% de sacarosa), a bajas temperaturas (16, 18, 20, 22°C) o añadiendo ácido acetyl salicílico (AAS) ( $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-1}$  M) al medio de cultivo MS (1962) empleado en micropropagación. En cada caso se seleccionaron los tratamientos más efectivos. En la segunda etapa del trabajo de conservación se combinó el efecto de la temperatura (16°C) con el estrés hídrico y con el AAS

( $10^{-3}M$ ) por un período de seis meses con evaluaciones mensuales.

Todos los tratamientos factoriales, así como las interacciones de los tratamientos seleccionados inhibieron el crecimiento. Se determinó la influencia de cada tratamiento en las siguientes variables: incremento de peso(mg), incremento de longitud(mm), peso seco(mg), número promedio de hojas y brotes producidos, sobrevivencia, presencia y longitud de raíces y aspectos morfogénicos.

Se encontró que el tratamiento de conservación *in vitro* que provocó menos daño a los explantes y no produjo alteraciones morfológicas fue el que combinó una temperatura de  $16^{\circ}C$  con un 6% de sacarosa.

## SUMMARY

This research was carried out at the Biotechnology Unit of the Tropical Crops Improvement Program at CATIE. The purpose of the investigation was to establish a micropropagation protocol for "chayote" (*Sechium edule*) in order to develop an *in vitro* conservation methodology for the establishment of a future germplasm bank of this species.

The micropropagation protocol was developed using microcuts of approximately 5 mm length. This material was cultured in a medium containing Murashige and Skoog salts (MS) (1962), complemented with nicotinic acid (0.5 mg/l), pyridoxine (0.5 mg/l), Thiamine-HCl (0.1 mg/l), inositol (100 mg/l), hydrolyzed casein (200 mg/l), sucrose (30 g/l) and Gel-Rite (1.5 g/l).

Growing inhibition was achieved by putting the explants under osmotic stress (4 to 8 % of sucrose), at low temperatures (16, 18, 22°C) or adding acetyl salicylic acid AAS ( $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ , and  $10^{-9}$  M) to the MS (1962) medium during a period of one month. In each case the most effective treatments were selected. During the second phase of the conservation research the temperature's effect was combined

with the hydric and AAS ( $10^{-3}$  M) effect for a period of six months with monthly evaluations.

All factorial treatments and interactions of selected treatments caused growth inhibition. Influence of each treatment was determined for the following variables: weight increase (mg), length increase (mm), dry weight (mg), average number of leaves and shoots, survival, presence and length of roots, and morphogenic aspects.

It was found that the *in vitro* conservation treatment combined with a temperature of 16°C and 6 % of sacaroese showed the least explants damage and did not cause morphological alterations.

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Ensayos de conservación utilizando bajas temperaturas. ....	23
Cuadro 2. Algunos trabajos realizados con inductores de estrés osmótico. ....	33
Cuadro 3. Medios de cultivo utilizados en la fases de establecimiento y conservación ...	44
Cuadro 4. Respuestas morfogénicas de la siembra de distintos explantes de <i>S. edule</i> en diferentes medios de cultivo. ....	52
Cuadro 5. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre el crecimiento, sobrevivencia y producción de hojas, brotes y raíces en explante de <i>Sechium edule</i> . ....	60
Cuadro 6. Significancia de las variables evaluadas a diferentes concentraciones de sacarosa (0, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 g/l) a los 30 días de la siembra de microestacas de <i>S. edule</i> ....	65
Cuadro 7. Evaluación de los factores sacarosa AAS y temperatura a diferentes niveles en relación al promedio de incremento de peso, longitud, peso seco, número de hojas y brotes. ....	68
Cuadro 8. Medidas por tratamiento de AAS de varios aspectos cuantificados a los 30 días de la siembra. ....	69
Cuadro 9. Significancia de las variables evaluadas en explantes sometidos a diferentes concentraciones de AAS (0, 10-3M, 10-6M, 10-9M) durante 30 días. .	72
Cuadro 10. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y algunos aspectos morfogénicos de <i>S. edule</i> ....	77

Cuadro 11.	Grado de significancia de las variables cuantitativas evaluadas a diferentes temperaturas (18°C, 18°C, 20°C, 22°C y 25°C) 30 días después de la siembra .....	81
Cuadro 12.	Medias y porcentajes totales peso de los factores evaluados .....	83
Cuadro 13.	Promedios de incremento en longitud, incremento en peso, número de hojas, número de brotes, presencia, longitud de raíces y sobrevivencia (%) en las diferentes interacciones de temperatura - AAS - Sacarosa. ....	87
Cuadro 14.	Promedios mensuales de las variables evaluadas, con las diferentes interacciones probadas. ....	91
Cuadro 15.	Promedio global de incremento de peso, incremento de longitud, peso seco, número de hojas y brotes a los seis meses de conservación in vitro de <i>S. edule</i> , en las diferentes combinaciones de temperatura - AAS - Sacarosa. ....	96

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Callo friable, derivado de segmentos de hojas inoculadas en el medio de cultivo 12, se observa presencia de raíces. ....	54
Figuras 2 y 3. Plantas producto de la siembra de microestacas en el medio 1, sin reguladores del crecimiento a los 8 y a los 20 días de la inoculación, respectivamente .....	54
Figura 4. Planta regenerada de novo a partir de microestacas apicales en el medio de propagación 1 (MSc) .....	54
Figura 5. Planta regenerada a partir de microestacas, observándose la proliferación de raíces, cinco semanas después de la siembra. ....	54
Figura 6. Planta neoformada a partir de yemas axilares sembradas en el medio 1. ....	54
Figura 7 y 8. Neoformación de brotes en callos derivados de la siembra de segmentos de hojas inmaduras, en medio de cultivo 12 conteniendo auxinas y citocininas, se observa la biopolaridad de los embriones. ....	57
Figura 9. Planta regenerada a partir de microestacas, en fase de invernadero. ....	58
Figura 10. Incremento de peso a diferentes concentraciones de sacarosa .....	61
Figura 11. Incremento de longitud a los 30 días de siembra en diferentes niveles de sacarosa. ....	61
Figura 12. Número de hojas producidas a 30 de la siembra con varias concentraciones sacarosa .....	63

Figura 13.	Brotos formados al mes de la siembra en medio con distintas concentraciones de sacarosa. ....	63
Figura 14.	Incremento de peso de explantes expuestos al AAS por 30 días .....	70
Figura 15.	Incidencia del AAS en el aumento de longitud de <i>S. edule</i> a los 30 días de la siembra. ....	70
Figura 16.	Peso seco promedio de plantas sometidas a AAS por 30 días .....	71
Figura 17.	Número de hojas producidas con varios niveles de AAS. ....	71
Figura 18.	Brotos producidos a los 30 días de exposición al AAS. ....	72
Figura 19.	Brote adventicio producido en microestacas de <i>S. edule</i> expuestas a una concentración de $10^{-9}$ M de AAS .....	74
Figura 20.	Superficie adaxial de la lámina foliar expuesta a $10^{-9}$ M de AAS, se observan estomas normales de tipo anomocítico. ....	74
Figura 21.	Superficie adaxial de hoja de chayote vitrificada, obtenida de una planta expuesta a un nivel de $10^{-9}$ M de AAS. ....	75
Figura 22.	Superficie de la lámina foliar de <i>S. edule</i> regenerada de novo en un medio de cultivo con $10^{-9}$ M de AAS, con gran cantidad de tricomas multicelulares. ....	75
Figura 23.	Incremento de peso a diferentes temperaturas a los 30 días de siembra. ....	79
Figura 24.	Incremento de longitud a los 30 días de siembra en diferentes temperaturas. ....	79
Figura 25.	Número de hojas promedio producidas con la siembra a diferentes temperaturas. ....	80



Figura 26.	Brotos producidos en explantes expuestos a varias temperaturas. ....	80
Figura 27.	Medias generales de incremento de peso de los diferentes tratamientos .....	84
Figura 28.	Incremento promedio de longitud en diferentes tratamientos a los 30 días de la siembra. ....	84
Figura 29.	Promedio de hojas y brotes producidos en los diferentes tratamientos .....	85
Figura 30.	Incremento en peso por mes con interac- ciones de temperatura - sacarosa temperatura - AAS y testigo .....	89
Figura 31.	Incremento en longitud pro mes con interacciones de temperatura sacarosa y AAS. ....	89
Figura 32.	Número de hojas formadas de novo por mes en interacción de temperatura con AAS y sacarosa. ....	92
Figura 33.	Brotos producidos en un lapso de seis meses con las diferentes interacciones. ....	92
Figura 34.	Incremento de peso en diferentes tratamientos a los 30 días de la siembra .....	94
Figura 35.	Incremento en longitud de los trata- mientos a los 30 días de siembra .....	94
Figura 36.	Número de hojas promedio producidas en los distintos tratamientos a 30 días de la siembra. ....	94
Figura 37.	Promedio de brotes inducidos en los tratamientos al mes de la inoculación. ....	95
Figura 38.	Presencia de raíces en los diferentes tratamientos .....	95
Figura 39.	Longitud promedio de raíz por trata- miento y por mes. ....	95

## 1. INTRODUCCION

El chayote, *Sechium edule* Jacq. (Sw) originario de mesoamérica es una especie promisorio de importancia para Costa Rica, por ser un cultivo generador de divisas, fuente de alimento barato para las clases de bajos recursos económicos, ampliamente utilizado en la industria alimenticia, algunas partes de la planta se usan como forraje para animales, se emplea también como planta ornamental, y en medicina naturalista tiene diversos usos (diurético en la dieta de pacientes con afecciones del riñón).

Los trabajos a realizar en esta especie son de mucho interés, por ser este un cultivo de exportación no tradicional, del que dependen gran cantidad de pequeños agricultores y productores asociados en Cooperativas, localizadas principalmente en la zona de Orosi (provincia de Cartago).

En Costa Rica es posible que esta especie esté sufriendo un proceso de erosión genética ya que desde 1973 existe una rigurosa selección de pocos fenotipos de valor comercial para la exportación. Debido a que el fruto es vivíparo, la probabilidad de su conservación en bancos de semillas se reduce; por otra parte, su mantenimiento, en

colecciones de campo presenta problemas de ataque de patógenos, altos costos de mantenimiento, y adaptabilidad, lo que conlleva a la pérdida de introducciones que podrían ser empleadas en programas de mejora genética. Es de particular importancia el desarrollo de un programa de mejoramiento genético que posibilite la producción de tipos de mayor rendimiento, calidad y resistencia a patógenos, principalmente hongos. Para la ejecución de este tipo de programa se requiere contar con una amplia gama de genotipos para la selección de características deseables y con un método de micropropagación efectiva, que garantice la homogeneidad de las plantas producidas.

Por lo que se planteó el desarrollo de esta investigación que tuvo como objetivos:

1. Establecer el método de micropropagación de la especie.
  - 1.1. Determinar la combinación más apropiada de explante-medio de cultivo que garanticen una eficiente micropropagación.
  - 1.2. Efectuar ensayos que abarquen los diferentes estadios de desarrollo de la planta hasta la fase de campo.

2. Determinar cuáles son las condiciones óptimas de temperatura y factores limitantes del crecimiento y la combinación de las mismas que provocan crecimiento mínimo en el explante.
  - 2.1. Determinar la temperatura mínima de almacenamiento a la que se pueden someter microestacas de *S. edule* sin sufrir daños por frío.
  - 2.2. Investigar cuál es la concentración de sacarosa que adicionada al medio provoca inhibición del crecimiento.
  - 2.3. Determinar la concentración de ácido acetil salicílico (ASA) que resulta en un crecimiento mínimo del explante.
  - 2.4. Combinar el efecto de limitación de crecimiento a bajas temperaturas con los agentes que provocan estrés osmótico e interferencia metabólica.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Ubicación taxonómica y aspectos relevantes del chayote

El chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw), pertenece a la familia Cucurbitaceae. Se caracteriza por ser una especie herbácea, perenne, monoica, tipo enredadera, con un fruto carnoso, vivíparo que presenta una sola semilla (Flores, 1989).

El chayote es originario de México y de la parte norte de Centro América (Newstron, 1984), fue dispersado por los españoles a otras partes del mundo. Hoy día, se encuentra en el trópico y subtropical, abarcando regiones como las Islas del Caribe, parte de Brasil y Colombia en el continente americano (Flores, 1989). Se produce también en Malasia, Australia, Nueva Zelandia, India, Africa y en el sur de Europa y de los Estados Unidos.

Esta especie crece entre los 0 y los 2800 m de altura, pero se desarrolla mejor entre los 1000 y los 1200 m. Es un cultivo con requerimientos de humedad de un 80 a 85 %, con una precipitación que puede oscilar entre los 1500 y los 2000 mm. por año (Casseres, 1980).

Crece a temperaturas mínimas de 12°C y máximas de 28°C; pero las temperaturas óptimas se sitúan dentro de un rango de 20 a 25°C (Casseres, 1980).

El fruto, y las raíces tuberosas son consumidas por la población. Otras partes de la planta se utilizan en la alimentación de animales. También se señalan usos como planta medicinal y ornamental y en la industria alimenticia el fruto se emplea como "relleno" (Flores, 1989).

En Costa Rica se cultiva comercialmente en Paraíso de Cartago (Valle de Ujarrás, Orosi y Cachí) y en Santa Bárbara de Heredia.

Desde 1979 Costa Rica inició la exportación de chayote a gran escala, alcanzando en 1985, US\$2,118.000 (SEPSA, 1989), en los últimos años, la exportación siguió en ascenso llegando a los US\$2,850.000 en 1987, y los US\$3,680.000 en 1988 (Madriz, 1989\*). En 1989 se exportaron más de US\$5,173.255 (SEPSA, 1990).

---

\* Madriz, E. 1989. Datos de experimentación de chayote, recopilados por el Banco Central y la Dirección General de Estadística y Censos. Cartago. Coopechayote, R. L. (Comunicación personal).

## 2.2 Micropropagación

La propagación clonal en las plantas se basa en el concepto de totipotencia que está escrito en la teoría celular expuesta por Schleiden en 1838 y Schwann en 1839 y que fueron reforzadas y popularizadas por Virchow en 1858 (Gauthert, 1985).

En el año de 1878 Vochting realizó el primer trabajo que demostró la posibilidad de mantener viables pequeños segmentos de plantas. Posteriormente, Haberlandt discutió la posibilidad del cultivo de embriones a partir de células vegetativas, pero los primeros logros reales fueron alcanzados por White en 1934 y por Gautheret en 1938 (Gautheret, 1985).

Con base en estos esfuerzos iniciales y al aporte posterior de varios investigadores, han sido desarrolladas las técnicas de micropropagación de las principales especies comerciales de legumbres. Sin embargo, existen muchas plantas tropicales de alto valor económico que no cuentan todavía con una técnica de micropropagación apropiada, de bajo costo y de fácil acceso para los agricultores en la región (Rublúo, 1985). Por otra parte, el establecimiento de un protocolo de propagación es requisito indispensable para garantizar la multiplicación clonal del material conservado *in vitro* (Roca, 1985).

### 2.2.1 Micropropagación de cucurbitáceas

Handley y Chambliss (1979) tuvieron éxito en la obtención de plantas completas, a partir de yemas laterales de pepino (*Cucumis sativus* L.), sembradas en medios de Murashige y Skoog (MS) (1962) complementado con vitaminas, 3% de sacarosa y 0,1 mg/l de ácido naftaleno acético (ANA) y cinetina.

Barnes (1979), Barnes *et al* (1978) informaron la regeneración de plantas de sandía (*Citrullus lanatus* c.v. Charleston Gray) a partir de ápices de tallo sembrados en un medio MS (1962) complementado con 0,05 mg/l de ácido indol acético (AIA) y 1mg/l de cinetina. Cuando utilizaron como explantes estacas con un nudo, obtuvieron plantas con raíz.

Handley y Chambliss (1979) empleando yemas axilares de *Cucumis sativus* L. en un medio semi sólido, conteniendo sales de MS (1962) complementadas con vitaminas, sacarosa y 0,1 mg/l de cinetina, lograron transferir exitosamente plantas a suelo en el invernadero.

Wehner y Locy (1981) utilizando explantes de hipocótilo y cotiledón de 85 cultivares y líneas de pepino, sembrados en un medio MS (1962) complementado con vitaminas, 1 mg/l de 8-bencil aminopurina (BA) y 1 mg/l de



ANA y un 3% de sacarosa determinaron que no se formaron tallos a partir de segmentos de hipocótilo, mientras que 28 de las 85 líneas que emplearon tejido cotiledonar si produjeron tallos.

Somarribas, Sandoval y Müller (1990) trabajaron con ápices de chayote sembrados en un medio MS (1962), complementado con 100 mg/l de inositol, 2 mg/l de glicina, 0,5 mg/l de ácido nicotínico, 0,5 mg/l de piridoxina, 0,1 mg/l de tiamina y 0,1 mg/l de riboflavina. El tratamiento con 1 mg/l de ANA, 0,3 mg/l de BA y 0,2 mg/l de cinetina con 0,5 g/l de carbón activado produjo un desarrollo normal del tallo y hojas.

Los primeros trabajos con protoplastos (Jia, Fu y Lin, 1986) realizados en la familia cucurbitácea se efectuaron aislando protoplastos de cotiledón en seis cultivares de pepino. éstos se mantuvieron en división sostenida en un medio líquido DPD (Durant *et al*, 1973; citado por: Jia, Fu y Lin, 1986) suplementado con 0,5 mg/l de 2,4-D (Acido 2-4 diclorofenoxiacético) y 1 mg/l de cinetina. La frecuencia de división aumentó a los ocho días de cultivo, luego se produjo la regeneración de plantas en un medio M.S. (1962) complementado con 0,01 mg/l de 2,4-D, 1 mg/l de BA y 0,2 mg/l de AIA.

### 2.2.2 Cultivo de embriones.

El embrión representa el inicio de una nueva generación esporofítica, se origina de la célula huevo fecundada, que generalmente se encuentra localizada en el gametófito femenino. Los embriones pueden separarse fácilmente del tejido materno y ser cultivados *in vitro* (López, 1987). Existen dos categorías de embriones, los relativamente maduros y diferenciados y los embriones inmaduros en fase de división temprana o proembriones. El estímulo para el crecimiento continuo, puede deberse a respuestas de sus propias células o de células que rodean el endosperma (Raghavan y Srivástava, 1982).

El embrión requiere para su desarrollo, de una serie de nutrimentos especializados: aminoácidos, carbohidratos, purinas, pirimidinas, y en algunos casos hormonas, vitaminas y otros metabolitos. En embriones de dicotiledóneas, el estado de iniciación de los cotiledones, con la consecuente diferenciación interna, hacen que el embrión sea apto para su cultivo *in vitro*. La edad de siembra más apropiada para el cultivo de embriones *in vitro* varía de acuerdo a la especie (George y Sherrington, 1984; Raghavan y Srivastava, 1982).

Hanning, en 1904, sembró en condiciones asépticas, embriones relativamente maduros de tres especies de

*Raphanus* y de *Cochlearia* en un medio con sales minerales y azúcar, iniciando así la corriente de siembra de embriones que perdura hasta la actualidad. Por su parte Knudson, en 1922, hizo crecer en forma exitosa embriones de orquídeas sin hongo simbiótico (Gautheret, 1985).

Laibach en 1925, visualizó la aplicación del cultivo de embriones en la producción de plántulas viables, sobre todo en cruces donde los embriones son abortivos (Raghavan y Srivastava, 1982).

Los embriones maduros, requieren de un medio relativamente simple, constituido principalmente de sales minerales y sacarosa, pero existen una serie de compuestos que pueden modificar los patrones de crecimiento o incrementarlo: vitaminas (biotina, ácido nicotínico, ácido ascórbico, ácido pantoténico, piridoxina y tiamina), compuestos nitrogenados (aminoácidos), y un amplio rango de auxinas, giberelinas y citocininas. Además los factores físicos (temperatura, pH, radiación, intercambio de gases) influyen en el crecimiento embrionario (Raghavan y Srivastava, 1982). La interacción de estos factores con la edad del explante, puede establecer la pauta del éxito del cultivo de embriones de una especie determinada (Raghavan y Torrey, 1964)

### 2.2.3. Cultivo de embriones de cucurbitáceas

Se han realizado trabajos sobre rescate de embriones interespecíficos de híbridos estéril(inviavle) de *Cucumis* y de *Cucurbita*. El cruce entre *Cucurbita pepo* y *Cucurbita ecuadorensis* resultó en la producción de un híbrido estéril (inviavle) que fue rescatado y sembrado en un medio de Schoch y Sibi (1978) dando plantas fértiles como resultado (Dumas de Vaultx y Pitrat, 1980). Cruces interespecíficos de especies de *Cucumis*, se han realizado entre *C. zeyheri* y *C. metuliferus* (Custers, 1981), y entre *C. metuliferus* y *C. anguria* (Fassuolitis y Nelson, 1988), utilizando como medio básico el MS (1962) con diferentes combinaciones de auxinas, principalmente AIA y citocininas, en especial BA (6-bencil amino purina).

Rakoczy-Trojanowska y Malepszy (1989), afirmaron que obtuvieron regeneración de plantas a partir de embriones anormales derivados de híbridos F<sub>1</sub> y BC de *Cucurbita maxima* y *C. pepo*, la caulogénesis fue inducida en forma directa a partir de cotiledones en un medio básico MS (1962), carente de reguladores del crecimiento y que contenía 150 mg/l de edamina S, y 15 g/l de sacarosa.

### 2.3 Inducción de callo, regeneración y obtención de metabolitos secundarios

La regeneración de plantas a través de cultivo de callos se ha logrado por formación de brotes adventicios o por embriogénesis somática (Gautheret, 1985).

Se ha obtenido organogénesis *de novo* a partir de callos de *Cucumis melo*, tomando como explantes segmentos de cotiledón e hipocótilo; la producción de brotes dependió del genotipo y del medio de cultivo empleado (Bouabdallah y Branchard, 1986). Halder y Gadgil (1982) indujeron a la formación de callo en *C.melo* y en *C.sativus*, sembrando explantes de cotiledón e hipocótilo en un medio M.S. (1962), suplementado con ANA, agua de coco (15% v/v) o AIB con BA.

A través de tejidos de tipo sexual, se ha informado la inducción de callo *in vitro* a partir de tejidos de tipo sexual, específicamente ovarios y anteras; el mejor desarrollo se observó en medio M.S. (1962), conteniendo auxinas: AIA (2-4 mg/l) y 2,4-D (0,4 mg/l); citocininas como la cinetina (0.02-0,2 mg/l) y vitaminas (0,2 mg/l). Los ovarios mostraron mayor capacidad de formación de callo que las anteras; se detectaron anomalías cromosómicas, principalmente haploidía y aneuploidía (Dryanovska, 1985).

Handler y Gadgil (1982) estudiaron la morfogénesis de algunas cucurbitáceas empleando como fuente de inóculo, segmentos de cotiledón y de hipocótilo de *C. melo*, *C. sativus*, *Citrullus vulgaris*, *Momordica charantia* y *Luffa acutangula*. Como resultado determinaron que el proceso morfogénético fue lento y de baja frecuencia de regeneración, por lo que este modelo no es recomendable para la propagación de estas especies.

Wehner y Locy (1981) estudiaron explantes de cotiledón e hipocótilo de *C. sativus* y lograron la formación de tallos y raíces adventicias a partir de segmentos de cotiledón en 28 de las 85 líneas probadas; el medio de cultivo utilizado fue el MS (1962) con 1mg/l de ANA y de BA y 3% de sacarosa. Resultados similares fueron obtenidos por Kim, Chang, Hydeon y Lee (1988), con callos derivados de cotiledones de 10 cultivares de *C. sativus* L. sembrados en MS (1962) complementado con 2,4-D y BA, las plantas regeneradas fueron tetraploides.

El desarrollo de callos embriogénicos está influenciado por la fuente y la concentración de auxina empleados en el medio de cultivo, así como por factores endógenos, probablemente de tipo genético. Jelaska *et al*; (1985) realizaron un estudio con segmentos de hipocótilo de *Cucurbita pepo*, en un medio MS (1962) con suplementos

orgánicos y glucosa, en el que se agregaron auxinas (AIA), como resultado, obtuvieron la producción de callos embriogénicos.

En cultivos en suspensión de *C. melo*, se observó el efecto de la cinetina, que a bajas concentraciones (0,5 mg/l) actuó como promotor del metabolismo de ácidos nucleicos, en un medio de White (1954), complementado con agua de coco (10% v/v) y 0,5 mg/l de ANA (Vajranabaiah y Mehta, 1977).

Pandey y Gandgil (1984) informaron que la combinación de auxinas (ANA y AIB) y citocininas (cinetina y BA) incide sobre la proporción de ácidos insaturados producidos en cultivos de callo de *C. melo* y *C. sativus*, derivados de cotiledones.

#### **2.4 Conservación de germoplasma**

Withers (1987) señala que la conservación de la diversidad genética de las plantas está estrechamente relacionada con las diferentes etapas de la historia del mejoramiento genético. En el viejo mundo, la mayoría de los cultivos se diferenciaban poco de sus parientes silvestres; sin embargo, en el nuevo mundo, la agricultura se extendió y la diversidad genética fue dispersada entre

los países, permitiendo la introducción y utilización de gran diversidad de genotipos.

La última etapa involucra el uso de la tecnología *in vitro* y la ingeniería genética que posibilitan transferir genes aún en especies no relacionadas y a veces hasta incompatibles, esta tecnología ha ampliado el alcance del mejoramiento vegetal a horizontes impredecibles. Unidades celulares son objeto de manipulación genética (polen, protoplastos y suspensiones celulares) y las estructuras más organizadas (ápices, meristemos, embriones, etc) son la fuente de explantes para la obtención y multiplicación de los nuevos genotipos, que son evaluados en la producción agrícola *in vivo* (Withers, 1987).

El mecanismo tradicional más práctico y eficiente de conservación de germoplasma y el más utilizado sin duda, es el almacenamiento de semillas. Sin embargo, existen especies que presentan problemas para su conservación por esta vía, ya que presentan semillas recalcitrantes o intermedias. Por lo tanto, las técnicas de cultivo de tejidos se perfilan como una opción viable para su conservación *in vitro* (Rublío, 1985; IBPGR, 1983).

Los procedimientos de cultivo de tejidos se basan en la totipotencialidad de las células vegetales y en la



posibilidad de regeneración de plantas, a partir de células aisladas o de explantes.

La conservación de germoplasma *in vitro* está fundamentada en la reducción del metabolismo y de la tasa de división celular, tratando de incrementar la longevidad de los cultivos con cambios genéticos mínimos (IBPGR, 1985a). Lo anterior permite el establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro*, limitando el crecimiento a corto y mediano plazo, períodos menores de un año sin subcultivo, generalmente 3, 6 ó 9 meses (IBPGR, 1985b). Se debe limitar la frecuencia de subcultivo para evitar pérdidas de material por manejo en el laboratorio (Roca, 1985).

El conjunto de técnicas *in vitro* para reducir o minimizar la tasa de crecimiento del material vegetal, es la base de la implementación de dos tipos de bancos de genes: los bancos de genes activos *in vitro* (IVAG), que constan de los genes almacenados en cultivos mantenidos en crecimiento lento, existentes en la actualidad, y los bancos de genes base *in vitro* (IVBG), no existentes aún y que emplearán técnicas de conservación a largo plazo (crioconservación), (Withers y Williams, 1986).

Una característica importante del IVAG (Banco de Genes Activos *in vitro*) es que todo el material "fluye" a través de un proceso cíclico en el que los componentes son:

multiplicación y monitoreo, este último comprende una revisión de viabilidad, vigor, estabilidad genética y de sanidad (IBPGR, 1986).

Los sistemas de conservación utilizados a través de IVAG agrupan la desecación parcial del explante, uso de bajas temperaturas (Wescott, 1981b; Roca, 1985), inducción de estrés osmótico (Rublúo, 1985, Roca, Hidalgo y Alvarez, 1988), supresión de fuentes de carbono (Roca, 1985; Ochoa, 1985) disminución de presión parcial de oxígeno (Augereau, Courtis, y Petiard, 1986), la aplicación de inhibidores o retardadores del crecimiento (Withers, 1983; López, 1987) y la inmersión del material vegetal en una capa de aceite mineral (Caplin, 1959; Courtis y Petiard, 1986).

La especie a conservar debe contar con una metodología que garantice un elevado porcentaje de regeneración para asegurar una propagación efectiva.

En la actualidad, en los bancos de germoplasma *in vitro*, se encargan de preservar el genoma intacto a través del crecimiento limitado o de la crioconservación de estructuras organizadas (ápices, microestacas, meristemos, etc.) (Withers, 1987) Existe otro tipo de conservación que incluye la conservación de genes y de genomas. La preservación de genes consiste en el almacenamiento de

secuencias genéticas parciales o totales de un genoma (Peacock, 1984; citado por: IBPGR, 1986). Los genomas son formas que conservan más o menos en forma intacta y coordinada los sistemas de información contenida en las células o protoplastos, que no cuentan aún con un sistema de regeneración (Withers, 1984).

#### 2.4.1 Efecto de baja temperatura sobre los sistemas biológicos.

La temperatura controla el crecimiento y desarrollo, en forma global, tanto *in vivo* como *in vitro*, debido al efecto ejercido sobre la actividad metabólica y específicamente sobre la acción enzimática, por lo que este factor físico puede alterar eventos morfogénicos (Parkin y Kuo, 1989; Duncan y Widholm, 1987), e inducir la síntesis de ácidos grasos insaturados y de prolina como respuesta al estrés térmico (MacCarthy y Stumpf, 1980; Duncan y Widholm, 1987).

Diversos efectos del estrés causado por la incubación a temperaturas inferiores a la óptima, han sido mencionados en diferentes sistemas biológicos.

Cambios de temperatura de 25°C a 15°C influyeron en el peso seco y en el volumen de la pared celular en células de

*N. tabacum* L. y de *Glycine max*, en esta última especie afectó también el número de células producidas (MacCarthy y Stumpf, 1980a).

Se citan efectos nocivos sobre proteínas y enzimas. En plántulas de pepino, *Cucumis sativus* se determinó un descenso de la actividad de la catalasa (Parkin y Kuo, 1989) y un incremento de la actividad de la ACC (1-ácido carboxílico 1-aminociclopropano) sintetasa precursora del etileno, la actividad enzimática fue inducida por frío en células epidérmicas del fruto de pepino incubadas a 2.5°C durante cuatro días (Wang y Adams, 1982).

Las hipótesis existentes sobre la acción de las bajas temperaturas señalan el efecto sobre el grosor de la membrana lipídica, la inducción de la peroxidación de lípidos y la redistribución de calcio (Murata, 1983; Graham y Patterson, 1982; Parking y Kuo, 1989).

La temperatura se cita como un factor que incide no solo en el grado de respuesta morfogénica, sino también en la vía morfogénica a seguir (Duncan y Widholm, 1987).

En algunas especies sometidas a períodos fríos por periodos de 2 a 4 semanas, se pueden obtener respuestas morfogénicas positivas. Hilding y Welander (1976); Constantin (1981) al someter a bajas temperaturas pecíolos

de *Begonia x cheimata* y *Begonia x hiemalis*, determinaron que a temperaturas entre 15 y 18°C, se incrementó la respuesta morfogenética, en tanto que en *Begonia x hiemalis* se obtuvo una respuesta positiva a temperaturas inferiores a 15°C y superiores a los 9°C.

Callos de *S. tuberosum* derivados de protoplastos e incubados a 20°C, promovieron la regeneración de plantas en mayor grado que cuando se mantuvieron a temperaturas de 25°C (Lillo, 1989).

El descenso de la temperatura y el estrés hídrico son factores asociados con la acumulación de prolina en cultivo de tejidos y de células de plantas completas, (Duncan y Widholm, 1987).

En callos embriogénicos de *Zea mays* colocados a una temperatura de 19°C, se produjo de 2,1 a 2,5 veces la cantidad de prolina que en el callo testigo, aumentando así la tolerancia de los callos al frío (Duncan y Widholm, 1987).

Whithers, (1985) y Duncan y Widholm (1987) afirman que los ácidos grasos insaturados y la prolina tienen un efecto crioprotector, debido a que los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados ofrecen cierta flexibilidad a las membranas mitocondriales en plantas resistentes al frío; el

mecanismo de acción de la prolina aún no ha sido esclarecido (Duncan y Widholm, 1987).

El efecto de la temperatura sobre la síntesis de los ácidos grasos en plantas, es bien conocido. La mayoría de los trabajos realizados correlaciona el incremento de la producción de ácidos grasos insaturados con la incidencia de bajas temperaturas (MacCarthy y Stumpf, 1980b; Siebertz *et al*, 1978).

Cultivos celulares en suspensión de *Catharanthus roseus* G.Don., *Glycine max* L. Merr. y *Nicotiana tabacum* L. fueron incubadas con [<sup>14</sup>C] acetato, [<sup>14</sup>C] ácido oleico y [<sup>14</sup>C] ácido linoleico a cinco temperaturas entre 15 y 35°C. Las respuestas fueron específicas. En *N. tabacum* se acumuló el ácido linoleico y en *C. roseus* el ácido oleico (MacCarthy y Stumpf, 1980a).

#### **2.4.2 Aplicación de bajas temperaturas *in vitro* como método de conservación**

Esta técnica, ha sido la de mayor empleo en conservación *in vitro*, ya que permite someter el material a temperaturas inferiores al valor óptimo de crecimiento.

El primer banco de germoplasma *in vitro* fue establecido por Galzy en 1969. Este autor sometió a 9°C,

explantes de *Vitis rupestris*, conservando 800 cultivares con seis repeticiones cada una por año; en tan sólo 2 m<sup>2</sup>. Esta técnica ha sido usada en cultivos de importancia económica: *Ipomoea batatas*, *Phaseolus vulgaris* y *Solanum spp* (Cuadro 1). El Centro Internacional de la Papa en Perú (C.I.P.), mantiene un banco de *Solanum spp*. que cuenta con 8000 clones y combina bajas temperaturas e inhibidores de crecimiento (IBPGR, 1985a).

*Solanum tuberosum* L. y otros genotipos de papa, se mantienen por períodos de un año a temperaturas entre los 8 y los 12°C, en presencia de inhibidores (Alar-85, ABA o manitol) (Wescott, 1981b). La conservación de ápices de papa ha mostrado ser ventajosa en la reducción de intervalos de transferencia, además, el genotipo es poco alterado por las bajas temperaturas.

Introducciones de *Manihot esculenta* se almacenan por períodos similares a temperaturas más altas, 20°C (CIAT, 1987).

Estudios sobre un rango limitado de suspensiones celulares vegetales, sugieren que la temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25 y 30°C, pero este rango varía en las diferentes especies. Kato, Hashimoto y Soh, (1978) realizaron un estudio sobre el crecimiento de suspensiones celulares de tabaco en un rango de 17,5 a

**Cuadro 1. Ensayos de conservación utilizando bajas temperaturas.**

Referencias		Especies	Explante	Tratamientos
Galzy (1969)	800 cultivares	Vitis rupestris	Nudos	9°C (1 año)
Barlass y Skene (1983)	Varias especies	Vitis spp.	Tallos	9.5°C (1 año)
Mullin y Schelgel (1976)	Más de 50 cultivares	Fragaria spp.	Meristemas	4°C - oscuridad (6 años)
Lundergan y Janick (1979)	c.v Goden delicious	Malus spp.	Apices	12 meses
Westcott (1981b)		Solanum spp.	Nudos	6°C (12 meses)
CIP	6000 clones	Solanum spp. Ipomoea batatas Phaseolus spp.	Nudos Nudos Meristemas	15 - 18°C 26°C (luz) 15°C (oscuridad)
Marino y et. al. (1985)		Prunus spp.		14°C oscuridad
El-Gizarwy y Ford-Lloyd (1987)		Allium sativum	Estacas	1-3° (10 meses) 4°C+ MS 50% (16 meses)
Jullien (1983)		Asparagus officinalis	Células del mesofilo	4°C

37°C, a 28°C se presentó un incremento de biomasa y de la tasa de crecimiento .

La conservación a bajas temperaturas ha sido un sistema muy exitoso, en plantas de zonas templadas con especies tolerantes a rangos de temperaturas bajas; generalmente comprendidas entre los 0 y 10°C. No obstante, las especies tropicales son bastante susceptibles a temperaturas inferiores a 15°C, a las que generalmente se



producen daños irreparables en los tejidos (Withers, 1980; Roca, 1985). Temperaturas entre los 14 y los 18°C se consideran adecuadas para conservación *in vitro* de especies tropicales (George y Sherrington, 1984).

### 2.4.3 Empleo de la sacarosa en conservación

Sólo un número limitado de líneas celulares vegetales han sido reportadas como autotróficas, por lo que, la mayoría requieren de fuentes energéticas para la sobrevivencia (George y Sherrington, 1984; Thorpe, 1980).

La mayoría de los cultivos *in vitro* tienen la potencialidad de desarrollar un aparato fotosintético funcional, pero crecen en un sistema mixotrófico en el que el CO<sub>2</sub> fijado por la vía fotosintética contribuye al crecimiento (Neumann y Bender, 1987).

En 1934, White empleando segmentos de raíz de tomate examinó el modo de acción y el metabolismo de varios carbohidratos. Posteriormente, Gautheret en 1949 trabajando con tejidos de zanahoria encontró que la sacarosa era en comparación a la glucosa, la maltosa y la rafinosa la fuente del carbono más efectiva (Gautheret, 1985).

Concentraciones de 2 a 4% del disacárido sacarosa son empleados en forma rutinaria en la preparación de medios

para cultivo de tejidos y células. Este rango de concentraciones de sacarosa asegura el rápido crecimiento de callos, células en suspensión y explantes utilizados en micropropagación (Thorpe, 1985; George y Sherrington, 1984).

Altos niveles de sacarosa pueden ser usados para mantener cultivos en condiciones de dormancia por largos periodos. Este sistema se basa en el efecto osmótico ejercido por la alta concentración de sacarosa que actúa como crioprotector (Whiters, 1980; Thorpe; 1985; George y Sherrington, 1984).

La tasa de crecimiento de los tejidos vegetales se reduce al disminuir el potencial hídrico, por adición de azúcares. La inhibición del crecimiento ha sido usada en cultivo de tejidos para la selección de células resistentes al estrés hídrico y para el almacenamiento *in vitro* a mediano plazo (Love, Rhodes y Moyer, 1987)

Una serie de cambios fisiológicos complejos que se relacionan con la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, están involucrados en los siguientes eventos: la regulación de la dormancia (Takayama y Misawra, 1980); el número y tamaño de las células producidas (Sakuta, Takagi y Komamine, 1987); la producción de metabolitos secundarios (Matsumoto *et al*, 1973); en los procesos de diferenciación

del xilema (Aloni, 1980; Thorpe, 1985) y en la síntesis de la clorofila (Dalton y Perl, 1983; Gross y Richter, 1982).

#### 2.4.4 Metabolismo de la sacarosa

La sacarosa es el disacárido comúnmente más empleado por las plantas como fuente energética y los monosacáridos constituyentes de la molécula son considerados como las fuentes de energía adecuadas para asegurar el crecimiento de tejidos, callos y suspensiones celulares *in vitro* (Thorpe, 1985).

Con la esterilización de los medios de cultivo se produce hidrólisis parcial de la sacarosa, lo que conlleva a un incremento de los potenciales osmóticos (Dunwell y Thurling, 1985).

El potencial hídrico y el potencial de los compuestos disueltos de tejidos de tabaco transferidos de medios con un 3% de sacarosa, se tornaron más negativos a las 24, 48 y 72 horas después de la siembra, no hubo correlación entre el ajuste osmótico y la tasa de respiración por lo que se sugiere que el ajuste fue pasivo (Hammersley-Straw y Thorpe, 1988)

Existen tres sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de la sacarosa: fosfato sintetasa, sacarosa

sintetasa e invertasa soluble. En cultivos de células y callos la invertasa es liberada al medio, donde inicia la hidrólisis extracelular de la sacarosa, sin embargo, en la mayoría de los tejidos examinados se ha demostrado que la asimilación de la sacarosa se puede dar sin hidrólisis previa, ya en el interior de las células es degradada por la invertasa en mayor proporción y por la sacarosa fosfato sintetasa, la glucosa y la fructosa pueden entonces ser metabolizadas a través de la glucólisis o seguir la vía de las pentosas (Thorpe, 1985).

Variaciones en el suministro de sacarosa pueden provocar alteraciones metabólicas que conducen a la acumulación de polisacáridos. Zonas promeristemáticas de callos de tabaco, sometidas a altas concentraciones de sacarosa entre 10 y 15%, provocaron acumulación de almidón en el tejido parenquimático (Hammersley-Straw y Thorpe, 1988). En segmentos de coleóptilo de *Avena sativa* L. cv. Victory sometidos a la adición de 30mM de sacarosa se produjo un incremento de la cantidad de polisacáridos de la pared celular (Inohue, Yamamoto y Masuda, 1987).

La adaptación a diferentes regímenes de carbohidratos pueden producir cambios en la actividad enzimática de la sacarosa sintetasa y de la invertasa (Clausen, Loveys y Hawker; 1986). Al no agregar azúcar al medio de cultivo

del xilema (Aloni, 1980; Thorpe, 1985) y en la síntesis de la clorofila (Dalton y Perl, 1983; Gross y Richter, 1982).

#### 2.4.4 Metabolismo de la sacarosa

La sacarosa es el disacárido comúnmente más empleado por las plantas como fuente energética y los monosacáridos constituyentes de la molécula son considerados como las fuentes de energía adecuadas para asegurar el crecimiento de tejidos, callos y suspensiones celulares *in vitro* (Thorpe, 1985).

Con la esterilización de los medios de cultivo se produce hidrólisis parcial de la sacarosa, lo que conlleva a un incremento de los potenciales osmóticos (Dunwell y Thurling, 1985).

El potencial hídrico y el potencial de los compuestos disueltos de tejidos de tabaco transferidos de medios con un 3% de sacarosa, se tornaron más negativos a las 24, 48 y 72 horas después de la siembra, no hubo correlación entre el ajuste osmótico y la tasa de respiración por lo que se sugiere que el ajuste fue pasivo (Hammersley-Straw y Thorpe, 1988)

Existen tres sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de la sacarosa: fosfato sintetasa, sacarosa

Los azúcares se han identificado como directamente involucrados en la diferenciación de elementos vasculares del xilema y del floema. En cultivos celulares la sacarosa es requerida en adición al AIA para la diferenciación de elementos conductores (George y Sherrington, 1984). En general, se afirma que la forma de carbono al igual que la de nitrógeno puede influir en la diferenciación cuantitativamente. En ensayos realizados con *Helianthus tuberosus* se determinó que al sustituir la sacarosa por maltosa disminuyó el número de elementos traqueales formados en un 60% (Minocha y Halperin, 1974; citado por: Thorpe, 1985).

Adicionalmente, se ha observado un efecto cualitativo sobre la formación del patrón de la pared celular del xilema, concentraciones de 1,5 a 3,5% favorecieron la formación de elementos escalariformes y reticulados (Thorpe, 1985). La sacarosa afectó en forma proporcional la cantidad de calosa depositada sobre las placas cribosas, concentraciones mayores que las empleadas para la formación de xilema fueron usadas para la inducción de procesos de formación del floema, en callos de *Daucus carota* L., *Syringa vulgaris* L., *Glycine max* L> (Merr)., *Helianthus annus* L., *Hibiscus cannabicus* L. y *Pisum sativum* L. (Aloni, 1980).

La concentración de sacarosa influye también en otros procesos morfológicos. Un incremento a 90g/l de sacarosa produjo inhibición de la formación de escamas foliares en *Lillium* (Takayama y Misawa, 1980). Niveles de 10, 12 y 15% de sacarosa inhibieron todos los estadios de caulogénesis de *N. tabacum* provocando una reducción de las zonas de división celular preferencial, dando origen a la desorganización de meristemoides (Hammersley-Straw y Thorpe, 1988). En *N. plumbaginifolia*, altas concentraciones de sacarosa inhibieron la inducción de tallo (Lillo, 1989). En protoplastos derivados de callo se promovió la formación de tallo al disminuir la concentración de sacarosa en un rango de 3 a 15mM (Lillo, 1989). Cultivo de tallos de *Rosa* "Blaze" mejorada mostraron raíces adventicias que aumentaron en tamaño (204.5mM de sacarosa); este efecto no pudo ser reproducido por agentes osmóticos como el manitol y el MADG (3-o-metil  $\alpha$ -D glucopiranososa) por lo que se relacionó positivamente esta respuesta con el metabolismo de la sacarosa más que con su efecto osmótico (Hyndman, Hasegawa y Bressan, 1982).

El porcentaje de sacarosa tuvo un efecto significativo sobre la organogénesis de raíz y tallo y en la microtuberización de dos especies de *Dioscorea*, siendo el 4% y el 2% de sacarosa óptimo para *D. bulbifera* y *D. alata*, respectivamente (Mantell y Hugo, 1989).

#### **2.4.6 Incidencia de la sacarosa en la síntesis de clorofila**

Existen numerosos informes sobre los efectos inhibitorios de los azúcares exógenos sobre la formación de la clorofila y la fotosíntesis en cultivo de tejidos vegetales (Gross y Richter, 1982).

La formación de clorofila se ve afectada tanto por la concentración como por el tipo de carbohidrato empleado (Dalton, 1980b). *Asparagus officinalis* presentó 15 veces más contenido de clorofila cuando se agregó lactosa en lugar de sacarosa (Dalton, 1980a; Dalton y Perl, 1983).

#### **2.4.7 Inducción de la producción de metabolitos secundarios**

El metabolismo secundario de las plantas superiores está fuertemente influenciado por factores ambientales. En cultivos en suspensión, los reguladores del crecimiento y los factores nutritivos afectan, no solo el crecimiento sino también la producción de metabolitos secundarios. Grandes cantidades de algunos agentes osmóticos, comunmente usados, son absorbidos en forma diferencial y tienen influencia en la concentración de prolina y en otros aminoácidos libres en plantas sometidas a estrés (Cress y Johnson, 1987).



La sacarosa es un factor nutricional de cultivo de tejidos que tiene significancia en la síntesis y metabolismo de metabolitos secundarios. Concentraciones superiores al 2% incrementan la producción de diferentes compuestos, probablemente debido al aumento en la tasa de síntesis de compuestos propios del crecimiento (Bohm, 1980).

En células sometidas a estrés osmótico se produce un aumento de proteínas solubles, para asegurar una actividad metabólica normal bajo las condiciones de estrés. El incremento en la síntesis de prolina se ha correlacionado además, con la tolerancia al frío en callos de *Zea mays* L. (Sala, Cella y Rollo, 1979; Duncan y Widholm, 1987).

Sin embargo, los niveles de prolina libre disminuyen, debido a que este aminoácido se asocia con grupos hidrofóbicos de proteínas aumentando así su solubilidad (Pritchard, Grout y Short, 1986). Pequeñas alteraciones en el estrés osmótico parecen causar un alto reciclaje de los aminoácidos (Brown, Leung y Thorpe, 1987). Algunos trabajos revelan que la cantidad de prolina producida depende del grado de estrés hídrico, como se observó en los depósitos de aminoácidos y específicamente de prolina en *Hilaria jamesii* y en *Atriplex canescens* (Cress y Johnson, 1987), en callos de *Brassica napus* L. cv. Westar la

acumulación de prolina fue muy baja en ausencia de estrés, pero al adicionar al medio NaCl o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o manitol la prolina se incrementó en un rango de 390 a 520 uM/g/peso seco (Chandler y Thorpe, 1987).

Altas concentraciones de sacarosa incrementaron la síntesis de alcaloides indol en *Catharantus roseus* (Zenk *et al*, 1977), inhibieron la formación de ubiquinona en cultivos en suspensión de tabaco (Sakuta, Takagi y Komamine, 1987); y produjeron la formación de antocianinas en cultivos en suspensión de zanahoria y *Populus* (Matsumoto *et al*, 1973). Concentraciones de 88 mM de sacarosa incidieron en la acumulación de betacianina en cultivos en suspensión de *Phytolacca americana* (Sakuta, Takagi y Komamine, 1987).

**Cuadro 2. Algunos trabajos realizados con inductores de estrés osmótico.**

Referencia	Especies	Explante	Tratamientos
Westcott (1981a) meses	<i>Solanum</i> spp.	Nudos	SACAROSA; 3 A 8% 18
Rubluo y Kartha (1984)	<i>Phaseolus</i> spp.	Apices	SACAROSA; 5% Combinó Manitol
Roca, Hidalgo y Alvarez, (1982)	<i>Manihot</i> spp.	Apices	1% sacarosa 1,3% sorbitol 8-10°C (10-12 meses)

#### 2.4.8 Inhibidores o retardadores del crecimiento

Se puede lograr una reducción de crecimiento *in vitro* añadiendo inhibidores al medio; estas sustancias inducen dormancia, disminuyen el metabolismo celular o previenen la división celular (Rublúo, 1985; Ochoa, 1985).

El ácido absícico (ABA) se aplicó a ocho cultivares de papa, a diferentes concentraciones, provocando un efecto de dormancia; el tratamiento fue efectivo por un lapso de seis a doce meses (Westcott, 1981b). Roca y colaboradores (1983) señalaron efectos nocivos del ABA a concentraciones superiores de 2,5 mg/l.

Otros inhibidores metabólicos aplicados constituyen el fosphán (producto comercial enanizante), la hidrazida nálica y la diaminazida junto con el ácido acetil salicílico (AAS), este último, parece interferir en el metabolismo del etileno e incidir en la inhibición de las auxinas (Whiters, 1983; Ochoa, 1985; Leslie y Romani, 1988; López, 1987).

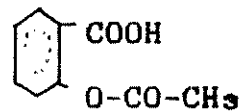
#### 2.4.9 Aplicación del ácido acetil salicílico (AAS)

El ácido acetil salicílico, se encuentra distribuido en forma natural en muchas plantas, pero se conoció en *Spiraea*, por lo que se le llamó aspirina (Ben-

Tal y Cleland, 1982). Gerhardt en 1853 lo sintetizó por primera vez y Dresser en 1889 lo introdujo en la medicina, desde entonces ha sido ampliamente usado en humanos y animales.

El AAS y los salicilatos en forma general son compuestos de tipo fenólico (ésteres del ácido salicílico). El AAS resulta de la acetilación del ácido salicílico, componente de la aspirina (López, 1987).

La estructura química del compuesto es la siguiente:



AAS (ácido acetil salicílico)

Presenta un pK de 3,5 un peso molecular de 180,8 y un punto de fusión de 137°C.

El efecto de los fenoles sobre los procesos de crecimiento pueden ser promotores, inhibidores o inactivos. El AAS ha mostrado su influencia en una amplia gama de procesos biológicos. Existen varios trabajos que demuestran la injerencia del AAS y del ácido salicílico (AS) en la inducción floral de varias especies del género *Lemna* (Ben-Tal y Cleland, 1982; Kahiara, Watanabe y

Takimoto, 1981; Oota, 1975) y en *Wolffia microscopica* (Khurana, Maheshwari, 1983). Además se cita el efecto de los salicilatos en la modificación de movimientos escotonásticos y fotonásticos en *Cassia* (Saedi, Gaillochot, Bonmort y Roblin, 1984). Otra serie de trabajos demuestra la inducción de resistencia contra infecciones virales (Pennazio, Roggero, y Lenzi, 1983), fúngicas (Milla y Wood, 1984), bacteriales (Saint-Pierre, Mivilley Dion, 1984); se ha relacionado la resistencia adquirida con la posible inducción de síntesis de proteínas relacionadas a la patogénesis (Pennazio, Roggero y Lenzi, 1983). Por otra parte, los salicilatos pueden alterar la permeabilidad de la membrana celular, probablemente por depolarización (Marci, Vianello y Pennazio, 1986). Se informa la influencia de estos compuestos sobre la reducción de la transpiración, y el cierre estomático en *Phaseolus* (Larqué-Saavedra, 1979). Dos efectos interesantes y contrapuestos son los que le adjudican al AAS la inhibición del crecimiento de yemas axilares y la promoción de la tuberización *in vitro* de *Solanum cardiophyllum* (López, 1987). Lee y Skoog (1985) probaron que el AAS y otros derivados de los ácidos: benzoico, fenil acético y fenil propanoico, inciden en la formación de brotes en callos de tabaco.

Las respuestas morfogénicas inducidas por el AAS, se han atribuido a complejas interacciones de estos compuestos en la modulación ya sea de la síntesis de AIA o de su inactivación, fenoles aplicados en forma exógena pueden modificar la respuesta a los reguladores del crecimiento. Lee y Skoog, (1965) observaron la formación de brotes en callos de tabaco expuestos a AIA y cinetina; estos autores concluyeron que el compuesto acelera la degradación del AIA, consecuentemente, una baja concentración de auxinas y una alta concentración de citocininas favoreció la formación de brotes.

## 2.5 Estabilidad genética de los sistemas *in vitro*

Para una conservación de la variabilidad genética en forma adecuada, se requiere que la inestabilidad del material sea mantenida a límites manejables. Existen pocos datos sobre la estabilidad genética de algunos cultivos sometidos a crecimiento lento, en tanto que, la criopreservación de meristemas provee "mayor seguridad" contra la inestabilidad genética (IBPGR, 1985a; Simpson y Withers, 1986). La información de la variación de cultivos *in vitro* es fragmentaria, aún no existe un método de control de la variación somaclonal en cultivos en conservación (Scowcroft, 1984).

Existe evidencia de que algún grado de inestabilidad genética se produce en semillas y material vegetal almacenado (IBPGR, 1985b).

Muchos trabajos se refieren a los tipos de variaciones que ocurren en algunos sistemas de propagación y conservación *in vitro* (Gautheret, 1985; Simpson y Withers, 1986). Sin embargo, estudios serios sobre la estabilidad genética de muchos cultivos y especialmente en cultivos tropicales, *in vitro* son incompletos (IBPGR, 1985a).

Las variaciones relacionadas con colonias de células fueron descritas por primera vez en 1942 por Gautheret (Gautheret, 1985). En los años 50 se produjeron gran número de trabajos que describían la variabilidad producida por el cultivo de callos (Gautheret, 1985). Posteriormente, se ha informado de variabilidad en suspensiones líquidas, cultivo de protoplastos, cultivo de anteras, tallos adventicios, embriones somáticos, plantas regeneradas *in vitro*; así como en semillas y propágulos vegetativos (IBPGR, 1985a; IBPGR, 1985b; Withers y Williams, 1986; Simpson y Withers, 1986).

La mayor incidencia de variabilidad se presenta en los sistemas de células, no organizados y éstos tienden a incrementarse con el tiempo en cultivos de protoplastos, suspensiones celulares y callos (IBPGR, 1985a; IBPGR,

1985b). Se ha especulado mucho sobre la variabilidad genética *in vitro*, sin tomar en cuenta que la variación puede tener diversos orígenes de orden genético, epigenético o fisiológico. La variación según parece es el resultado de la interacción de factores exógenos (físicos y químicos) del medio con las características genotípicas y el nivel de ploidía del explante (IBPGR, 1985a; Withers y Williams, 1986).

Como consecuencia de la inestabilidad pueden producirse variaciones en la estructura cromosómica; en el nivel de ploidía; y en las características morfológicas y bioquímicas; cambios en los nucleótidos en genomas nucleares y citoplasmáticos (Scowcroft, 1984).

A través de algunos análisis genéticos, se ha demostrado que las variantes somaclonales pueden ser de herencia simple o poligénica; recesivos o dominantes y muchos variantes son genéticamente inestables (IBPGR, 1985a).

Cualquier sistema de conservación *in vitro* puede presentar un número de estados en los cuales las variantes se producen (IBPGR, 1985a). Es muy importante en el manejo de estos recursos medir y caracterizar la variación producida (Holden y Williams, 1984).



## 2.6 Técnicas de evaluación utilizadas en conservación

La descripción morfológica y agronómica ha sido la herramienta más empleada en forma tradicional en los bancos de germoplasma. Aunque la descripción fenotípica es valiosa y ampliamente usada, los datos morfológicos son difíciles de comprender en términos de patrones de variación debido a que la mayoría de los caracteres de interés son de herencia poligénica y resultan de la interacción genotipo versus ambiente (Simpson y Withers, 1986).

Existe una serie de métodos bioquímicos que pueden ayudar a la distinción de genotipos; técnicas cromatográficas (separación de flavonoles o terpenoides, y antocianinas); pruebas de ácidos nucleicos; análisis de ADN de restricción, fijación isoelectrica y análisis de isoenzimas (IBPGR, 1985a)

Para estimar el nivel de diversidad genética dentro y entre introducciones, así como los cambios producidos durante el almacenamiento es recomendable el empleo de electroforesis de isoenzimas (Gottlieb, 1977; Simpson y Withers, 1986).

### 3. MATERIALES Y METODOS

Esta investigación se realizó en la Unidad de Biotecnología del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales del CATIE, con sede en Turrialba.

#### 3.1 Micropropagación

##### 3.1.1 Selección de explantes y desinfección

Los explantes empleados en la realización de los ensayos de micropropagación fueron: yemas axilares y apicales, microestacas, pecíolos, hojas, meristemos y embriones; se extrajeron de plantas de campo o en su defecto, de plantas producto de la siembra de los frutos en el invernadero. Los embriones sexuales y explantes extraídos de estos se obtuvieron de frutos relativamente maduros. El suelo empleado para la siembra en el invernadero fue tratado con Casafold (25g/l) y Agry-micin 500 (2,5g/l) antes de la siembra de los frutos. Las plantas se fumigaron cada tres semanas con Agry-micin 100.

En las pruebas de desinfección de los explantes se lavó el material con detergente, se colocó por varias horas en agua corriente, y se sometió a los diferentes tratamientos. En los casos en que se utilizó hipoclorito de sodio o de calcio, se agregaron tres gotas de Tween-20,

a un volumen aproximado de 500 ml de la solución de hipoclorito y agua. Posteriormente, se procedió a lavar los explantes tres veces consecutivas con agua estéril en la cámara de flujo laminar.

Se probaron diversos métodos para controlar la contaminación, incluyendo inmersión en hipoclorito de calcio (4, 5, 6% p/v) durante 10 minutos y en hipoclorito de sodio (10, 20, 30, 40 y 50% v/v) desde 5 hasta 20 minutos.

Se realizaron pruebas agregando los siguientes antibióticos y un fungicida al medio de cultivo, con la finalidad de disminuir el porcentaje de contaminación en el medio de cultivo M.S. (1962): Estreptomicina: 100 mg/l, 300 mg/l y 400 mg/l; Terramicina: 100 mg/l, 300 mg/l y 400 mg/l; Gentamicina: 40 mg/l y 80 mg/l, y combinaciones de: Estreptomicina-Terramicina: 100 mg/l -100 mg/l; 200 mg/l-200 mg/l. Además se aplicó el fungicida Benlate: -100mg/l;y Benlate-Gentamicina:-100 mg/l-40 mg/l y 100 mg/l-80 mg/l. La Estreptomicina y la Terramicina se filtraron y se dispensaron en el medio de cultivo en la cámara de flujo laminar , la Gentamicina y el Benlate fueron autoclavados con el medio de cultivo.

Los medios de cultivo se autoclavaron durante 20 minutos a 121°C (1,1 Kg/cm<sup>2</sup>), posteriormente los explantes

se sembraron en los diferentes medios de cultivo (Cuadro 3). Se colocaron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas y una intensidad lumínica de 2000 lux, a una temperatura controlada de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante el día y de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante la noche.

Se procedió a estudiar las respuestas morfogénicas producidas en los medios de cultivo empleados (Cuadro 3). Estos medios se caracterizaron por contener diferentes tipos y concentraciones de auxinas y citocininas, así como con combinaciones de auxinas y citocininas o por carecer de reguladores del crecimiento (Cuadro 3).

Cuadro 3. Descripción de los medios de cultivo.

Medio de cultivo	Clave
MS + ácido nicotínico (0,5 mg/l) + Piridoxina (0,5 mg/l) + Tiamina - H-Cl (0,1 mg/l) + Inositol (100 mg/l) C.H. (200 mg/l) + Sacarosa (30 g/l) + Gel rite (1,5 g/l)	1 MSc
MSc + BA (0,5 mg/l)	2
MSc + BA (1 mg/l)	3
MSc + BA (1,5 mg/l)	4
MSc + BA (2 mg/l)	5
MSc + FNA (0,1 mg/l)	6
MSc + FNA (0,1 mg/l) + BA (0,5 mg/l)	7
MSc + FNA (0,1 mg/l) + BA (1 mg/l)	8
MSc + FNA (0,1 mg/l) + BA (1,5 mg/l)	9
MSc + FNA (0,1 mg/l) + BA (2 mg/l)	10
MS + Inositol (200 mg/l) + ácido nicotínico (1 mg/l) + Tiamina (1 mg/l) + C.H (200 mg/l) + Glutamina (200 mg/l) + Glicina (4 mg/l) + Sacarosa (40 g/l) + G.R.	E11
MSc + AIA (0,03 mg/l) BA (0,5 mg/l) + G.R.	12
MSc + FNA (0,1 mg/l) + BA (3 mg/l) + Sacarosa (40 g/l) + G.R.	13
MS (50 %) + C.H. (1 g/l) + A.C. (10 % v/v) + Sacarosa (30 g/l)	BI4 6 14
MSc + BA (0,3 mg/l) + ZIP (0,2 mg/l)	15
MS (50 %)	16
MSc + 2,4 - D (0,3 mg/l)	17
Medio CIAT MS + Tiamina - HCl (100 mg/l) + Inositol (100 mg/l) + BA (0,04 mg/l) + GAB (0,05 mg/l) + FNA (0,02 mg/l) + Sacarosa (20 g/l) + Agar (9 g/l)	18 [4E, (CIAT)]

MS= Sales de Murashige y Skoog (1962)  
 C.H.= Caseína hidrolizada  
 B.A.= Bencil 6-amino purina  
 FNA= Acido Naftaleno Acético  
 AIA= Acido Indol Acético  
 2,4-D= Acido 2,4 diclorofenoxiacético  
 GAB= Acido giberélico  
 A.C.= Agua de coco  
 ZIP= N6 - 2-isopentil) adenina  
 G.R.= Gel-Rite

### 3.1.2 Crecimiento y aclimatación

Una vez determinada la combinación adecuada de los elementos del medio de cultivo y el tipo de explante apropiado para la micropropagación (Cuadros 3 y 4) se procedió a estudiar las diferentes fases de crecimiento. La inducción de raíces se promovió empleando el medio MS (1962) modificado, diluido al 50%, la inoculación se efectuó en frascos Gerber. La aclimatación se llevó a cabo en el cuarto de crecimiento, con plantas que presentaban sistema radical bien desarrollado; las plantas se sembraron en macetas en la proporción 1:1 de arena y tierra; se cubrieron con bolsas plásticas las que se abrieron gradualmente, haciendo incisiones en el plástico cada dos días. Estas plantas fueron rociadas días alternos con sales de MS (1962) diluidas al 50%. Posteriormente, en un lapso de 4 a 7 semanas, según el estado de las plantas, éstas se trasladaron al invernadero y finalmente, en un periodo de 3 a 5 semanas se llevaron al campo.

### 3.2 Conservación de germoplasma

El material vegetal para trabajar en las pruebas de conservación de germoplasma se obtuvo de la siembra de embriones sexuales extraídos de frutos. Los frutos fueron lavados con detergente y agua, luego se partieron y se

extrajo la semilla. Las semillas fueron sometidas a una desinfección con hipoclorito de calcio al 4% y tres gotas de Tween-20, por 10 minutos, se lavaron tres veces con agua estéril. Los embriones con un segmento de cotiledón fueron sembrados en un medio MSc (1) o en el medio E11, a las 3 o 4 semanas de la siembra se extrajeron los explantes para la realización del ensayo de conservación.

La unidad experimental consistió de microestacas de aproximadamente 5mm de longitud, tomadas de las plantas regeneradas *in vitro*.

### 3.2.1 Selección de variables

Esta primera fase del ensayo se realizó con la finalidad de seleccionar la temperatura, así como la concentración de AAS y de sacarosa a la cual los explantes tuvieron crecimiento mínimo, al mes de la siembra, y que además no produjeron efectos nocivos en las plantas.

Las microestacas de *Sechium edule* fueron sembradas en viales de 40 ml de capacidad, conteniendo medio M.S. (1962) semisólido, complementado con ácido nicotínico (0,5 mg/l), piridoxina (0,5 mg/l), tiamina-HCl (0,1 mg/l) e inositol (100 mg/l) y con 200 mg/l de caseína hidrolizada y 3% de sacarosa (excepto en el tratamiento que evalúa diferentes porcentajes de sacarosa). Los

tratamientos empleados incluyeron temperaturas de: 16°C, 18°C, 20°C, 22°C y 25±2°C; diferentes concentraciones de AAS (Casa Sigma): 0M, 10<sup>-3</sup>M, 10<sup>-6</sup>M y 10<sup>-9</sup>M y medio de cultivo con distintas concentraciones de sacarosa: 0, 3, 4, 5, 6, 7 y 8%.

Las características evaluadas en el material vegetal incluyeron la medición del incremento en la longitud (mm), incremento en el peso (mg), número de brotes y hojas producidas, peso seco (mg) y aspecto general de las plantas.

### **3.2.2 Efecto de la temperatura versus AAS y sacarosa**

Esta segunda etapa del ensayo de conservación *in vitro* se efectuó una vez que se seleccionaron la temperatura (16°C), concentración de AAS (10<sup>-3</sup>M) y contenido adecuado de sacarosa (6%), que inhibieron el crecimiento de los explantes. Se probó el efecto de la interacción de un factor físico (temperatura) combinado con el estrés osmótico (sacarosa) o con interferencia metabólica (AAS). El tratamiento testigo consistió en la siembra de explantes en un medio de cultivo #1, conteniendo 30 g/l de sacarosa y 0M de AAS, este tratamiento se incubó en un cuarto de crecimiento a 25±2°C.



Las microestacas permanecieron en los diferentes tratamientos por un período de seis meses en incubadoras Percival modelo 1-35LL. Se realizaron muestreos aleatorios cada mes, que constaron de la evaluación de 20 repeticiones cada uno. Se tomaron datos sobre el incremento en la longitud (mm), incremento en peso (mg), número de brotes y hojas producidas, peso seco (mg), aspecto general de las plantas y sobrevivencia. Se estudiaron los efectos morfológicos producidos por las diferentes interacciones, con este propósito se procesaron explantes mensualmente y se efectuó el estudio histológico sobre microscopía electrónica de barrido.

### **3.2.3 Diseño experimental**

El diseño experimental utilizado fue un irrestricto al azar, con arreglo factorial 2 x 2, para la determinación de la temperatura, concentración de AAS y sacarosa que provocan la inhibición de crecimiento del explante.

Se realizaron los análisis de varianza respectivos y se efectuaron pruebas de Duncan para los diferentes tratamientos y sus interacciones.

El modelo estadístico usado para determinar el crecimiento de las microestacas sometidas a los distintos tratamientos fue el siguiente:

$$Y_{1j} = \mu + \sigma_1 + \epsilon_{1j}$$

Donde:

$Y_{1j}$  es el incremento en peso (mg) o en longitud (mm)

$\mu$  es la media general

$\sigma_1$  es el efecto del tratamiento

$\epsilon_{1j}$  es el error experimental

En la segunda fase del ensayo se empleó un nivel seleccionado de cada factor. Se combinó el factor físico con la concentración de AAS y de sacarosa. Por lo tanto, el modelo estadístico empleado fue:

$$Y_{1j} = \mu + \sigma_{11} \cdot \sigma_{12} + \epsilon_{1j}$$

$$Y_{1j} = \mu + \sigma_{11} \cdot \sigma_{13} + \epsilon_{1j}$$

Donde  $\sigma_{14}$  corresponde al efecto de la temperatura

$\sigma_{12}$  es el efecto del estrés osmótico

$\sigma_{13}$  es el efecto de la concentración de AAS

$\sigma_{11} \cdot T_{12}$  y  $\sigma_{11} \cdot T_{13}$  corresponde al efecto de las interacciones en cada caso

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Micropropagación

#### 4.1.1 Control de la contaminación

El método más efectivo de desinfección consistió en lavar el material vegetal con un detergente comercial (Axion o Brisol), después de someterlo a un lavado con agua corriente por varias horas, posteriormente se colocó durante diez minutos en una solución de hipoclorito de calcio al 4%(p/v) con tres gotas de Tween-20 y se lavó tres veces consecutivas con agua estéril. El empleo de hipoclorito de calcio, a concentraciones mayores del 4%(p/v) o un tiempo de exposición mayor de diez minutos así como la aplicación de hipoclorito de sodio, provocó una pérdida de color en los explantes, éstos se tornaron blancos, la tasa de sobrevivencia fue muy baja y a los pocos días los tejidos se necrosaron y murieron.

Respecto a la desinfección de los frutos, para la siembra de embriones sexuales, resultó efectivo el lavado de la baya con detergente comercial (Axion o Brisol). La desinfección de los embriones en hipoclorito de calcio al 4%(p/v), con tres gotas de Tween-20 por diez minutos y el

lavado por tres veces consecutivas con agua estéril en la cámara de flujo laminar.

Los antibióticos y el fungicida adicionados a los medios de cultivo utilizados para el establecimiento aséptico no mostraron los efectos esperados. De los tratamientos probados, los únicos que disminuyeron el índice de contaminación fueron los que contenían gentamicina y/o benlate. El menor porcentaje de contaminación fue de un 33,3 %, éste se observó en el medio de cultivo que contenía 80 mg/l de gentamicina. El Benlate en concentraciones de 100 mg/l en combinación con 80 mg/l de gentamicina mostró una tasa de contaminación del 38.46%. El nivel de contaminación aumentó a un 46.15% en el medio de cultivo que contenía solamente Benlate, y fue de un 75% en tratamientos en los que se aplicó gentamicina en menor cantidad (40 mg/l) sola o combinada con Benlate.

Antibiogramas realizados en la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, determinaron la presencia de cinco clases de bacterias tipo Gram+ y Gram-. La contaminación bacteriana fue endógena, en los casos en que se observó contaminación fungosa ésta fue superficial.

**Cuadro 4. Respuestas morfológicas de la siembra de distintos explantes de *S. edule* en diferentes medios de cultivo.**

Explante	Medio	Respuestas
Yemas axilares	MSc	Plantas
	2, 3, 4, 5	Crecimiento - callos
	6, 7	o
	8	callo con brotes
	9, 10	buen crecimiento
	13	callo - brote
Yemas apicales	MSc	Plantas
	2, 3, 4, 5	Crecimiento - callos
	6, 7	o
	8	callo con brotes
	9, 10	buen crecimiento
	13	callo
Microestacas	MSc	Plantas
	13	Callo - brotes
	12	crecimiento pobre - callo
Meristemas	MSc	Poco crecimiento
	2, 3, 4, 5,	o
	6, 7, 8, 9, 10, 18	poco crecimiento callo
Embrión sexual + segmento de cotiledón	E11	Plantas
	MSc	Callo - raices
Callos de hoja o de peciolo	B14	Tallos - brotes
Piántulas in vitro	16	Raices
Hojas	13	Callo friable - brotes
	17	Callo buen crecimiento
Peciolos	13	Callo friable - brotes
	17	Callo buen crecimiento
Hojas inmaduras (jóvenes)	12	Callo - raices, callo - plantas, callo
Hojas maduras	12	Callo Callo - tallos, callo - raices
Cotiledón (segmento)	13	Callo - raices

Se observó que los explantes inoculados en medios con Benlate sufrieron decoloración, formación de protuberancias en la lámina foliar y una mayor producción de brotes. La alta concentración de gentamicina (80mg/l) mostró ser tóxica por lo que disminuyó la tasa de sobrevivencia, producto de la decoloración y la necrosis.

#### **4.1.2 Respuestas morfogénicas producidas por la interacción de los medios de cultivo y los tipos de explante**

La siembra de yemas (axilares y apicales) y de microestacas en el medio 1, sin presencia de reguladores condujo a la formación de plantas (Figuras 2, 3, 4, 5 y 6), en tanto que los medios de cultivo 2, 3, 4 y 5 que contenían desde bajas concentraciones (0,5 mg/l) hasta 2mg/l de BA indujeron a la formación de callo y no favorecieron el crecimiento (Figura 1). La respuesta a la siembra de yemas, microestacas y ápices meristemáticos en medios conteniendo auxinas en bajas concentraciones (0,1 mg/l ANA), en combinación con citocininas (0, 0,5, 1, 1,5, 2 y 3 mg/l de BA) produjo la formación de diferentes tipos de callo. Respuestas similares en lo que a formación de callo se refiere, se obtuvieron empleando pecíolos, hojas en diferentes estadios de madurez y segmentos de cotiledón

Figura 1. Callo friable, derivado de segmentos de hojas inoculadas en el medio de cultivo 12, se observa presencia de raíces.

Figuras 2 y 3. Plantas producto de la siembra de microestacas en el medio 1, sin reguladores del crecimiento a los 8 y a los 20 días de la inoculación, respectivamente

Figura 4. Planta regenerada de novo a partir de microestacas apicales en el medio de propagación 1 (MSc)

Figura 5. Planta regenerada a partir de microestacas, observándose la proliferación de raíces, cinco semanas después de la siembra.

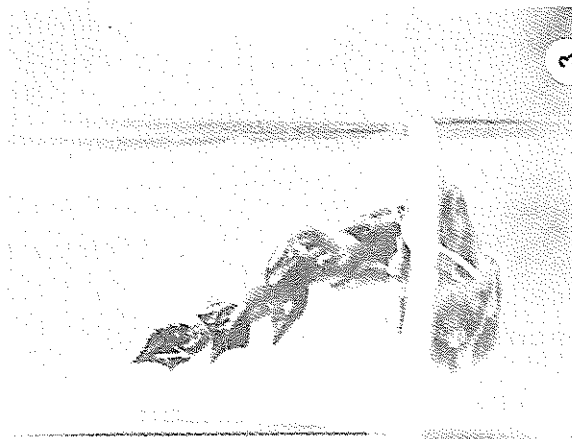
Figura 6. Planta neoformada a partir de yemas axilares sembradas en el medio 1.



1



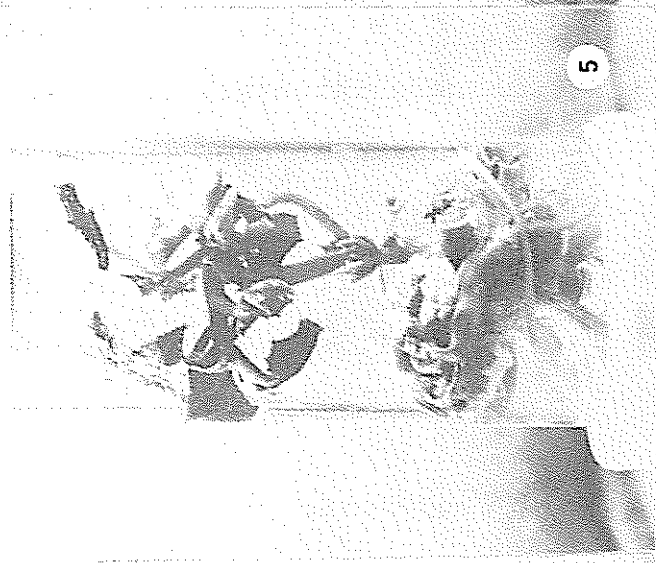
2



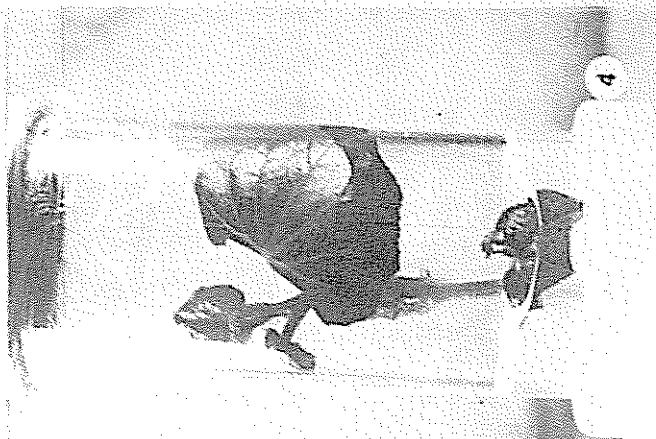
3



6



5



4



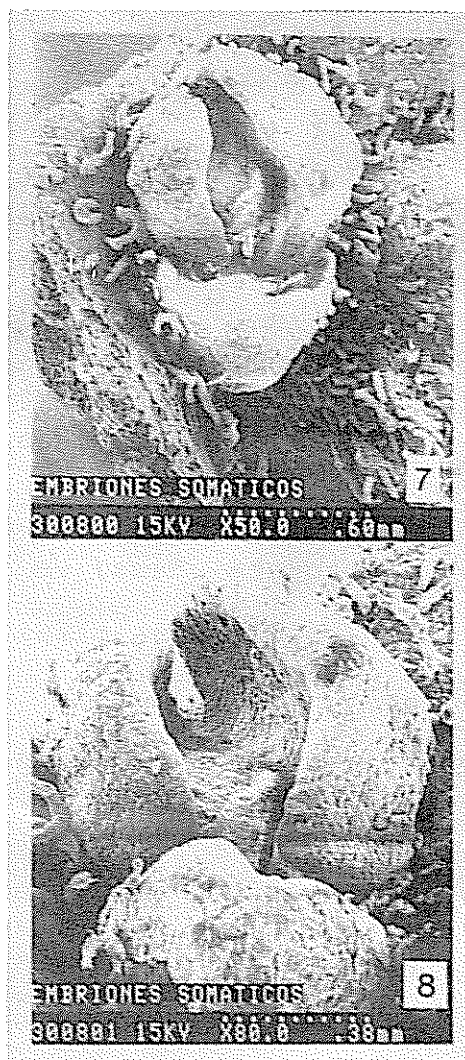
al ser sembrados en medios conteniendo auxinas y citocininas (12 y 13), o segmentos de cotiledón con solo auxinas (17).

Los ápices meristemáticos mostraron una alta tendencia a la formación de callo, aún a niveles bajos de BA, (medios 2 y 3). Estos ápices se caracterizaron por tener un crecimiento pobre en los medio sembrados, (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 18) por lo que no pudieron regenerar plantas. El empleo de medio de cultivo M.S (1962) complementado con 0,04 mg/l de BA, 0,05 mg/l de GAs, y 0,02 mg/l de ANA, 2% de sacarosa y agar lavado al 0,9%, ampliamente utilizado en la inoculación de ápices meristemáticos de yuca (CIAT), no resultó efectivo en esta especie.

La siembra de embriones sexuales con segmentos de cotiledón mostró una rápida "germinación" de los embriones con formación de plantas entre lo 7 y los 22 días después de la siembra, los resultados fueron similares con la inoculación en medio enriquecido con aminoácidos y con un 4% de sacarosa (E11) (Cuadro 3) que con el medio M.S.c (1). La adición de dos citocininas: BA y 2IP (15) en la siembra de embriones sexuales y de segmentos de cotiledones mostró la tendencia a la producción de callos de bajo crecimiento, en algunos casos se produjeron raíces.

Otras respuestas morfogénicas se dieron en presencia de auxinas y citocininas (medios 12 y 13), con una mayor proporción de BA (0,5mg/l y 3mg/l) que de AIA (0,03mg/l) y de ANA (0,1mg/l) respectivamente. En ambos casos hubo formación de callo, pero se presentó una mayor tendencia a la producción de brotes cuando el explante se sembró en el medio que contenía una mayor proporción de BA (13). El medio 16 fue empleado en forma sistemática para la posterior inducción de raíces en plantas producidas *in vitro*, como requisito inicial para la aclimatación. Se produjo caulogénesis al sembrar callos derivados de hojas o de pecíolos en medio líquido que contenía las sales de M.S (1962) diluidas al 50%, caseína hidrolizada y agua de coco (10%v/v).

Uno de los efectos más notorios del cultivo *in vitro* de *S. edule* fue la producción de brotes. Yemas axilares y apicales y microestacas sembradas en los medios de cultivo: 12, 13 y 8 indujeron a la formación de brotes, (Figuras 7 y 8). El medio 13 resultó particularmente efectivo para la producción de brotes a partir de callos provenientes de hojas, la transferencia de estos brotes a medio líquido (14), que contenía agua de coco (10% v/v) y caseína hidrolizada (1g/l), produjo plantas.



Figuras 7 y 8. Neoformación de brotes en callos derivados de la siembra de segmentos de hojas inmaduras, en medio de cultivo 12 conteniendo auxinas y citocininas, se observa la biopolaridad de los embriones.

Las microestacas de aproximadamente 5mm de longitud con una yema axilar, mostraron una rápida regeneración *in vitro* al ser inoculados en el medio 1, que carece de reguladores del crecimiento, por lo que se decidió emplearlas como explantes en los ensayos de conservación de germenoplasma.

La aclimatación fue exitosa siempre que se seleccionaron plantas con un sistema radical bien desarrollado y de tamaño adecuado (Figura 9). La primera etapa de la aclimatación en el cuarto de crecimiento comprendió un lapso de tres a siete semanas, según la vigorosidad mostrada por las plantas. La fase de invernadero no fue menor de un mes. Se observó que las plantas no presentaban deposiciones de cera epicuticular por lo que requieren de una fase de endurecimiento adicional. Algunas plantas sufrieron amarillamiento en las hojas inferiores que luego se desprendieron.

## **4.2 Conservación de germenoplasma**

### **4.2.1 Efecto de la concentración de sacarosa**

Las medias de: incremento de peso, incremento de longitud, peso seco, número de hojas y número de brotes producidos por nivel, se muestran en el Cuadro 5.

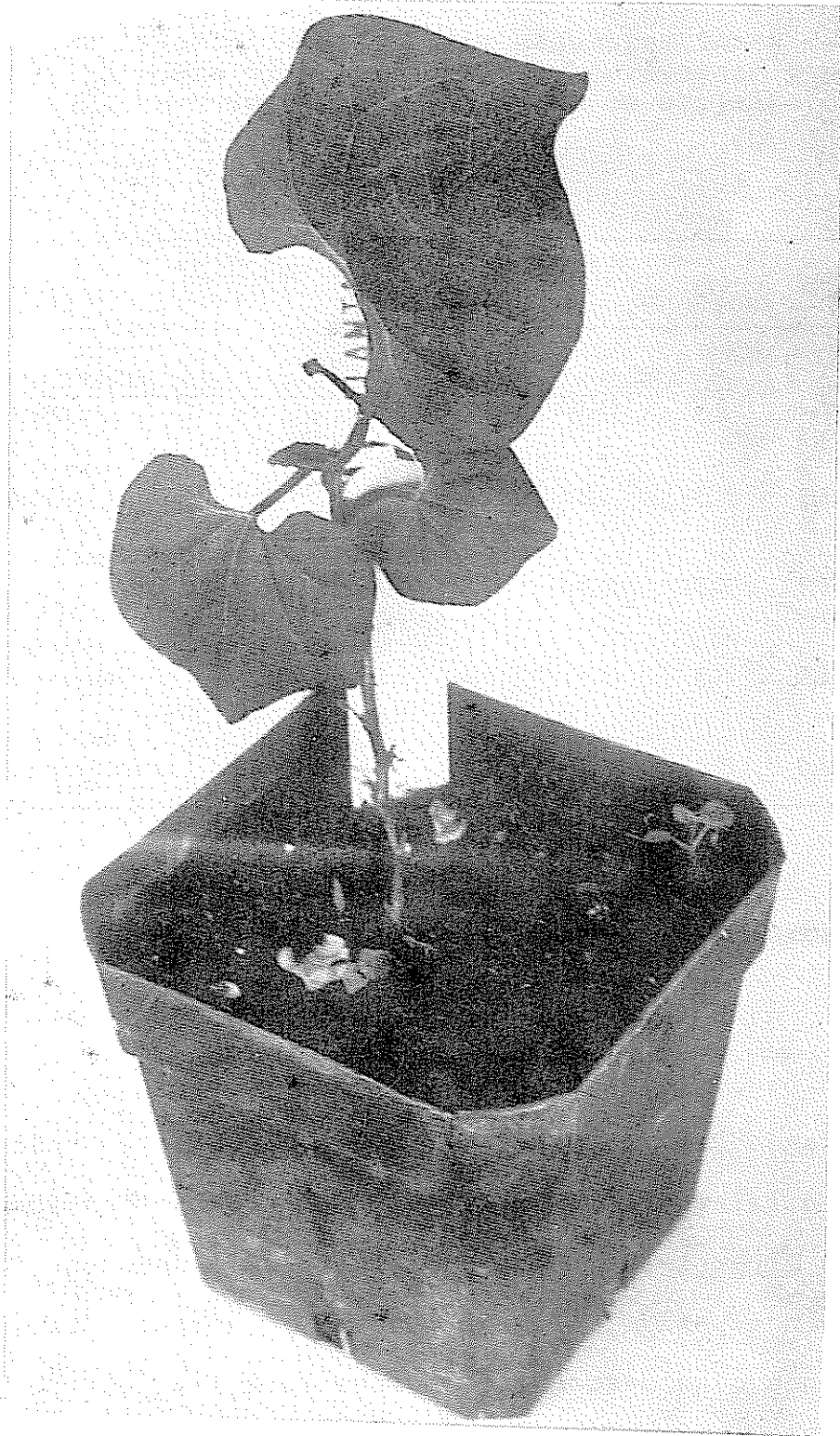


Figura 9. Planta regenerada a partir de microestacas, en fase de invernadero.

**Cuadro 5. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre el crecimiento, sobrevivencia y producción de hojas, brotes y raíces en explante de *Sechium edule*.**

Variables	Concentración de sacarosa						
	0	30	40	50	60	70	80
Incremento promedio en peso (mg)	17,7	165,9	238,45	107,65	98,5	46,11	54,60
Incremento promedio en longitud (mm)	1	7,4	7,8	6,0	4,15	2,81	3,15
Peso seco promedio (mg)	2,80	19,10	27,85	18,60	19,80	9,32	14,20
Número de hojas promedio producidas	1,35	9,5	6,9	7,35	6,70	2,39	7,25
Número de brotes promedio producidos	0,15	1,70	1	1,05	2,05	0,69	0,55

#### 4.2.1.1 Incidencia de la sacarosa en el crecimiento

El mayor incremento promedio de peso, longitud y peso seco del explante, se observó a una concentración de sacarosa en el medio de cultivo de 40 g/l, y el incremento mínimo se presentó en el medio carente de sacarosa (Cuadro 5, Figuras 10 y 11). Las concentraciones de 50 y 80 g/l mostraron un comportamiento similar en lo que a incremento en peso y peso seco promedio se refiere. En cuanto al aumento en longitud, la concentración de

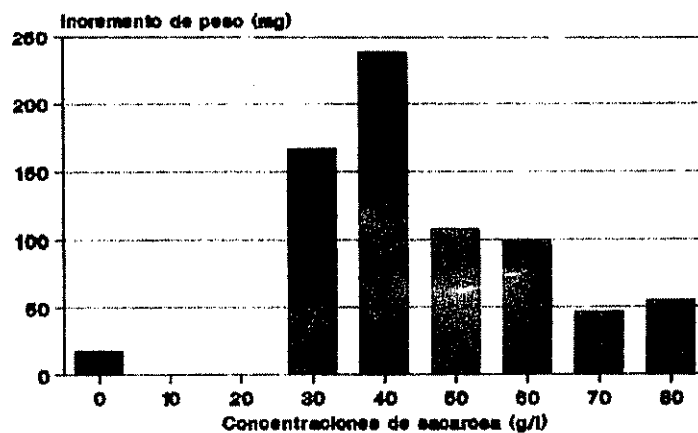


Figura 10. Incremento de peso a diferentes concentraciones de sacarosa

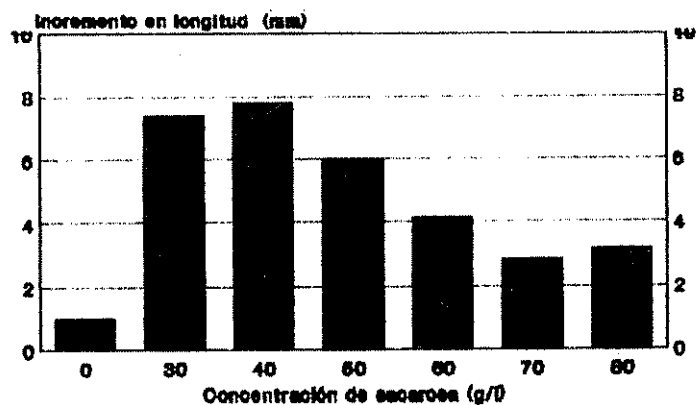


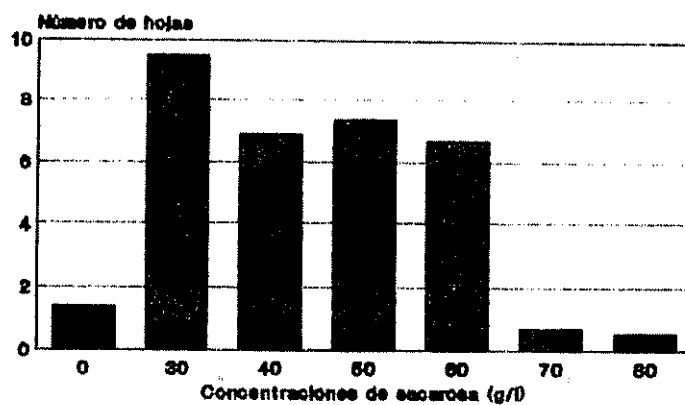
Figura 11. Incremento de longitud a los 30 días de siembra en diferentes niveles de sacarosa.

80 g/l ocupó el tercer lugar, antecedida por los medios de cultivo con 40 y el 30g/l de sacarosa .

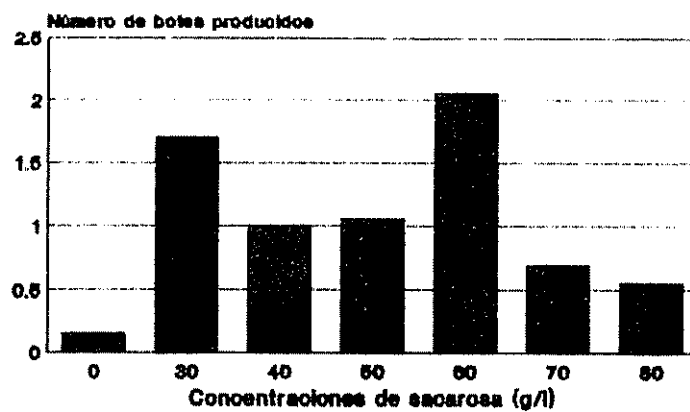
El número máximo de hojas promedio a los 30 días de la siembra se produjo en explantes sembrados en el medio que contenía 30 g/l de sacarosa (Fig. 12) y el mayor número de brotes se alcanzó a concentraciones de 60 g/l del disacárido.

Es importante anotar que la sobrevivencia varió con los distintos tratamientos. La carencia de sacarosa produjo la menor tasa de sobrevivencia del experimento (70 %). Altas concentraciones de sacarosa aumentaron la mortalidad, siendo el porcentaje de sobrevivencia de un 80 y 75 % en medios con 7 y 8 % de sacarosa, respectivamente. Los medios de 30, 40, 50 y 60 g/l mostraron alta sobrevivencia, cercana al 100 %. Estas cifras se ven reflejadas en el descenso del incremento en peso, incremento en la longitud, producción de los brotes y las hojas en los tratamientos sin sacarosa o con altos niveles de la misma. La producción de hojas fue muy baja en medios de cultivo con 70 y 80 g/l de concentración de sacarosa, y la mínima se presentó en el medio de cultivo sin sacarosa (Figuras. 12 y 13).





**Fig 12: Número de hojas producidas a 30 de la siembra con varias concentraciones sacarosa**



**Fig 13: Brotes formados al mes de la siembra en medio con distintas concentraciones de sacarosa**

El mayor número promedio de brotes se obtuvo con 60 g/l de sacarosa en el medio y el menor en el medio sin sacarosa (Figura 13).

La diferencia entre tratamientos fue altamente significativa para todas las variables (Cuadro 6) como se puede observar en el análisis de varianza. La prueba de rango múltiple de Duncan para evaluar la diferencia de medias mostró que en todos los casos hubo diferencias significativas (Cuadro 7). El incremento de peso agrupó las medias de manera tal que las concentraciones de 30 y 40 g/l constituyen el grupo a, con los mayores promedios de peso, seguidos por el grupo b, que incluye concentraciones de 60, 70 y 80 g/l. finalmente el grupo c fue el que mostró el menor incremento de peso, constituido por el ensayo con medio carente de sacarosa. El incremento en longitud presentó grupos bien definidos (mayores medias), pertenecientes a concentraciones de sacarosa del 30 y el 40 % (Cuadro 7), seguido por dos medias que presentan un grupo de transición entre las medias a, b y c, y que corresponden a niveles de 50 y 60 g/l de sacarosa. El grupo c está conformado por las medias de 70 y 80 g/l, el mínimo incremento de longitud está representado por el grupo d (0 g/l de sacarosa).

**Cuadro 6. Significancia de las variables evaluadas a diferentes concentraciones de sacarosa (0, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 g/l) a los 30 días de la siembra de microestacas de *S. edule***

Fuente de variación	G.L.	Incremento en peso	Incremento en longitud	Peso seco	Número de hojas	Número de brotes
Tratamientos	6	16,07**	12,36 **	2,53 †	12,45 **	6,02**
Error	133	92,3292	58,2292	51,77	76,055	26,546
C.V.		20,4553	45,45	24,60	31,07	39,82

Cuadro 7. Evaluación de los factores sacarosa ASR y temperatura a diferentes niveles en relación al procesamiento de incremento de peso, longitud, peso seco, número de hojas y brotes.

Tratamiento	Variables				
	Incremento peso X (mg)	Incremento de longitud X (mm)	Peso seco X (mg)	Número de hojas X	Número de brotes X
SAC					
0	2,716	0,517	1,279	1,182	0,785
30	4,888	1,954	2,871	2,989	1,385
40	4,870	2,030	2,973	2,599	1,142
50	4,273	1,758	2,750	2,730	1,158
60	4,176	1,381	2,725	2,558	1,470
70	3,811	1,245	2,570	2,241	0,950
80	3,778	1,304	2,584	2,738	0,964
ARS 0	5,347	2,28	3,010	2,94	1,646
10-3	4,581	1,949	2,665	2,987	1,563
10-6	4,956	1,4766	3,049	2,499	1,445
10-9	4,747	1,695	2,834	2,685	1,498
Temp.					
16°C	3,252	1,287	2,022	2,368	1,253
18°C	3,548	0,848	1,900	1,994	0,891
20°C	3,994	1,359	2,211	2,482	1,191
22°C	4,064	1,177	2,204	2,354	1,053
25°C	4,767	2,047	2,782	2,549	1,369

El peso seco promedio tuvo una marcada tendencia a diferenciar el tratamiento en ausencia de sacarosa de los que la contenían, con el agrupamiento como b, en el primer caso y como a en el segundo (Cuadro 7).

Los procesos morfogénéticos mostraron una mayor complejidad para el análisis. En cuanto al número de hojas se pueden observar tres grupos definidos: a, b y c (Cuadro 7) el nivel de 30 g/l constituyó el grupo a siendo el mayor promedio, el grupo b se refiere a la concentración de 70 g/l y es intermedio, siendo el c el mínimo, correspondiente a la siembra en el medio sin sacarosa, los demás tratamientos pueden ser considerados como un tipo intermedio entre el grupo a y el b, ya que presentaron medias de número de hojas promedio producidas, inferiores al grupo a pero superiores al b son las concentraciones de 40, 50, 60 y 80 g/l de sacarosa (Fig. 12). El menor número promedio de brotes se dio en el grupo sin sacarosa, en tanto que el máximo se presentó a concentraciones de 60 g/l (Figura 13), los altos niveles de sacarosa se comportan en forma similar a la ausencia de sacarosa (Cuadro 7), en cuanto al número promedio de brotes producidos, agrupándose como d (0 g/l) y dc (70 y 80 g/l), los tratamientos de 40 y 50 g/l se encuentran clasificados en bc, mientras que el correspondiente a 30 g/l se relaciona con el de mayor

inducción de brotes y clasifica como ab, constituyendo el segundo grupo productor de brotes del ensayo. Se seleccionó la opción de 60 g/l de sacarosa, para la implementación de experimentos posteriores, tomando en cuenta los porcentajes de inhibición del crecimiento, la tasa de sobrevivencia y la alta proporción de brotes producidos a esta concentración de sacarosa.

#### **4.2.2 Efecto de los niveles de AAS sobre el crecimiento y la morfogénesis**

El Cuadro 8 y las Figuras 14, 15, 16, y 17, muestran las medias generales de incremento de peso, incremento en longitud, peso seco, número de hojas y brotes producidos en los medios de cultivo con las distintas molaridades de AAS.

**Cuadro 8. Medias por tratamiento de AAS de varios aspectos cuantificados a los 30 días de la siembra.**

Variable	Concentración de AAS (M)			
	0	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-9</sup>
Incremento promedio en peso (mg)	165,9	111,75	107,30	144,85
Incremento promedio en longitud (mm)	7,40	5,8	5,05	5,15
Peso seco promedio (mg)	18,51	14,35	11,40	11,55
Número de hojas promedio producidas	9,50	4,75	6,05	5,90
Número de brotes promedio producidos	1,70	0,70	1,55	1,25

El análisis de varianza (Cuadro 9) mostró diferencias altamente significativas para los tratamientos con distintas concentraciones de AAS, en incremento de peso y de longitud, significancia al 5 % para el número de hojas producidas y diferencias no significativas en cuanto al número de brotes ni al peso seco. El agrupamiento de medias de Duncan al 5 % (Cuadro 7), determinó que las medias de los tratamientos se diferencian del testigo con claridad en el caso de medias de incremento de peso. En otras variables medidas, los tratamientos parecen relacionarse entre sí, el incremento de longitud, el tratamiento carente de AAS (a) se asemeja al de mayor concentración de AAS (ab). Todos los tratamientos con AAS

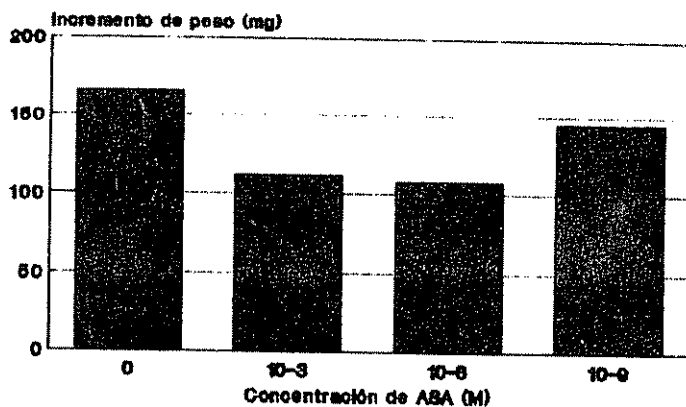


Fig 14: Incremento de peso de explantes expuestos al ASA por 30 días

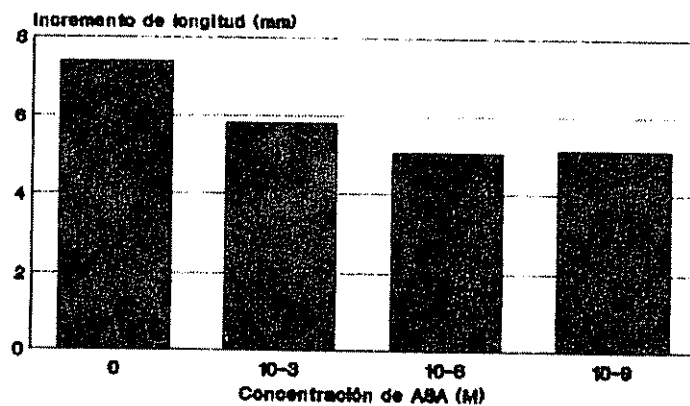


Fig 15: Incidencia del ASA en el aumento de longitud en *S.edule* a los 30 días de siembra



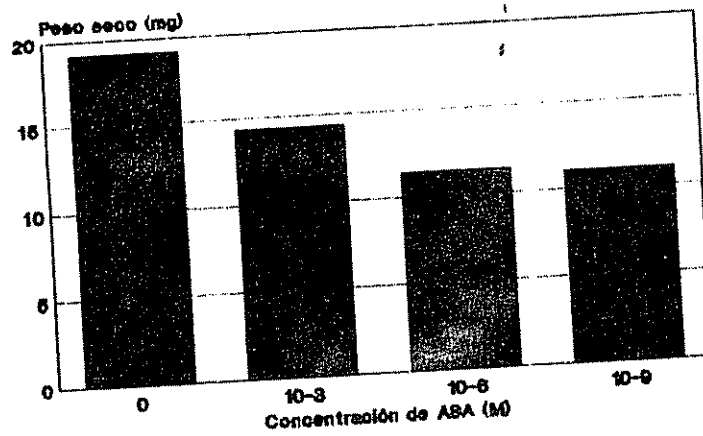


Fig 16: Peso seco promedio de plantas sometidas a ASA por 30 días

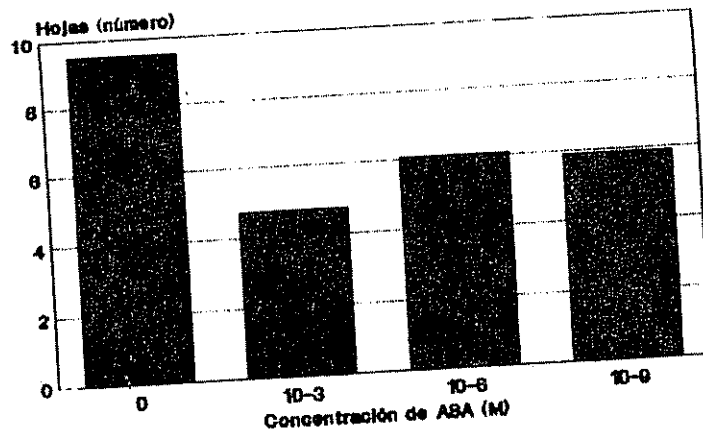
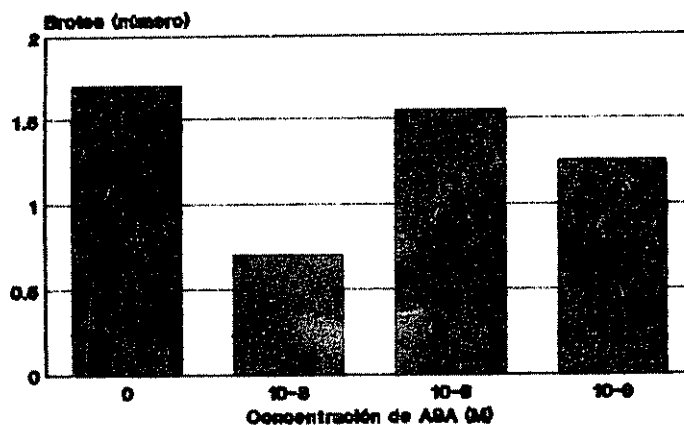


Fig 17: Número de hojas producidas con varios niveles de ASA



**Fig 18: Brotos producidos a los 30 días de exposición al ASA**

**Figura 18. Brotos producidos a los 30 días de exposición al AAS.**

**Cuadro 9. Significancia de las variables evaluadas en explantes sometidos a diferentes concentraciones de AAS (0, 10<sup>-8</sup>M, 10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-4</sup>M) durante 30 días.**

Fuente de variación	G.L.	Incremento en peso	Incremento en longitud	Peso seco hojas	Número de brotes	Número de
Tratamientos	3	6,558 **	4,096 **	1,869 NS	3,12*	0,447N.S
Error	76	27,548	25,923	17,543	29,664	13,302
C.V.		12,26	30,37	16,63	22,48	27,20

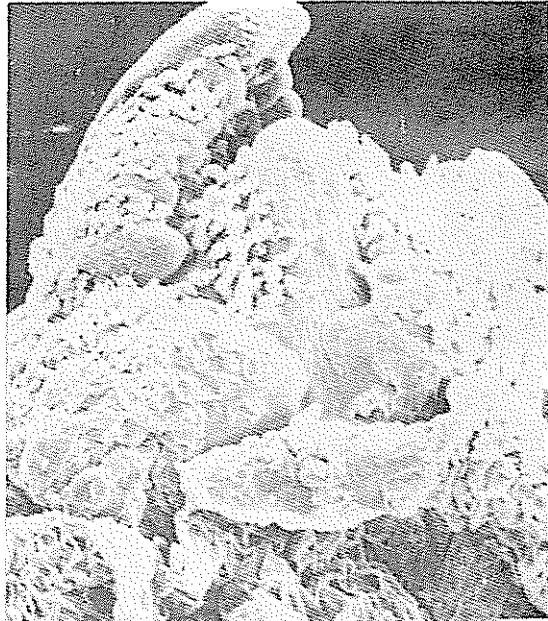
pertenecen al grupo b (bc o ab). En grupos como el número de hojas y el peso seco, las medias que más se relacionaron fueron la del tratamiento testigo y la de la menor concentración de AAS, que pertenecen en ambos casos al grupo ab para 0M de AAS y a abc para  $10^{-9}$  M.

En los experimentos en que se empleó el AAS cabe notar que el porcentaje de sobrevivencia fue bastante alto, de alrededor del 95 %. Con la exposición a estas sustancias se produjeron cambios evidentes en el color de las plantas. Cuando se utilizaron concentraciones altas de la sustancia fenólica se observó la tendencia a la producción de plantas amarillentas y o blancas, generalmente el color amarillo se localizó en la parte inferior de la planta y algunas veces afectó también a las hojas.

No parece haber incidencia del AAS sobre la morfología foliar (Figura 20) a los 40 días de la incubación con  $10^{-9}$ M, sin embargo, se observó la tendencia al incremento del número de tricomas en la superficie adaxial (Figuras 21 y 22).

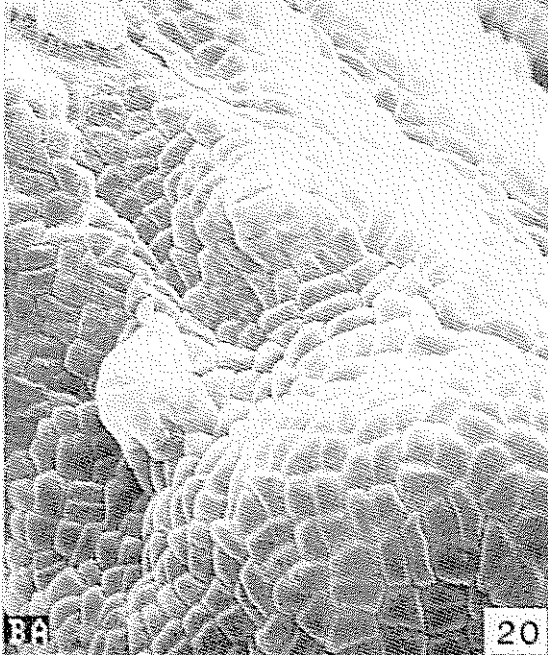
**Figura 19.** Brote adventicio producido en microestacas de *S. edule* expuestas a una concentración de 10-<sup>e</sup> M de AAS

**Figura 20.** Superficie adaxial de la lámina foliar expuesta a 10-<sup>e</sup> M de AAS, se observan estomas normales de tipo anocítico.



0-9 ASA 40.00AS 19

00000 15KV X80.0 38mm

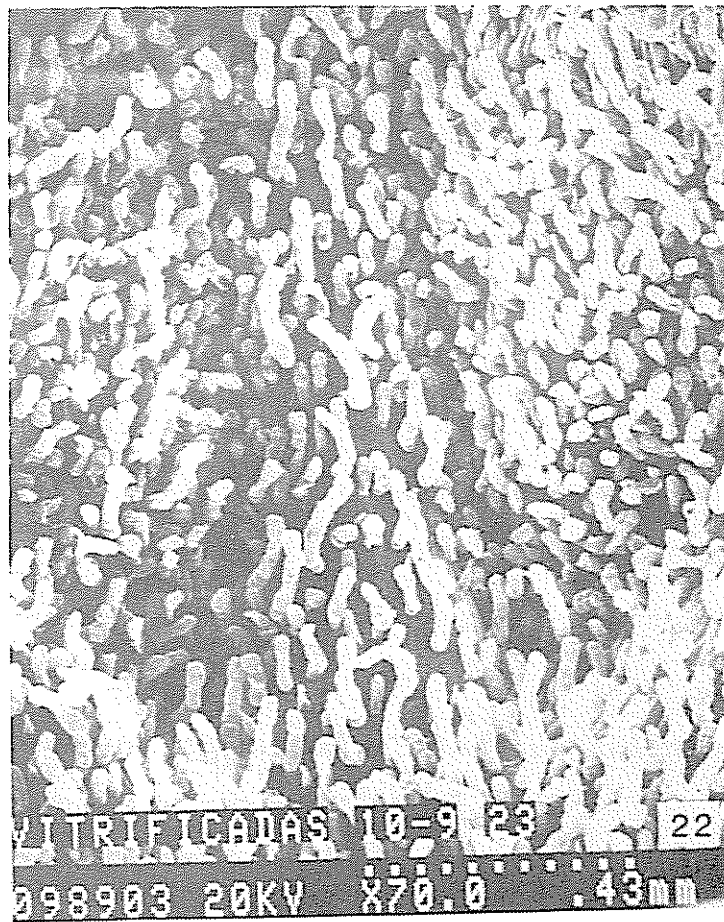
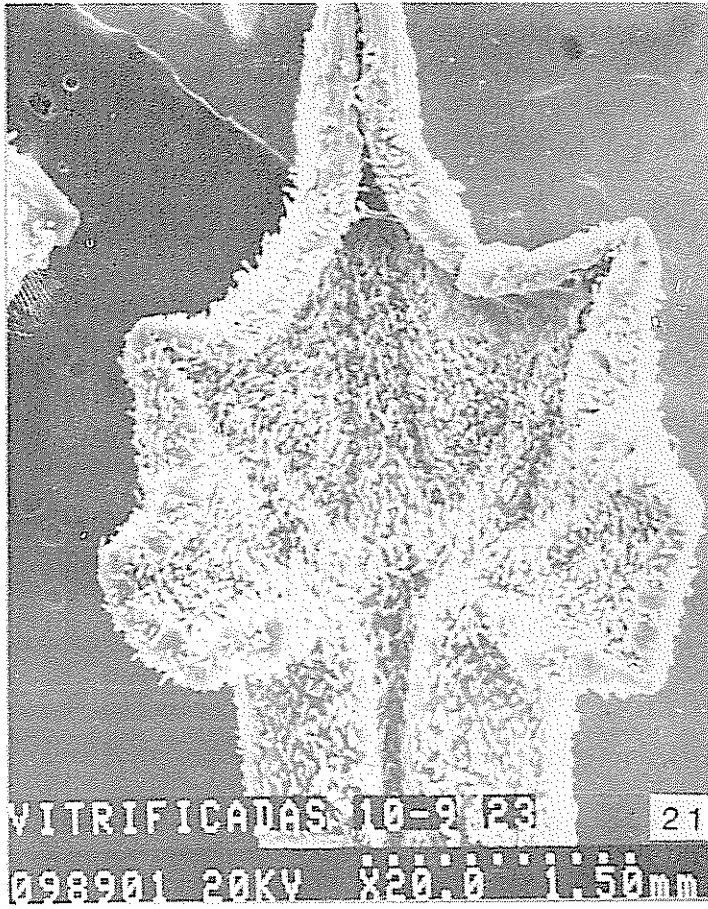


BA 20

00016 20KV X350 86um

Figura 21. Superficie adaxial de hoja de chayote vitrificada, obtenida de una planta expuesta a un nivel de  $10^{-9}$  M de AAS.

Figura 22. Superficie de la lámina foliar de *S. edule* regenerada de novo en un medio de cultivo con  $10^{-9}$  M de AAS, con gran cantidad de tricomas multicelulares.



El AAS mostró interesantes efectos sobre plantas incubadas por periodos mayores de seis meses, produciendo dos respuestas diferentes en los explantes. Los bajos contenidos de AAS ( $10^{-8}M$  y  $10^{-9}M$ ) produjeron plantas anormalmente largas de marcada dominancia apical, o por el contrario, plantas relativamente pequeñas pero con gran cantidad de yemas y de ramificaciones laterales, en ambos casos se observó una reducción del área de la lámina foliar. Debido a las respuestas morfogénicas obtenidas con las bajas concentraciones de AAS, y a que las diferencias obtenidas en inhibición de crecimiento fueron bastante similares entre los tratamientos de  $10^{-9}$  y  $10^{-8}M$ , se seleccionó la concentración de  $10^{-9}M$  que no produjo dichos efectos, esto se constató en la incubación por seis meses a  $16^{\circ}C$ .

Se observó vitrificación de las hojas en plantas tratadas con AAS, sin embargo el porcentaje fue bajo (no excedió en ningún tratamiento al 5%), (Figura 21), además se observó una tendencia al incremento del número de tricomas en la superficie foliar. Esta observación debe ser ratificada pues no se realizó una cuantificación de tricomas por unidad de superficie foliar. Los tricomas fueron de longitud mayor en los tratamientos con AAS en comparación con los otros tratamientos.



#### 4.2.3 Efecto de los niveles de temperatura sobre el crecimiento y morfogénesis en explantes de *S. edule*

Se probó el efecto de la exposición de las plantas durante un mes, a temperaturas de 16, 18, 20, 22°C y ambiente. El Cuadro 10 contiene los resultados promedios de incremento de peso, incremento de longitud, peso seco, número de hojas y brotes desarrollados en los distintos tratamientos.

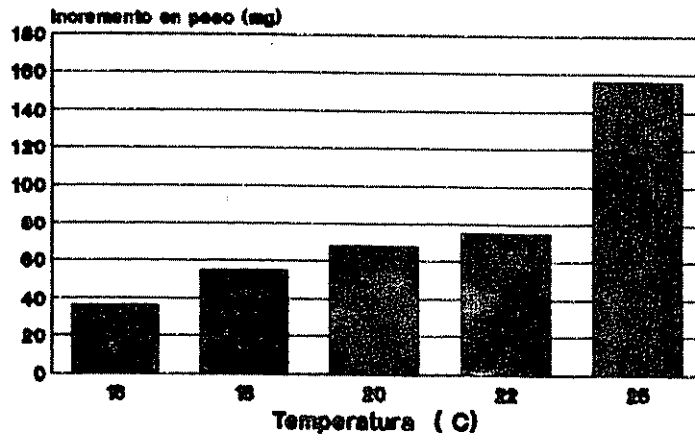
**Cuadro 10. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y algunos aspectos morfogénicos de *S. edule***

Variable	Temperatura (°C)				
	16	18	20	22	25
Incremento promedio en peso (mg)	36,15	54,80	67,25	74,25	155,75
Incremento promedio en longitud (mm)	3,25	2,05	3,50	3,10	8,30
Peso seco promedio (mg)	7,20	6,20	9,55	9,35	18,40
Número de hojas promedio producidas	5,40	3,75	5,95	5,15	6,25
Número de brotes promedio producidos	1,30	0,45	1,05	0,80	1,75

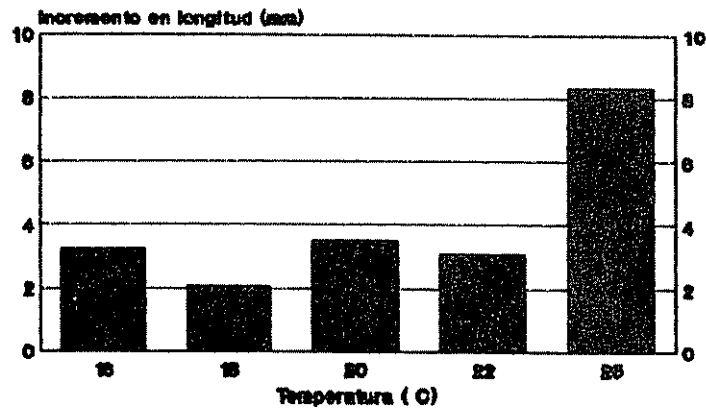
La exposición a la temperatura de 16°C, produjo un incremento menor de peso respecto a los otros tratamientos (Figura 23). La temperatura de 18°C condujo al mínimo incremento de longitud (Figura 24) así como a la menor producción de hojas y brotes (Figuras 25 y 26). El mayor aumento promedio de peso, longitud, peso seco, número de hojas y brotes se presentó en los explantes expuestos a la temperatura de aproximadamente  $25\pm 2^\circ\text{C}$  (Figuras 23, 24, 25 y 26).

La prueba de análisis de varianza (Cuadro 11) denota que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados para todas las variables estudiadas, el número de brotes producidos, fue significativo al 5%, el incremento de peso y longitud, peso seco y número de hojas alcanzó un nivel de significancia al 1%.

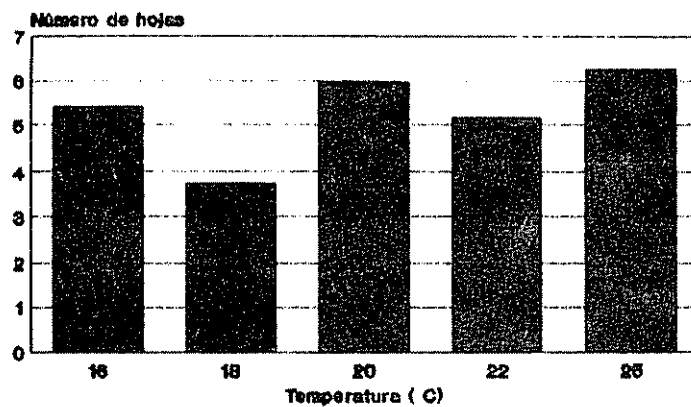
La prueba de medias de rango múltiple de Duncan al 5%, muestra una tendencia a separar las medias en grupos más definidos que en los tratamientos de evaluación del efecto de ASA y sacarosa (Cuadro 7). Se puede observar que el de incremento de peso promedio de los explantes expuestos a una temperatura de 16°C constituye un grupo definido como c, con el mínimo incremento promedio de peso. Las medias de incremento de peso, correspondientes a la exposición a temperaturas de 18, 20 y 22°C constituyen el grupo b.



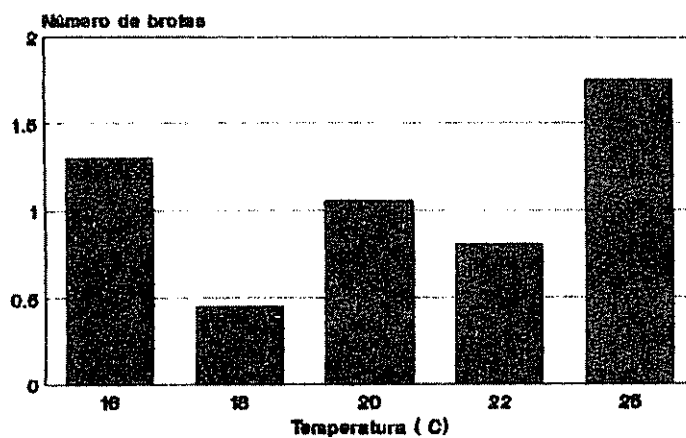
**Fig 23: Incremento de peso a diferentes temperaturas a los 30 días de siembra**



**Fig 24: Incremento de longitud a los 30 días de siembra en diferentes temperaturas**



**Fig 25: Número de hojas promedio producidas con la siembra a diferentes temperaturas**



**Fig 26: Brotes producidos en explantes expuestos a varias temperaturas**

**Cuadro 11. Grado de significancia de las variables cuantitativas evaluadas a diferentes temperaturas (16°C, 18°C, 20°C, 22°C y 25°C) 30 días después de la siembra**

Fuente de variación	G.L.	Incremento en peso	Incremento en longitud	Peso seco	Número de hojas	Número de brotes
Tratamientos	4	7,67 **	8,48 **	8,67 **	3,58 **	2,99*
Error	95	81,904	43,223	25,057	24,460	21,690
C.V.		23,72	50,1988	23,09681	21,60	41,5

El mayor incremento promedio de longitud se presentó en las plantas colocadas a temperatura de 25°C (a), y el menor incremento promedio en inóculos sometidos a 18°C (c), los demás grupos fueron intermedios entre ambos. El peso seco promedio fue significativamente diferente entre el tratamiento de 25°C (a) y los otros tratamientos (c). La formación de hojas en las plantas sometidas a 18°C fue significativamente diferente a los demás tratamientos evaluados (a). Se determinó que el promedio de brotes, al igual que el número de hojas promedio fue menor a los 18°C (b), mayor a los 25°C y a los 16°C (a), e intermedio a los 20 y 22°C (Cuadro 7).

El mayor porcentaje de sobrevivencia (100%), se presentó en explantes sometidos a 25°C, a 16°C, 20°C, 22°C y 25°C, y el menor en las plantas colocadas a 18°C (95%).

La coloración de las plantas fue verde claro, a temperaturas de 20, 22°C y 25°C, a temperaturas menores se observó que la lámina foliar de las plantas se tornaba a una coloración amarillenta y en algunos casos blancuzca. Las bajas temperaturas, inhibieron la formación de callo basal, que se presentó a los 20°C (20%), 22°C (35%) y a 25°C (30%). Las bajas temperaturas parecen ser inhibidoras de la neoformación de raíces, observándose la presencia de éstas en una proporción entre 10 y el 15% a los 16 y 18°C, respectivamente. A los 20°C fue el 35% y los mayores porcentajes se presentaron a 22°C (50%) y a 25°C (45%). La longitud de las raíces fue menor a bajas temperaturas (16 y 18°C), mostrando la máxima longitud radical el tratamiento de 20°C. El aspecto general de las plantas fue muy bueno a temperaturas de 20, 22° y 25°C.

Se seleccionó la temperatura de 16°C para la realización de la segunda fase de este trabajo por ser la temperatura con la que se presentó un incremento de peso que mostró valores cercanos a los mínimos, y estuvo en los grupos de menor incremento en longitud y peso seco. Además esta temperatura produjo un efecto positivo sobre la inducción en la producción de hojas.

#### 4.2.4 Efecto general de los tratamientos de sacarosa, AAS y temperatura

A través del experimento se pudo observar que, en efecto, los compuestos empleados, así como la temperatura actuaron en forma inhibitoria del crecimiento, afectando el incremento promedio en peso y longitud (Cuadro 12), además parecen ejercer algún efecto en la inducción de hojas y brotes.

**Cuadro 12. Medias y porcentajes totales peso de los factores evaluados**

Factor Variable	Sacarosa	AAS	Temperatura	Testigo
Incremento X de peso (mg)	93,83	121,33	49,07	160,825
Incremento X de longitud (mm)	4,15	5,33	2,975	7,85
X peso seco (mg)	15,43	13,70	8,075	18,75
Número X de hojas producidas	5,323	5,57	5,062	7,875
Número X de brotes producidos	0,915	1,17	0,9	1,725

Según los resultados obtenidos, el mayor efecto se alcanzó con la exposición a temperaturas menores de lo normal para la especie, (Figuras 27, 28 y 29), dado que los explantes sometidos a este factor físico mostraron el menor

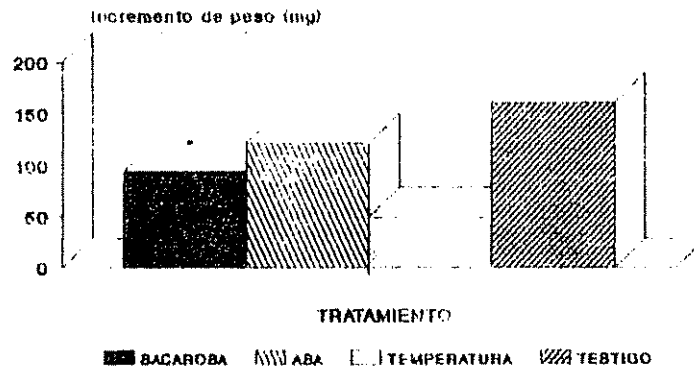


Fig 27: Medias generales de incremento de peso de los diferentes tratamientos

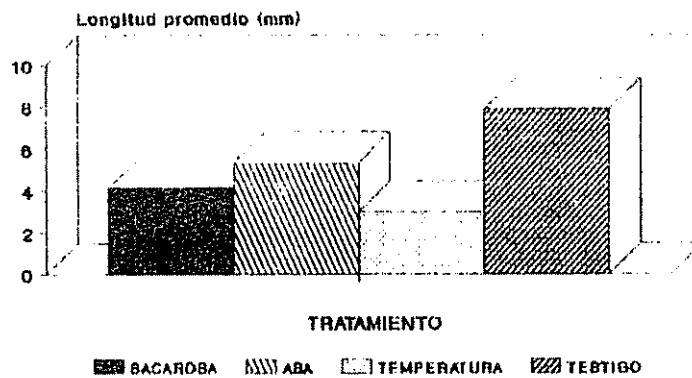


Fig 28: Incremento promedio de longitud en diferentes tratamientos a los 30 días de la siembra



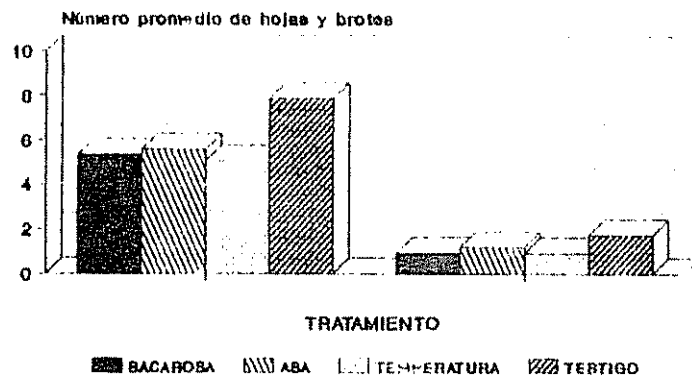


Fig 29: Promedio de hojas y brotes producidos en los diferentes tratamientos

incremento promedio de peso y longitud y la menor tasa de producción de hojas, no así de brotes (Figura 29). Por otra parte, los ensayos realizados con inhibición por estrés osmótico fueron menos efectivos en la disminución del crecimiento que la temperatura, sin embargo, mostraron un mayor rango de inhibición que los medios de cultivo que contenían AAS. Las altas concentraciones de sacarosa produjeron un incremento en la producción foliar y el ácido acetil salicílico incidió en un aumento de la producción de brotes (Figura 29).

#### **4.3 Ensayo de interacción: Temperatura-Sacarosa y temperatura-AAS**

##### **4.3.1 Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento**

Las pruebas de rango múltiple de Duncan realizadas para cada variable por mes, (Cuadro 13) mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Se observó un incremento en: de longitud en los cuatro primeros meses, un incremento en peso en los cinco primeros meses. En el quinto mes, el testigo y el tratamiento temperatura-AAS se clasificaron en el mismo grupo, ya que el ensayo que estudiaba la interacción de temperatura-sacarosa alcanzó el menor incremento promedio en longitud, esta situación varió en el último mes de la

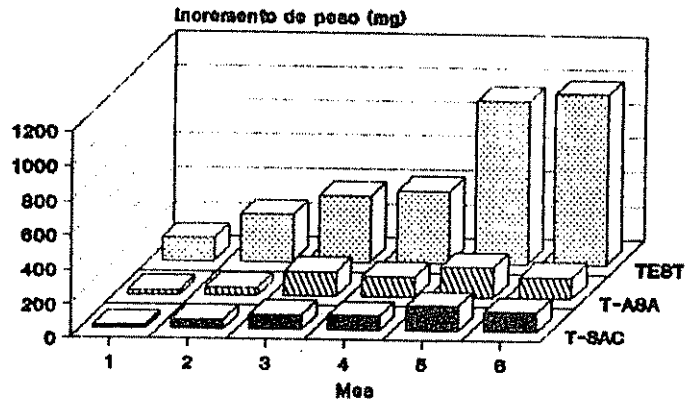
Cuadro 13. Proedios de incremento en longitud, incremento en peso, peso seco, número de hojas, número de brotes, presencia, longitud de raíces y sobrevivencia (%) en las diferentes interacciones de temperatura - RSA - Sacarosa

Tratamiento Mes Variable	Temperatura - RSA						Temperatura - SAC						Testigo					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Incremento x en Longitud (cm)	1,55	3,15	9,10	6,90	12,70	7,62	1,95	4,10	5,65	5,60	6,05	8,25	7,30	10,90	15,99	26,40	14,75	12,10
Incremento x en peso (mg)	28,40	47,10	142,55	118	177,45	122,0	21,35	56,10	66,70	83,90	149	115,69	134,15	275,15	387,93	418	950,85	994,70
Peso seco x (mg)	7,65	9,40	17,05	18,0	23,45	16,67	6,65	9,05	16,10	16,0	26,20	23,4	18,3	34,20	49,35	66,75	117,05	101,95
Número x de hojas	4	5,05	7,55	952	11,20	8,18	3,55	6,75	9,40	7,55	16,55	10,06	6,20	12,15	13,45	14,00	14,30	14,10
Número x de brotes	0,6	0,5	0,45	0,76	1,40	0,85	0,85	0,70	1,60	1,45	3,70	2,13	0,5	0,85	1,20	0,75	0,9	1,25
Presencia de raíces	0	-	-	-	0,15	0,06	-	-	-	-	0,10	0,07	0,15	0	0,37	0,25	0,70	0,5
Longitud de raíces	0	-	-	-	1,68	0,76	-	-	-	-	3,23	0,97	0,68	0	44,1	7,46	14,51	15,43

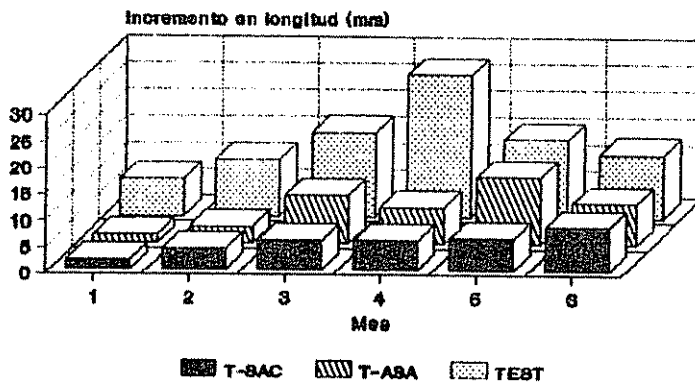
evaluación, en la que este tratamiento mostró una media mayor a los otros, codificándose en un grupo diferente (Figura 28). En cuanto al incremento de peso, la inhibición sufrida por los tratamientos probados fue evidente, excepto en el último mes en que el ensayo de temperatura-AAS mostró el menor índice de aumento en peso, en forma diferencial del tratamiento sacarosa-temperatura (Figura 30). El promedio de peso seco tuvo un comportamiento similar, en concordancia con el incremento en peso de los cinco primeros meses. La comparación de un efecto simple (AAS, sacarosa y temperatura), en relación con la combinación de efectos (T-AAS, T-sacarosa) mostró una inhibición del crecimiento mucho mayor en todos los aspectos estudiados. El tratamiento de T-sacarosa mostró el mínimo incremento de peso y el T-AAS el menor crecimiento en longitud (Figuras 30 y 31).

#### **4.3.2 Efecto de la temperatura vs. sacarosa y vs. AAS sobre la inducción de hojas, brotes y raíces**

Se observó la tendencia de reducción de la tasa de producción de hojas en los tratamientos causantes de estrés, en el primero, segundo, tercero, cuarto y quinto mes. Los primeros cuatro meses fue evidente la diferencia en cuanto al índice de hojas producidas por el tratamiento control y los tratamientos de inhibición, en el quinto mes



**Fig 30 :Incremento en peso por mes con interacciones de temperatura-sacarosa temperatura-ASA y testigo**



**Fig 31: Incremento en longitud por mes con interacciones de temperatura sacarosa y ASA**

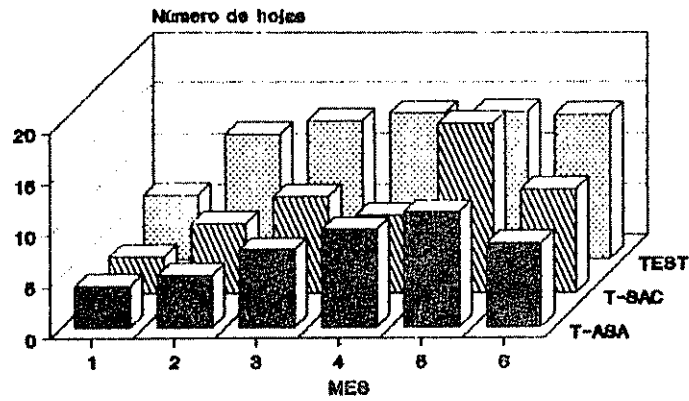
no hubo diferencias significativas y al sexto mes la tendencia fue ascendente en el tratamiento con 60 g/l de sacarosa (Figura 32).

El desarrollo de nuevos brotes fue favorecido por el tratamiento con una alta tasa de sacarosa, que tuvo una tendencia a ser mayor, incluso que el testigo, excepto en el segundo mes. En este mes la diferencia no fue significativa (Cuadro 13). El ensayo con ASA, mostró ser ligeramente superior al testigo en su capacidad de inducción de brotes *de novo* solo en el primero, cuarto y quinto mes (Figura 33).

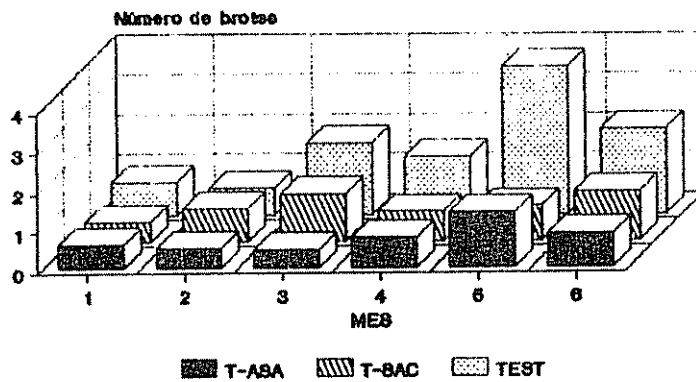
El análisis global de la prueba de Duncan, para los seis meses del experimento (Cuadro 14) determinó que se dieron diferencias significativas de inhibición entre el testigo y los tratamientos, para la mayoría de los parámetros; solo en el caso de la producción de brotes la alta concentración de sacarosa produjo un incremento en su número. Si se compara el efecto en la promoción de inducción de brotes y hojas de los tratamientos factoriales iniciales, con los obtenidos en la segunda fase del ensayo se determina que el efecto sobre el promedio de hojas y brotes producido en todas las interacciones fue menor que con los efectos simples. El menor promedio se obtuvo con la interacción sacarosa-temperatura en cuanto al número de

Cuadro 14. Promedios mensuales de las variables evaluadas, con las diferentes interacciones probadas

Tratamiento	Mes						Variable
	1	2	3	4	5	6	
Testigo T-RRS T-Sacarosa	4,495	5,373	5,858	5,779	6,527	6,66	Incremento en peso (mg)
	3,165	3,479	4,39	4,187	4,700	4,557	
	2,703	3,572	1,791				
Testigo T-RRS T-Sacarosa	1,950	2,386	2,571	3,035	2,532	2,483	Incremento en longitud (mm)
	0,7618	1,28	1,801	1,854	2,232	2,243	
	0,886	1,516	1,791	1,492	1,681	3,105	
Testigo T-RRS T-Sacarosa	2,779	3,317	3,679	3,805	4,434	4,348	Peso seco (mg)
	2,111	2,265	2,661	2,666	2,913	2,887	
	1,918	2,214	2,689	2,597	3,142	3,882	
Testigo T-RRS T-Sacarosa	2,435	3,413	3,557	3,773	3,692	3,70	Número de hojas
	2,056	2,267	3,568	2,999	3,355	3,35	
	1,765	2,522	2,895	2,402	3,903	4,074	
Testigo T-RRS T-Sacarosa	0,938	1,115	1,172	1,036	1,094	1,287	Número de brotes
	0,977	0,946	0,932	1,06	1,356	1,257	
	1,072	1,037	1,441	1,281	1,845	1,910	



**Fig 32: Número de hojas formadas de novo por mes con Interacción de temperatura con ASA y sacarosa**



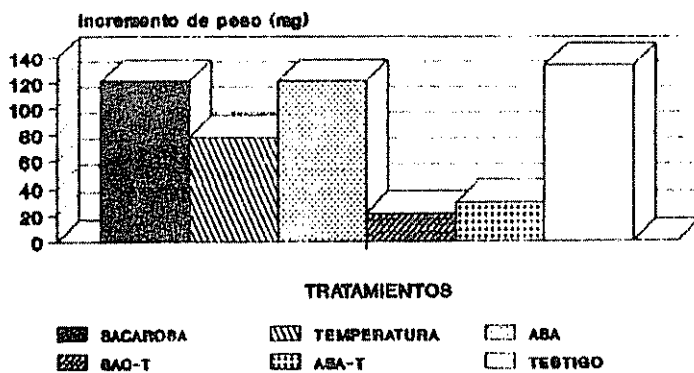
**Fig 33: Brotes producidos en un lapso de seis meses con las diferentes Interacciones**



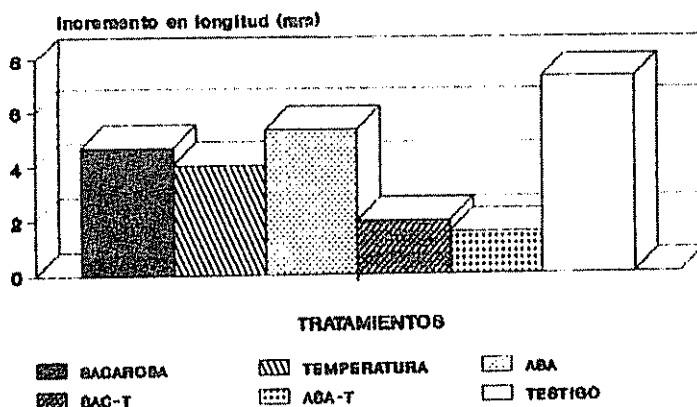
hojas y AAS-temperatura respecto al número de brotes (Figuras 36 y 37).

La rizogénesis se inhibió con los tratamientos causantes de estrés, la combinación temperatura-sacarosa ejerció mayor efecto inhibitorio, (Figura 38), solamente se formó un 1,67% de raíces en este caso. La organogénesis que dio origen a la formación de raíces se presentó en un porcentaje del 3.5% en el tratamiento de interacción temperatura-AAS, promedio muy inferior al 34.5% del experimento sin AAS, temperatura ambiente y sacarosa estandar (Figura 38). Asimismo, la longitud de las raíces fue mucho menor en promedio que la del experimento en condición estandar; en el primer caso la longitud promedio fue de aproximadamente 2 mm y en el segundo de 70 mm (Figura 39).

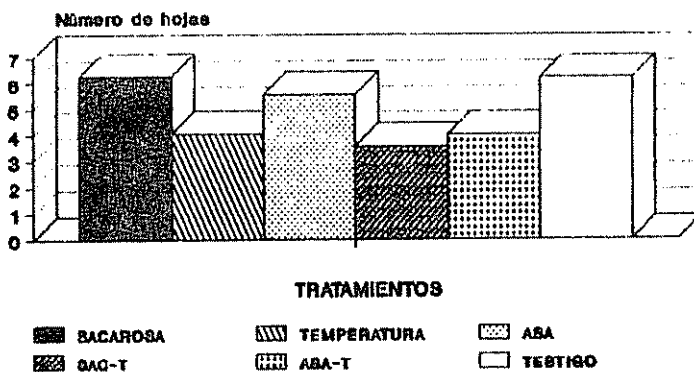
La sobrevivencia de los tratamientos fue mayor en el testigo, con un porcentaje del 90%. En el tratamiento de alto nivel de sacarosa sobrevivieron el 82% de los explantes y en el implementado con AAS, la tasa de sobrevivencia alcanzó el 79.2%. Las plantas se mantuvieron por más tiempo con una coloración verde normal, en los tratamientos con altas concentraciones de sacarosa y en el testigo. Los explantes sometidos al tratamiento con el ácido acetyl salicílico mostraron una tendencia a cambiar



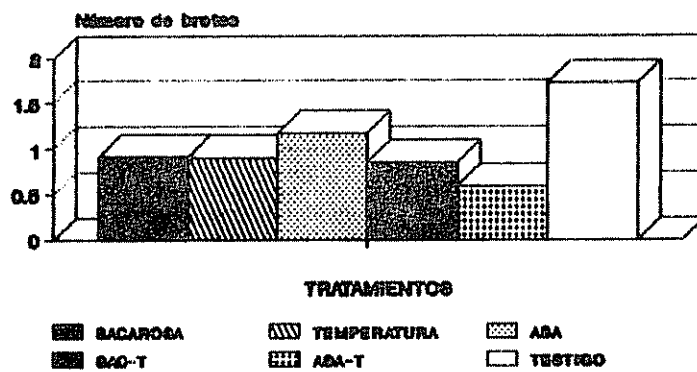
**Fig 34: Incremento de peso en diferentes tratamientos a los 30 días de la siembra**



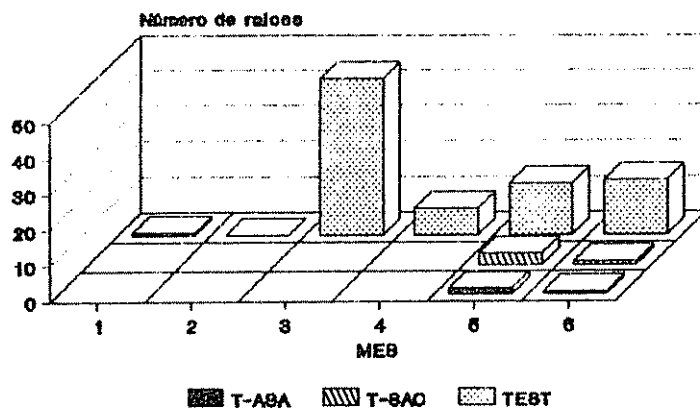
**Fig 35: Incremento en longitud de los tratamientos a los 30 días de siembra**



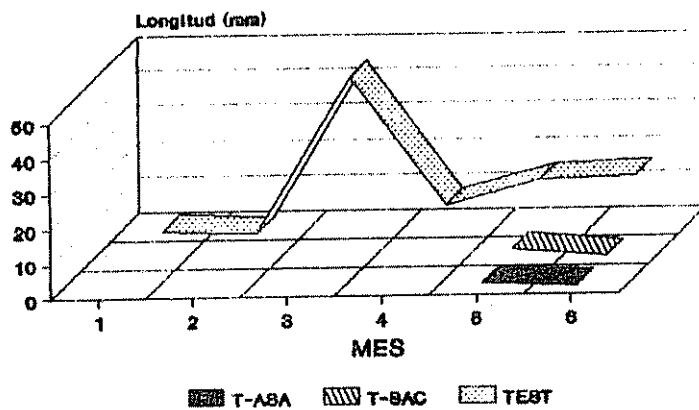
**Fig 36: Número de hojas promedio producidas en los distintos tratamientos a 30 días de la siembra**



**Fig 37: Promedio de brotes inducidos en los tratamientos al mes de la inoculación**



**Fig 38 : Presencia de raíces en los diferentes tratamientos**



**Fig 39: Longitud promedio de raíz por tratamiento y por mes**

Cuadro 15. Promedio global de incremento de peso, incremento de longitud, peso seco, número de hojas y brotes a los seis meses de conservación in vitro de S. edule, en las diferentes combinaciones de temperatura - PARS - Sacarosa

Tratamiento	Incremento X de peso (mg)		Incremento X de longitud (mm)		Variables Peso seco (mg)		Número de hojas		Número de brotes	
	X	Agrupamiento Duncan	X	Agrupamiento Duncan	X	Agrupamiento Duncan	X	Agrupamiento Duncan	X	Agrupamiento Duncan
Testigo	5,782	a	2,493	a	2,493	a	3,428	a	1,1055	b
T - PARS	4,081	b	1,699	b	1,699	b	2,757	b	1,0878	b
T - Sacarosa	4,047	b	1,745	b	1,745	b	2,927	b	1,4308	a

de color, tomando tonos amarillentos y cafezuscos que se manifestaban en forma temprana en la parte inferior del explante y luego se extendía a zonas de localización superior.

## 5. DISCUSION DE RESULTADOS

### 5.1 Micropropagación

#### 5.1.1 Control de la contaminación

El chayote mostró ser una planta con buen potencial de morfogénesis *in vitro*. No obstante, la contaminación por bacterias endógenas fue uno de los factores limitantes de la presente investigación. En un estudio bacteriológico efectuado a los explantes se determinó la presencia de cinco tipos diferentes de bacterias, del tipo Gram + y Gram - de difícil combate. La erradicación de contaminantes es difícil por la susceptibilidad de los explantes a la desinfección con hipoclorito de sodio, que provoca la pérdida de clorofila y por ende aumenta el nivel de mortalidad de las plantas. Por lo tanto, es recomendable el empleo de hipoclorito de calcio a concentraciones no mayores del 4% (p/v).

La inoculación en medios con antibióticos debe ser estudiada con detenimiento para evitar posibles alteraciones morfológicas en los explantes y otros efectos indeseables que estos compuestos podrían provocar.

Aunque en el transcurso de esta investigación se obtuvieron logros importantes en el establecimiento *in vitro* de esta especie, se ha informado que esta planta

presenta dificultades para el establecimiento y manejo en condiciones asépticas (Somarribas, *et al* 1990). No fue posible desarrollar la fase de conservación de germoplasma utilizando material vegetal extraído del campo, debido a que el número de explantes requeridos para el trabajo era muy elevado, y era indispensable contar con un grado de sanidad adecuado para efectuar la investigación.

En forma paralela se desarrollaron trabajos con la finalidad de buscar el explante ideal para la implementación de un banco de germoplasma *in vitro* en un futuro cercano. Se realizaron varios ensayos de inoculación de meristemos caulinares terminales. El cultivo de meristemos, han sido empleados en forma sistemática desde que Morel en 1952 implementó su siembra en dalia y Martin en papa en 1955 para la obtención de clones sanos a partir de plantas infestadas por virus. En 1960 Morel generalizó su uso en orquídeas, y determinó que el cultivo de meristemos, además de ser de interés fitosanitario permite la multiplicación con un coeficiente muy elevado (Margara, 1988; Gautheret, 1985). Los meristemos proveen un sistema biológico organizado, de alta estabilidad genética recomendado para la implementación de bancos de germoplasma *in vitro* (IBPGR, 1985). Sin embargo, en esta investigación no obtuvieron los resultados esperados, debido a que se produjo inducción de callo con



la siembra de meristemas que por demás tuvieron un crecimiento relativamente pobre (Cuadro 4). Los resultados anteriormente descritos coinciden con los encontrados por Somarríbas y col (1990), estos autores no observaron diferenciación de plantas a partir de este explante.

Saint Pierre, Miville, y Dion (1984), informaron que el ASA posee acción bactericida. lo que lo convierte en una alternativa en casos en que los desinfectantes no controlan la presencia de microorganismos contaminantes en los medios iniciales de siembra para el establecimiento *in vitro*, como sucede con *S. edule*.

## 5.2 Respuestas morfogénicas

La respuesta de los diferentes explantes en los distintos medios de cultivo, fue variada. Según los resultados obtenidos se puede afirmar que esta especie presenta un alto potencial morfogénico que incide sobre la tasa de regeneración.

La interacción de auxinas-citocininas parece tener efecto en los patrones morfogénicos encontrados en este ensayo. Skoog y Miller (1957) afirman que el efecto combinado de ambos tipos de reguladores varía los procesos de síntesis del ADN e incide en la elongación y en la división celular. Asimismo, el modelo de Britten-Davidson

(citado por: Strickberger, (1985), trata de explicar los diferentes patrones de respuesta a los estímulos químicos (p.ej. reguladores), por medio de la activación de diferentes baterías de genes que poseen secuencias receptoras específicas de la célula o el tejido, y que en consecuencia activan la síntesis de determinados ARN y por ende de determinadas proteínas.

Probablemente el chayote posee una concentración endógena de auxinas y citocininas apropiada para estimular la regeneración de plantas en forma directa, a partir de yemas o de microestacas, ya que la organogénesis se presentó en un medio de cultivo carente de reguladores. Estos resultados se oponen a los mencionados por Somarribas, *et al* (1990), que afirman que los reguladores exógenos son requeridos para obtener una micropropagación efectiva de este especie *in vitro*.

Los tratamientos en que se combinaron auxinas y citocininas mostraron ser efectivos en promover la organogénesis, con la mediación de una fase de callo, específicamente en la neoformación de tallo, coincidiendo con lo reportado por George y Sherrington (1984). Estos autores proponen que bajas concentraciones de auxinas combinadas con concentraciones mayores de citocininas favorecen este proceso morfogénético. Este comportamiento

ha sido estudiado en yemas axilares de *Cucumis sativus* (Handley y Chambliss, 1979) y en *Citrullus lanatus* (Barnes, 1979), en los dos casos se logró la regeneración de plantas completas.

La neoformación de tallo a partir de masas celulares (callo), se favoreció con el incremento del nivel de citocininas respecto a las auxinas (medios 12 y B 14), coincidiendo con los resultados obtenidos en callos de tabaco (Skoog y Miller, 1957).

La rizogénesis se produjo en medios sin auxinas (16), o en medios en los que se disminuyó el contenido de auxinas respecto al de citocininas, o que contenían solo citocininas. Margara (1988) afirma que las raíces neoformadas a partir de callos mantenidos *in vitro*, se originan de la desdiferenciación localizada de tejidos del explante, que pueden ser: parénquima, xilema o cambium.

La mayoría de los explantes utilizados de esta especie son fácilmente inducibles a la callogénesis. Concentraciones de 0,3 mg/l de 2,4-D promovieron la formación de callo. Resultados similares son citados en otros miembros de la familia cucurbitácea. La siembra de inóculos de raíz de *Luffa acutangula* en un medio con 2 mg/l de 2,4-D produjo callo (Halder y Gadgil, 1981). El empleo de segmentos de cotiledón e hipocótilo de *Cucurbita*

*pepo* L. en un medio M.S (1962) con diferentes combinaciones de 2,4-D (0,3 a 1mg/l) también mostraron la misma respuesta morfogénica (Jelaska, 1974).

La respuesta observada al combinar dos citoquininas: BA y 2IP (15) a la siembra de embriones sexuales y de segmentos de cotiledón, mostró una tendencia a la producción de callo con poca capacidad de crecimiento, a veces con presencia de raíces. El 2IP a una concentración de 0,5mg/l, en combinación con el GA<sub>3</sub> produjo plantas en *Cucumis melo* (Kathal, Bhatragar y Bhojwani, 1986).

En esta investigación se determinó que la respuesta morfogénica producida al incrementar el nivel de citoquininas fue la producción de callo (Cuadro 4), sin embargo, la presencia de callo también se observó en medios con auxinas y citoquininas y en medios que solo contenían citoquininas. Estos resultados coinciden con los encontrados por Somarribas, Sandoval y Müller (1990) en chayote, y se oponen a los obtenidos por Skoog y Miller (1957) en tabaco.

Los embriones sexuales se desarrollaron en forma adecuada en un medio MS enriquecido con glutamina y caseína hidrolizada, sin reguladores (E11) (Cuadro 3), así como en el medio 1, cuando se sembraron con un segmento de cotiledón. La respuesta ontogenética varió, tanto en

vigor como en crecimiento, probablemente debido a factores genéticos y a la etapa de desarrollo en que se encontraban los embriones inoculados.

Uno de los efectos más notorios del cultivo *in vitro* de *S.edule* fue la producción de brotes (medios 8 y 13), a bajas concentraciones de ANA (0,1 mg/l) en combinación con 1, 1,5, 2 y 3 mg/l de BA.

### **5.3 Efecto de la concentración de sacarosa y ASA y del factor temperatura**

#### **5.3.1 Efecto de la sacarosa**

La sacarosa ha sido descrita como el carbohidrato más empleado en cultivo de tejidos, por ser metabólicamente apropiado para la asimilación por las plantas (Thorpe, 1985). La concentración de carbohidratos parece ejercer un efecto importante en el crecimiento y la morfogénesis (Lu *et al*, 1982; Margara, 1988). Debido a la complejidad de las interacciones desencadenadas por la sacarosa tanto en el interior de la célula como en el medio de cultivo, es difícil discernir si su incidencia en diferentes procesos celulares (crecimiento, morfogénesis, y producción de metabolitos) se debe al efecto del potencial osmótico, o de la molécula de sacarosa *per se* (Thorpe, 1985).

Un número reducido de genotipos de plantas creciendo *in vitro* se han reportado como autotróficas, por lo que la mayoría requieren de una fuente de energía externa (Neumann y Bender, 1987; Thorpe, 1985). El medio de cultivo sin sacarosa empleado en este trabajo, produjo la mayor tasa de mortalidad de todos los tratamientos, lo que indica que *S. edule*, probablemente no sea un cultivo autotrófico, por lo que depende de la sacarosa suministrada en el medio de cultivo para su sobrevivencia.

En la literatura se describen rangos del 2 al 4% como apropiados para inducir al crecimiento y morfogénesis de las plantas (Thorpe, 1980)

Aunque normalmente se emplea un 3% de sacarosa en medios de crecimiento y regeneración, el presente estudio demostró que con un 4% de sacarosa se dio el mayor incremento de peso y longitud de las plantas, y al 3% se produjo la mayor tasa de formación de hojas *de novo*.

El potencial osmótico real de los medios de cultivo con sacarosa podría ser más negativo que el estimado teóricamente, debido a la hidrólisis del disacárido sufrida en el proceso de esterilización (Dunwel y Thurling, 1985).

Pequeños cambios de estrés osmótico causaron un alto reciclaje de aminoácidos, un detrimento en la concentración

de azúcares reductores y la disminución de la actividad de la invertasa en cultivo de células de caña de azúcar (Maretzi *et al*, 1972). Además la producción de metabolitos secundarios está fuertemente influenciada por el incremento en la concentración de sacarosa en cultivos en suspensión. Se cita la formación de antocianinas en *Populus*, y de betacianinas en *Phytolacca americana* (Sakuta, Takagi y Komamine, 1987).

La acumulación de prolina se ha relacionado con sintoma de estrés hídrico y su biosíntesis se realiza en el cloroplasto (Ibarra-Caballero *et al*, 1988). Las enzimas prolina deshidrogenasa y prolina oxidasa fueron inhibidas en condiciones de estrés hídrico en *Morus alba* L. (Veeranjaneyulu y Kumari, 1989).

Si existe un exceso de sacarosa sobre la demanda, los monosacáridos producto de la acción hidrolítica se acoplan nuevamente para producir sacarosa, posteriormente la sacarosa producida es hidrolizada por la invertasa endógena en glucosa y fructosa, que se acumulan en las células. Eventualmente la glucosa puede polimerizarse en almidón, algunas de estas hexosa libres y la sacarosa en una baja proporción pueden excretarse al medio nuevamente (Neumann y Bender, 1987). Un exceso de la producción de carbohidratos puede resultar en la acumulación masiva de sacarosa,

almidón o fructanos (Baydorfer Y VanDerWoude, 1988) y de hexosas (Neumann y Bender, 1987), como una respuesta adaptativa a la condición de estrés. Debido a que la glucosa produce un potencial osmótico más negativo que una solución de la misma molaridad de la sacarosa, es probable que los medios de cultivo con altas concentraciones del disacárido que fueron empleados en este ensayo se comporten produciendo potenciales osmóticos menores (más negativos) que los teóricos.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con las observaciones de algunos autores que determinaron que un incremento del nivel de sacarosa (Love, Rhodes y Moyer, 1987) y la ausencia de ésta (Brown, Leung y Thorpe, 1979) provocó la disminución en la tasa de crecimiento en callos de tabaco por reducción del potencial hídrico.

Algunas especies pueden sobrevivir por largos períodos en ausencia de carbohidratos, para lo cual requieren de un considerable grado de flexibilidad metabólica. Cuando en el medio de cultivo se omite la sacarosa, como primera instancia se consume la sacarosa vacuolar, manteniéndose una alta tasa metabólica. Si la permanencia del tejido en el medio se prolonga, se utilizan otras fuentes de energía como son los almidones, una vez que éstos son consumidos, se oxidan proteínas y lípidos que se encuentran conformando



estructuras definidas de la célula (Baysdorfer y VanDerWoude, 1988; Rebeille *et al*, 1985). En la especie empleada en esta investigación, parecen estar ausentes los mecanismos adaptativos compensatorios que aseguren su sobrevivencia por largos períodos en un medio sin sacarosa.

Se ha encontrado que el tamaño celular disminuye conforme se incrementa la concentración de sacarosa, pero el número de células se ve afectado tanto por la concentración de sacarosa como por el potencial hídrico (Sakuta, Takagi y Komamine, 1987).

Los diversos patrones morfogenéticos seguidos en células, órganos o tejidos *in vitro* pueden ser encausados con el uso de varios factores externos, entre los que se citan: reguladores del crecimiento, luz y suplemento de carbohidratos (tipo y concentración), como se ha demostrado en diversos sistemas biológicos y en modelos de capas celulares delgadas (Tran Than Van y Trinh, 1983).

Además del rol de fuente energética, este disacárido se cita como un factor que incide en los patrones de diferenciación del xilema (Aloni, 1980; Thorpe, 1985).

Niveles altos de sacarosa (10, 12 y 15%) en cultivo de callos de *Nicotiana tabbacum* L., provocaron una reversión de las células meristemoides a células parenquimáticas

(Hammersley-Straw y Thorpe, 1987) En tanto, un rango de 0 a 8% (p/v) de sacarosa fue probado y tuvo efecto significativo sobre el desarrollo de raíz, tallo y microtuberización en dos especies de *Dioscorea* (Mantell y Hugo, 1989).

En esta investigación se encontró que niveles de 80 g/l influyeron en la producción de una alta tasa de inducción de brotes. Concentraciones superiores al 8% afectaron no solo el crecimiento, sino también la morfogénesis, coincidiendo con lo encontrado por Lu *et al* (1982) y por Hammersley-Straw y Thorpe (1987).

Otro efecto importante de este disacárido es la inhibición de la síntesis de clorofila, este proceso se ha mencionado en cultivos con altas concentraciones de azúcares (Gross y Ritcher, 1982), pero la tasa de inhibición aumenta si se retira el azúcar del medio de cultivo (Dalton, 1980). Las respuestas parecen ser, sin embargo, muy específicas (George y Sherrington, 1984). El mecanismo por el cual se da la inhibición parece estar relacionado con una disminución de la tasa de formación de la clorofila, por medio de la reducción de la síntesis del ALA (ácido 5-aminolaevalínico), precursor de las moléculas de porfirina que son parte de la estructura de la clorofila (Pamplin y Chapman, 1975 citado por: George y Sherrington,

1984). En esta investigación se observaron cambios drásticos de color, en explantes inoculados en el medio carente de sacarosa y en medios que contenían ASA, no así en medios con altos porcentajes de sacarosa. Sin embargo, la incubación prolongada en cualquiera de los medios empleados repercutió sensiblemente en la producción de hojas verde muy claro o que se tornaron ligeramente blancas.

### 5.3.2 Efecto del ASA

Los salicilatos tienen papeles diversos en la fisiología de las plantas. El rol en la inhibición del crecimiento, se ha citado en algunas especies, como trigo (Larqué-Saavedra, 1975) y *Solanum cardiophyllum* (López, 1968). De acuerdo con los resultados obtenidos podría incluirse a *S. edule* en esta lista ya que su crecimiento *in vitro* fue inhibido por concentraciones de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M de ASA.

Sin embargo, los resultados de esta investigación difieren de lo encontrado en *S. cardiophyllum* (López, 1968), pues en esta especie, la tasa de inhibición del crecimiento correspondió en forma inversa a la concentración del compuesto usada. En el chayote, la respuesta a los niveles de ASA empleados no mostró un

comportamiento tan claro ni fue de correspondencia inversamente proporcional. Las concentraciones de  $10^{-3}M$  y  $10^{-6}M$  no tuvieron diferencias significativas entre sí, en la inhibición del crecimiento. Aunque la concentración de  $10^{-3}M$ , fue el tratamiento donde se observó un leve aumento del desarrollo longitudinal y de incremento de peso, respecto a los otros tratamientos a los 30 días de cultivo. Esta tendencia disminuyó notablemente, conforme transcurrió el tiempo, o cuando se combinó el efecto del ASA con el de la temperatura. Si bien, es cierto que el ASA inhibió el crecimiento, no resultó ser tan efectivo como la temperatura y la sacarosa.

Las respuestas morfogénicas con la utilización de este compuesto fenólico, en chayote no coinciden con lo obtenido por López (1988), en *S. cardiophyllum*, respecto a la inducción en la producción de brotes. Probablemente porque las plantas de *S. edule* no fueron transferidas posteriormente a un medio de cultivo sin ASA, como se hizo con *S. cardiophyllum*. Sin embargo, de los tres factores utilizados fue el que indujo la mayor tasa promedio de brotes, sólo superada por el tratamiento testigo, lo mismo ocurrió con la producción de hojas bajo el efecto del ASA.

Existen varias hipótesis sobre la acción del ASA en la inhibición del crecimiento; una de las más apoyadas es la

interferencia de tipo enzimático, en las vías de degradación de auxinas específicamente del AIA, lo que provoca un desbalance de auxinas/citocininas, induciendo a la producción de brotes, debido al incremento de citocininas en proporción a las auxinas (Lee y Skoog, 1985). Otra hipótesis asegura que inhibe la producción de etileno en las fases tempranas de la siembra, que a su vez tiende a disminuir los niveles endógenos de auxinas, favoreciendo la acumulación de citocininas y por ende, la inducción de brotes (Lieberman, 1979). Esta propuesta se opone a lo encontrado por Leslie y Romani (1988), en cultivos en suspensión de pera, en que se inhibió la formación de etileno por inhibición no competitiva de la enzima EFE (formadora del etileno) que cataliza la conversión de ACC (1-amino ciclopropano-1-ácido carboxílico) a etileno. Este efecto fue dependiente de la concentración de ASA empleada. La esterificación del ácido salicílico para formar ASA, elimina su acción como desacoplador de membrana y la ortohidroxilación parece ser la clave de su acción inhibitoria (Marci *et al.*, 1988).

Los efectos observados sobre los patrones de desarrollo de las plantas, que fueron descritos en la sección de resultados, como son el alargamiento pronunciado del tallo, o por el contrario, formación de brotes laterales y ramificación de las plantas, no parecen tener

una explicación sencilla y podría especularse que se deben a una compleja interacción de reguladores endógenos del crecimiento, posiblemente afectados por la presencia del ASA.

### 5.3.3 Efecto de la temperatura

La temperatura es un factor físico que regula el crecimiento y el desarrollo global de las células tanto *in vivo* como *in vitro*. El control puede darse en forma individual, sobre las células, o sobre las vías mediadas por enzimas, y que regulan procesos que conducen al desarrollo (George y Sherrington, 1984).

Las bajas temperaturas usadas en este ensayo mostraron ser efectivas en la inhibición del crecimiento, probablemente por encontrarse en un rango inferior a la temperatura óptima de esta especie, este método fue el que produjo menor incremento de peso y longitud, así como de peso seco promedio.

La temperatura de 16°C produjo la mayor tasa de brotes de los tratamientos de temperatura, sin embargo, este número promedio de brotes no fue superado por el tratamiento testigo (25±2°C). En algunas especies, períodos fríos de 2 a 4 semanas provocan el inicio de un período morfogénico en el explante. Hilding y Welander

(1976) examinaron la respuesta morfogénica de pretratamientos con temperaturas entre los 9 y los 24°C, en *Begonia x hiemalis*, temperaturas superiores a 15°C no tuvieron efecto en la formación de tallos adicionales. Sin embargo, (Fonnesbech, 1974) informa que en *Begonia x cheimantha* temperaturas comprendidas entre los 15 y los 18°C aumentan el nivel de morfogénesis, temperaturas mayores de 18°C lo inhibían. Por lo que la temperatura inductora de estos procesos parece ser específica, probablemente controlada por patrones enzimáticos, dependientes en todo caso, del acervo genético de la especie. Se determinó que tratamientos con bajas temperaturas en plantas de cebada causaron la alteración de patrones de expresión genética que se asociaron con un número de nuevas moléculas de ARN (Hughes y Pearce, 1988).

Las bajas temperaturas pueden ser requeridas para la inducción de procesos morfogénicos, pero una vez desencadenados, éstos no son sensitivos a la temperatura (Constantin, 1981).

Las células sometidas a enfriamiento pueden tener respuestas similares a las obtenidas en células que sufren de estrés hídrico, como son el incremento de proteínas totales y de prolina (Pritchard, Grout y Short, 1985; Duncan y Widholm, 1987). Además, se han detectado

incrementos en el nivel de ácidos grasos en cloroplastos durante el proceso de enfriamiento (Graham y Patterson, 1982).

La adición de la prolina al medio de cultivo aumentó la tolerancia al frío en callos de maíz sometidos a 4°C, la prolina se produjo como respuesta al estrés causado por el frío en callos de maíz a 19°C (Duncan y Widholm, 1987).

#### 5.4 Efecto de la interacción de factores

La interacción de la temperatura como factor físico, con un compuesto causante de estrés hídrico, o con un compuesto fenólico resultó en una inhibición de todas las variables del crecimiento evaluadas, y una disminución en las respuestas de neoformación de brotes y hojas en un mayor grado que en los tratamientos que estudiaron el efecto de los factores individuales. Es interesante denotar el efecto de la interacción ASA-Temperatura, que provocó el menor incremento en longitud, inversamente a lo obtenido con el uso del ASA a 25°C. Con todas las interacciones se presentó una mayor inhibición del crecimiento, probablemente por efecto aditivo.

El tratamiento que incluyó la sacarosa resultó menos afectado por el frío, probablemente por su acción como crioprotector.



Algunos de los efectos producidos en los últimos meses del ensayo se pueden deber a que en este experimento no se contemplaron subcultivos, debido principalmente a que no se consideró necesario ya que existen informes de cultivos conservados *in vitro* por períodos de hasta un año sin subcultivo (IBPGR, 1985). Existen informes de varias especies mantenidas en crecimiento lento a bajas temperaturas, sin subcultivos tal es el caso de meristemas de frambuesa que se mantuvieron por seis años *in vitro* a 4°C en la oscuridad con adición ocasional de medio de cultivo (Mullin y Schlegel, 1978). Cultivos nodales de papa tuvieron un alto porcentaje de sobrevivencia después de 12 meses a 8°C (Wescott, 1981).

## 8. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales en que se llevó a cabo este estudio, se proponen las siguientes conclusiones:

1. El medio 1, sin reguladores del crecimiento, resultó ser el más efectivo para obtener una alta tasa de regeneración de plantas a partir del cultivo de microestacas de aproximadamente 5mm de longitud.
2. Esta especie mostró una tendencia a la formación de callo en presencia de auxinas y citocininas, en algunos casos con neoformación de plantas.
3. Se observó una alta incidencia en la producción de brotes en medios de cultivo sin reguladores y con 4% de sacarosa en cultivo de microestacas.
4. La siembra de embriones sexuales en el medio 1 fue bastante eficiente y se perfila como un medio de obtener material vegetal para conservación de embriones mediante crecimiento lento o eventualmente, en el futuro, por crioconservación, como sustitutos de un banco de semillas.
5. Las concentraciones de ASA y sacarosa, así como las temperaturas empleadas incidieron cualitativamente en

el cultivo *in vitro* de esta especie. Concentraciones de  $10^{-8}M$  de ASA, 6% de sacarosa y una temperatura de  $16^{\circ}C$ , tuvieron un mayor efecto sobre la producción de brotes.

6. Las altas concentraciones de sacarosa y los niveles de ASA empleados en combinación con una temperatura de  $16^{\circ}C$ , mostraron ser inhibidores del crecimiento, pero no de procesos morfogénéticos de este cultivo.
7. La exposición al ASA a concentraciones de  $10^{-8}M$ , por períodos de seis meses o mayores, incubados a temperaturas de  $25 \pm 2^{\circ}C$ , causa un efecto de crecimiento apical agudo.

## 7. RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos adicionales que faciliten el establecimiento *in vitro* de material de campo, para micropropagación, conservación, etc.
2. Efectuar estudios histológicos con el fin de conocer el origen y la anatomía de las estructuras y de los embrioides neoformados en callos de esta especie.
3. No emplear el ASA en conservación de germoplasma *in vitro*, hasta no conocer más sobre su mecanismo de acción y su influencia en aspectos morfológicos y genéticos de los explantes.
4. Efectuar estudios para elucidar la acción del ASA en el metabolismo de los reguladores del crecimiento. Se recomienda efectuar pruebas de medición de etileno luego de la siembra en medios con ASA o en suspensiones celulares, así como pruebas de reversión con auxinas y citocininas.
5. Se recomienda emplear combinaciones de 6% de sacarosa y 18°C en la implementación de un banco de germoplasma de esta especie, por ser el método que mostró ser único y provocó menos alteraciones morfogénicas no deseadas en las plantas.

6. Realizar un estudio de isoenzimas que permita detectar si con los métodos de inhibición usados no se producen alteraciones genéticas de importancia en el material conservado *in vitro*.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAMSON, D. 1982. Expansion and division in auxin-treated plant cells. *Canadian Journal of Botany* (Can.) 40(5):719-744.
- ALONI, R. 1980. Role of auxin and sucrose differentiation of sieve tracheary elements in plant tissue cultures. *Planta* (Alemania) 150(3):255-263.
- ALVARENGA, S.; VILLALOBOS, V. 1988. Estudio morfológico de chayote (*Sechium edule*). En: Resúmenes XXXIV. Reunión del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios. San José, Costa Rica. p.112.
- AUGEREAU, J. M.; COURTIS, D.; PETIARD, V. 1986. Long term storage at low temperatures or under mineral oil layer. *Plant Cell Reports* (Alemania) 5(5):372-378.
- BAPAT, V. A.; RAO, P.S. 1984. Regulatory factors for *in vitro* multiplication of sandalwood tree (*Santalum album* L.). 1. Shoot bud regeneration and somatic embryogenesis in hypocotyl cultures. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Plant Science* (India) 93(1):19-27.
- BARLASS, M.; SKENE, K. G. 1983. Long-term storage of grape *in vitro*. *FAO/IBPGR. Plant Genetic Resources Newsletter* (Italia) 53:19-21.
- BARNES, L. R. 1979. *In vitro* propagation of watermelon. *Scientia Horticulture* (Holanda) 11:223-227.
- BARNES, L. R.; COCHRAN, F. D.; MOTT, R. L.; HENDERSON, W. R. 1978. Potential uses of micropropagation for cucurbits. *Cucurbit Genetics Cooperative. Report* 1:21-22.
- BARTHE, P.; BULARD, C. 1982. Influence of agar and sucrose on the behaviour of dormant apple embryos cultured *in vitro*. *The New Phytologist* (G.B.) 91(#):517-529.
- BAYSDORFER, C.; VANDERWOUDE, J. 1988. Carbohydrate Responsive Proteins in the Roots of *Pennisetum americanum*. *Plant Physiology* (EE.UU.) 87:566-570.

- BEN TAL Y, CLELAND, C F 1982 Influence of giving salicylic acid for different time periods on flowering and growth in the long-day plant *Lemna gibba* Gs. *Plant Physiology* 70:287-290
- BOHM, H 1980 The formation of secondary metabolites in plant tissue and cell cultures. *In: Perspectives in plant cell and tissue culture* Ed. by I Vasil. New York, Academic Press p 183-208 (International Review of Cytology, Supplement 11B)
- BOUABDALLAH, L.; BRANCHARD, M. 1986. Regeneration of plants from callus cultures of *Cucumis melo* L. *Z Pflanzeziichtg* 96:82-85.
- BRIDGEN, M.; STABY, G 1981. Low pressure and low oxygen storage of *Nicotiana tabacum* and *Chrysanthemum morifolium* tissue cultures. *Plant Science Letters* (Holanda) 22:177-188.
- BROWN, D.C.W.; LEUNG, D.W.M.; THORPE, T.A. 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 46(1):38-41.
- \_\_\_\_\_; THORPE, T A 1980 Changes in water potential and its components during shoot formation in tobacco callus. *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 49(1):83-87.
- CAPLIN, S.M. 1959 Mineral oil overlay for conservation of plant tissue cultures. *American Journal of Botany* (EE.UU.) 46(5):324-329.
- CASSERES, E. 1980 El chayote. *En: Producción de hortalizas* Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas IICA San José, Costa Rica. p:40--44.
- CHALEFF, R, KEIL, R 1981 Genetic and physiological variability among cultured cells and regenerated plants of *Nicotiana tabacum* *Molecular and General Genetics*. 181:254-258
- CHANDLER, S F, RAGOLSKI, E; PUA, E C.; THORPE, T.A. 1987 Some morphogenetic effects of sodium sulfate on tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Holanda) 11(2):141-150.
- \_\_\_\_\_; THORPE, T A 1987. Characterization of growth, water relations, and proline accumulation in sodium sulfate tolerant callus of *Brassica napus* L. cv Westar (canola). *Plant Physiology* (EE.UU.) 84(1):106-111.

- CHRISTIANSON, M. I. 1987. Casual events in morphogenesis  
*In: Plant tissue and cell culture*. Ed by C. E. Green, D  
A. Somers. W. P. Hackett. D. D. Biesboer. Alan, R.  
Liss, New York. U.S.A. p.:45-55.
- CIAT. 1986. Documento de trabajo. Manual práctico para  
la detección electroforética de isoenzimas y otras  
proteínas. Centro Internacional de Agricultura  
Tropical. C.I.A.T. Cali, Colombia. 80 p.
- CIP. 1986. Annual Report for 1985. Centro Internacional  
de la Papa. Lima, Perú. P.:32-34
- CLAUSSEN, W., LOVEYS, B. R., HAWKER, J. S. 1986.  
Influence of sucrose and hormones on the activity  
sucrose synthase and invertase in detached leaves and  
leaf sections of eggplants (*Solanum melongena*).  
*Journal of Plant Physiology (EE.UU)* 124:345-357
- CRESS, W.A.; JOHNSON, G.V. 1987. The effect of three  
osmotic agents on free proline and amino acid pools in  
*Atriplex canescens* and *Hilaria jamesii*. *Canadian  
Journal of Botany (Can.)* 85(4):799-801.
- CONSTANTIN, M.J. 1981. Chromosome instability in cell and  
tissue cultures and regenerated plants. *Environmental  
and Experimental Botany (G.B.)* 21:359-368.
- CUSTERS, J. B. M. 1981. Hearth shape stage of *Cucumis*  
species more successful in embryo culture than advanced  
stage embryos. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*  
4:48-49.
- DALTON, C. C. 1980a. Photoautotrophy of spinach cells in  
continuous culture: Photosynthetic development and  
sustained photoautotrophic growth. *Journal Experimental  
of Botany* 31:791-804.
- DALTON, C C. 1980b. The biotechnology of green-cell  
cultures. *Biochemical Society Trans.* 8:475-477.
- \_\_\_\_\_; PEEL, E. 1983. Product formation and plant cell  
specialization: A case study of photosynthetic  
development in plant cell cultures. *Prog. Ind.  
Microbiol.* 17:109-166.
- DELGADO, H. A. 1987. Efecto del ácido acetil salicílico  
en el crecimiento de yemas de *Solanum cardiophyllum*  
(Lindl.) cultivadas *in vitro*. Tesis Mag. So.  
Chapingo, México. Colegio de Postgraduados. 86 p.



- DRYANOVSKA, O. 1985. Induced callus *in vitro* from ovaries and anthers of species from cucurbitacea family. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 38(9):1243-1244.
- DUMAS DE VAULX, R.; PITRAT, M. 1980. Application de la culture d'embryons immatures á la realisation de l'hybridation interspécifique entre *Cucurbita pepo* et *C. ecuadorensis* F, et BC<sub>1</sub>. In: Application de la Culture *in vitro* a L'Amelioration des plates potageres. Réunion EUCARPIA. Versailles: 16-18 avril, 1980. Rédaction: C. Doré. P.: 123-131.
- DUNCAN, D.R.; WIDHOLM, J.M. 1987. Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerables maize callus. *Plant Physiology (EE.UU.)* 83(3):703-708.
- DUNWELL, J. M.; THURLING, N. 1985. Role of sucrose in microspore embryo production in *Brassica napus* spp. oleifera. *Journal of Experimental Botany (G.B)* (170):1478-1491.
- DURANTON, H.; SCHANTZ, R.; KIENZT, J-G. 1984. Influence des glucides sur la synthese de la chlorophylle chez les explants calibres de topinambour cultives *in vitro*. *Bulletin de la Societe francoise de Physiologie Vegetale (Francia)* 110:186-194.
- EL-GIZARWY, A. M.; FORD-LLOYD, B.V. 1987. An *in vitro* method for the conservation and storage of garlic (*Allium sativum*) germoplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda)* 8(2):147-150.
- ENGELS, J. M. M. 1985. Chayote: a little known central american crop. *Plant Genetic Resources Newsletter (Italia)* 63:2-5.
- FASSUOLITIS, G.; NELSON, B. 1988. Interspecific hybrids of *Cucumis metuliferus* x *C. anguria* obtained through embryo culture and somatic embryogenesis. *Euphytica (Holanda)* 37:53-60.
- FLORES, E. M. 1989. El chayote, *Sechium edule* Swartz (Cucurbitacea). *Revista de Biología Tropical (Costa Rica)* 37(1):1-54.
- FONNESBECH, M. 1974. Temperature effects on shoot and root development from *Begonia* x *cheimantha* petiole segments grown *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 32:282-286.

- GALZY, R. 1969. Recherches sur la croissance de *Vitis rupertris* Scheele sain et court nové cultivé *in vitro*. a différentes températures. Annales de Phytopathologie (Francia) 1:149-166.
- GAUTHERET, R. J. 1985. History of Plant Tissue and Cell Culture: A personal account. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. II. Ed. by I Vasil. Academic Press, Inc. U.S.A. p.: 2-50.
- GEORGE, E., SHERRINGTON, P. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Eastern Press. London, England. 709 p.
- GOTTLIEB, L. D. 1971. Gel electrophoresis: A new approach to the study of evolution BioScience (U.S ) 21(16):939-944.
- GOTTLIEB, L. D. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. Annals of Missouri Botanical Garden (EE.UU) 64:181-180.
- GRAHAM, D.; PATTERSON, D.B. 1982. Responses of plants to low, nonfreezing temperatures: proteins metabolism and acclimation. Annual Review of Plant Physiology 33:347-372.
- GROSS, M.; RITCHER, G. 1982. Influence of sugars on blue light-induced synthesis of chlorophyll in cultured plant cells. Plant Cell Reports 1:288-290.
- HALDER, T.; GADGIL, V. N. 1981. Morphogenesis in some plant species of the family Cucurbitaceae. Proc. COSTED Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants. Singapore, 1981. Ed by a. N. Rao. p.:98-103.
- HANDLEY, W.; CHAMBLISS, O. 1979. *In vitro* Propagation of *Cucumis sativus* L. Hort Science (EE.UU) 14(1):22-23.
- HAMMERSLEY-STRAW, D.R.H.; THORPE, T.A. 1986. Use of osmotic inhibition in studies of shoot formation in tobacco callus cultures. Botanical Gazette (EE.UU) 149(3):303-310.
- HILDING, A.; WELANDER, T. 1976. Effect of some factors on propagation of *Begonia x hiemalis in vitro*. Swed. Journal Agricultural Research 6:181-189.

- HOLDEN, J H W ; WILLIAMS, J T. 1984. Crop genetic resources: Conservation and evaluation. George Allen & Unwin. London. 289 p.
- HYNDMAN, S.E.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN R.A. 1982. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultured rose shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Holanda) 1:229-238.
- HUGHES, M. A.; PEARCE, R. S. 1988. Low temperature treatment of barley plants causee altered gene expression in shoot meristems. *Journal of Experimental Botany* 39(207):1461-1467.
- IBARRA J.; VILLANUEVA, C.; MOLINA, J.; SANCHEZ, E. 1988. Proline accumulation as a symptom of drought stress in maize: a tissue differentiation requirement. *Journal of Experimental Botany* 39(204):889-897.
- IBPGR. 1983. IBPGR Advisory Committee on *in vitro* storage: Report of the First Meeting 18-20 August, 1982. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy. 15 p.
- \_\_\_\_\_. 1985a. IBPGR Advisory Committe on *in vitro* storage: Report of the second Meeting 10-12 September, 1984. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy. 15 p.
- IBPGR. 1985b. IBPGR Advisory Committe on *in vitro* storage. The potencial use of *in vitro* storage for temperate fruit germplasm. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy. 21 p.
- \_\_\_\_\_. 1985c. Long-term seed storage of major temperature fruits. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy.
- \_\_\_\_\_. 1986.
- IMASEKI, H.; WATANABE, A. 1978. Inhibition of ethylene production by osmotic shock. Further evidence for membrane control of ethylene production. *Plant & Cell Physiology* (Japón) 19(2):345-348.
- INOHUE, M.; YAMAMOTO, R.; MASUDA, Y. 1987. UPD-glucose level as a limiting factor for IAA-induced cell elongation in *Avena* coleoptile segments. *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 89(1):49-54.

- JELASKA, S. 1974. Embryogenesis and organogenesis in pumpkin explants. *Physiologia Plantarum* 31:257-281.
- JELASKA, S. 1986. Cucurbits. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 2 Crops I. Ed. by Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. p.371-386.
- \_\_\_\_\_; MAGNUS, V.; SCRETIN, M.; LACAN, G. 1985. Induction of embryogenic callus in *Cucurbita pepo* hypocotyl explants by indole-3-ethanol and its sugar conjugates. (Dinamarca) *Physiologia Plantarum* 64:237-242.
- JIA, S.; FU, Y.; LIN, Y. 1986. Embryogenesis and plant regeneration from cotyledon protoplast culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal Plant Physiology (Alemania)* 124:385-398.
- JULLIEN, M. 1983. Medium term preservation of mesophyll cells isolated from *Asparagus officinalis* L. Development of a simple method by storage at reduced temperature. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda)* 2(4): 305-318.
- KARTHA, K. 1981. Gene pool conservation through tissue culture. *In Proc. Costed Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants*. Singapore. Ed. A. Rao. p. 213-218.
- \_\_\_\_\_; BHATNAGU, S.; BHOJWANI, S. 1988. Regeneration of shoots from hypocotyl callus of *Cucumis melo* cv. Pusa sharbati. *Plant Physiology (EE.UU.)* 126:58-62.
- KATO, A.; HASHIMOTO, Y.; SOH, Y. 1978. Effect of temperature on the growth of tobacco cells. *J. Ferment. Technol.* 54:754-757.
- KAUL, K.; SABHARWAL, P.S. 1971. Effects of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures. *Plant Physiology (EE.UU.)* 47:891-895.
- KIAHARA, S.; WATANABE, K.; TAKIMOTO, A. 1981. Flower-inducing effect benzoic and salicylic acids in various strains of *Lemna paucicostata* and *L. minor*. *Plant & Cell Physiology* 22(5):819-821.
- KIM, S.; CHANG, J.; HYDEON, C.; LEE, K. 1988. Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12:67-74.

- KHURANA, J.; MAHESHWARI, S. 1983. Floral induction in *Wolffia microscopica* by salicylic acid and related compounds under non-inductive long days. *Plant and Cell Physiology (Japan)* 24(5):807-810.
- LARQUE-SAAVEDRA, A. 1978. The antitranspirant effect of acetyl salicylic acid on *Phaseolus vulgaris*. *Physiology Plant* 43:126-128.
- LEE, B.; MARTIN, P.; BANGERTH, F. 1989. The effect of sucrose on the levels of abscisic acid, indoleacetic acid and zeatin/zeatin riboside in wheat ears growing in liquid culture. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 77:73-80.
- LEE, T.T.; SKOOG, F. 1965. Effects of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 18:388-401.
- LESLIE, C. A.; ROMANI, R. J. 1988. Inhibition of Ethylene Biosyntheses by salicylic Acid. *Plant Physiology (E.E.UU.)* 88:833-837.
- LEBERMAN, M. 1979. Biosynthesis and action of ethylene. *Annual Review of Plant Physiology.* 30:533-591.
- LILLO, C. 1989. Effects of media components and environmental factors on shoot formation from protoplast-derived calli of *Solanum tuberosum*. *Plant, Cell and Organ Culture (Holanda)* 19(2):103-111.
- LOPEZ, H. 1987. Efecto del ácido acetil salicílico en el crecimiento de yemas de *Solanum cardiophyllum* (Lindl.) cultivados *in vitro*. Tesis Mag. Sc. Chapingo, Mexico, Colegio de Postgraduados. 88p.
- LUNDERGAN, C.; JANICK, J. 1979. Low temperature storage of *in vitro* Apple Shoots. *Horticultural Science (E.E.U.U.)* 14:514.
- MACCARTHY, J.J.; STUMPF, P.K. 1980a. Fatty-acid Composition and Biosynthesis in cell Suspension Cultures of *Glycine max* (L.) Merr; *Catharantus roseus* G. Don and *Nicotiana tabacum* L. *Planta (Alemania)* 147:364-388.
- \_\_\_\_\_; STUMPF, P.K. 1980b. The Effect of different Temperatures on Fatty-Acid Synthesis and Polyunsaturation in Cell Suspension Cultures. *Planta (Alemania)* 147:389-395.

- MACRI, F.; VIANELLO, A.; PENNAZIO, S. 1986. Salicylate-collapsed membrane potential in pea stem mitochondria. *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 67:138-140.
- MADRIZ, E. 1989. Datos de experimentación de chayote, recopilados por el Banco Central y la Dirección General de Estadística y Censo. Cartago, C. R. Coopechayote R. L. (Comunicación personal).
- MANTELL, S. H.; HUGO, S. A. 1989. Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Discorea alata* L. and *D. bulbifera* L yams. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18(1):23-37.
- MARGARA, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ed Mundi-Prensa, Madrid, España. 232p.
- MARINO, G.; ROSATI, P.; SAGNATI, F. 1985. Storage *in vitro* cultures of *Prunus* rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Holanda) 5(2):73-78.
- MILLS, P.; WOOD, R. 1984. The effects of polyacrylic acid acetylsalicylic acid and salicylic acid on resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology*. 111:209-216.
- MULLIN, R.; SCHLEGEL, P. 1976. Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. *HortScience* (E.E.U.U.) 11:100-101.
- MURASHIGE, T., SHOOG, F. 1982. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plantarum* (Dinamarca) 15:473-497.
- MURATA, T. 1983. Molecular species composition of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant and Cell Physiology* 24:81-86.
- NEUMANN, K-H., BENDER, L. 1987. Photosynthesis in cell and tissue culture systems. *In: Plant tissue and cell culture*. Ed by C. Green, D. Somers, W. Hackett, D. Biesboer. Alan R. Liss, Inc. New York. USA. p.:151-165.
- NEWSTRON, L. 1985. Collection of chayote and its wild relatives. *Plant Genetic Resources. Newsletter* (Italia) 64:14-20.

- OCHOA, N. 1985. Conservación de germoplasma. *In* Fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Ed. V. Villalobos. Chapingo, México. p. 126-138.
- OOTA, Y. 1975. Short-day flowering of *Lemma gibba* Gs induced by salicylic acid. *Plant & Cell Physiology*. 16:1131-1135.
- PANDEY, B.; GANDGIL, V. 1984. Fatty acids in cultures influence of growth factors on fatty acid composition of total lipids in callus cells. *Phytochemistry* 23 (1):51-53.
- PARKIN, K.L.; JUNG-KUO, S. 1989. Chilling-induced lipid degradation in Cucumber (*Cucumis sativa* L. cv Hybrid C) Fruit. *Plant Physiology (EE.UU.)* 90:1048-1058.
- PENNAZIO, S.; ROGERS, P.; LENZI, R. 1983. Resistance to tobacco necrosis virus induced by salicylate in detached tobacco leaves. *Antiviral Research*. 3:335-348.
- PRITCHARD, H.W.; GROUT, B.W.; SHORT, K.C. 1986. Osmotic stress as a Pregrowth Procedure for cryopreservation 2. Water relations and metabolic State of Sycamore and Soybean Cell Suspensions. *Annals of Botany (G.B.)* 57:371-378.
- PLUCKNETT, D.; SMITH, N.; WILLIAMS, J.; ANISHETTY, M. 1987. Gene banks and the world's food. Princenton Univ. Press. New Jersey. U. S. A. 247 p.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; MALEPSZY, S. 1989. A method for increased plant regeneration from immature F<sub>1</sub> and BC<sub>1</sub> embryos of *Cucurbita maxima* Duch. x *C. pepo* L. Hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda)* 18:181-194.
- RAGHAVAN, V.; SVRIVASTAVA, P. S. 1982. Embryo culture. *In: Experimental Embryology of Vascular Plants*. Ed. by B. M. Johri. Springer - Verlag. Berlin, Germany. p. 195-230.
- RAGHAVAN, V.; TORREY, J. 1984. Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of *Capsella* in culture *Plant Physiology (U.S.A.)* 38:691-699.

- REBEILLE, F.; BLIGNY, R.; MARTIN, J-B.; DOUCE, R. 1985. Effect of sucrose starvation on sycamore (*Acer pseudoplatanus*) cell carbohydrate and Pi status. *Biochemical Journal (G.B.)* 226:879-884.
- ROCA, W. 1985. El cultivo de tejidos para la conservación de los recursos genéticos *in vitro*. In: Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos (CIRF). *Lecturas sobre recursos fitogenéticos 3*. Cali, Colombia. 39 p.
- \_\_\_\_\_; HIDALGO, R.; ALVAREZ, G. 1983. Cassava Tissue culture. Genetic Resources Unit. 1982. Annual Report. CIAT. Cali, Colombia.
- RUBLUO, A. 1985. Estrategias para la preservación del germoplasma vegetal *in vitro*. In: El cultivo de tejidos vegetales en México. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México, D. F. p. 35-53.
- SAEDI, S.; GAILLOCHET, J.; BONMORT, J.; ROBLIN, G. 1984. Effects of salicylic and acetylsalicylic acids on the secotonastic and photonastic leaflet movements of *Cassia fasciculata*. *Plant Physiology (EE.UU.)* 78:851-853.
- SAGEE, O., RIOV, J., GOREN, R. 1990. Ethylene-enhanced catabolism of [<sup>14</sup>C] indole-3-acetic acid to indole-3-carboxylic acid in *Citrus* leaf tissues. *Plant Physiology (EE.UU)* 91:54-60.
- SAINT-PIERRE, B.; MIVILLE, L.; DION, P. 1984. The effects of salicylates on phenomemans related to crown gall. *Canadian Journal of Botany (Can.)* 62:729-734.
- SAKUTA, M.; TAKAGI, T. KOMAMINE, A. 1987. Effects of sucrose on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 71:455-458.
- SALA, F.; CELLA, R.; ROLLO, F. 1979. Freeze preservation of rice cells grown in suspension culture. *Physiologia Plantarum* 45:170-178.
- SCOWCROFT, W. R. 1984. Genetic variability in tissue culture: Impact of germplasm conservation and utilization. Rome IBPGR Secretarial, Technical Report AGPG:IBPGR/84/152 (Italy) 41 p.



- SCHOCH, P.; SIBI, M. 1978. Action du rayonnement sur l'indice stomatique *in situ* et en culture *in vitro* de feuilles du *Vigna sinensis* L. C. R. Acad. Sc. Paris T 287 série D. p:1285-1287.
- SIEBERTZ, H. P., HEINZ, E. BERGMANN, L. 1978. Acyl lipids in photosynthetically active tissue cultures of tobacco. Plant Sci. Letters. 12:119-126.
- SIMPSON, M. J. A.; WITHERS, L. A. 1988. Characterization of Plant Genetic Resources Using Isozyme Electrophoresis: A Guide to the Literature. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy. 102p.
- SOMARRIBAS G.; SANDOVAL, J.; MULLER, L. 1990. Aspectos de la fase de establecimiento *in vitro* de chayote (*Sechium edule* (Jacq). Sw. (en prensa).
- STRICKBERGER, M. W. 1985. Genetics. 3rd. ed. Macmillan Co. USA. 841p.
- TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. 1980. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 48(1):121-125.
- THORPE, T.A. 1980. Organogenesis *in vitro*: structural physiological and biochemical aspects. In: Perspectives in plant cell and tissue culture. Ed. by I.K. Vasil. New York Academic Press. p.71-111. (International Review of Cytology. Supplement 11A).
- \_\_\_\_\_. 1985. Carbohydrate utilization and metabolism. In: Tissue Culture in Forestry. Ed. by J.M. Bonga; D.J. Durzan. 2nd. ed. Dordrecht. Martinus Nijhoff/Dr. w-Junk. p.325-388.
- TRAN THANH VAN, K.; TRINH, T. H. 1983. Fundamental and applied aspects of differentiation *in vitro* and *in vivo*. In: Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 4. Ed by D. Evans, W. Sharp, P. Ammirato. Macmillan Co. USA. p.:316-335
- VAJRANABHAIAH, S.; METHA, R. 1977. Effects of kinetin on growth and nucleic acid metabolism in suspension cultures of *Cucumis melo* L. Annals of Botany 41:483-491.

- VEERANJANEYULU, K.; KUMARI, R. 1989. Proline metabolism during water stress in mulberry. *Journal of Experimental Botany* 40(214):581-583.
- WANG, C. Y.; ADAMS D. O. 1982. Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus* L). *Plant Physiology (EE.UU)* 89:424-427.
- WEHNER, T.; LOCY, R. 1981. *In vitro* adventitious shoot and root formation of cultivars and lines of *Cucumis sativus* L. *Hort Science (U.S.)* 16(6):759-760.
- WESTCOTT, R. J. 1981a. Tissue culture storage of potato germplasm. 1. Minimal growth storage. *Potato Research (Holanda)* 24:343-352.
- WESTCOTT, R. J. 1981b. Tissue culture storage of potato germplasm. 2. Use of growth retardants. *Potato Research (Holanda)* 24:343-352.
- WITHERS, L. A. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. *International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy.* 91 p.
- \_\_\_\_\_. 1987. The low temperature preservation of plant cell, tissue and organ cultures and seed for genetic conservation and improved agricultural practice. In: *The Effects of Low Temperatures on Biological Systems.* Ed. by B.W. Grout and G.J. Morris. Edward Arnold Ltd. p:398-409.
- \_\_\_\_\_. 1983. Germoplasm preservation through tissue culture: an overview. In: *Cell and Tissue Culture techniques for cereal crop improvement.* Science Press, Beijing, China. 314-341.
- \_\_\_\_\_. 1984. Germoplasm conservation *in vitro*: present state of research and its application. In: J. H. W. Holden; J. T. Williams; eds. 1984. *Crop genetic resources: conservation and evaluation.* George Allen and Unwin, London, U. K. p. 138-157.
- WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. 1986. *In vitro* conservation. IBPGR. *Research Highlights 1984-1985.* Rome, Italy. 21 p.
- YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35:155-189.