

Micropropagación de fenotipos seleccionados de chayote

Investigadora responsable: M.Sc. Silvana Alvarenga V.
M.Sc. Dora Ma. Flores Mora, Investigadora
M.Sc. Ana Abdelnour Esquivel, Investigadora
Departamento de Biología

Resumen

Los agricultores de la Zona de Ujarrás de Cartago, Costa Rica, no han podido cumplir con las especificaciones para la exportación de chayote (sanidad del fruto, forma, color y textura de la epidermis), por no contar con material genético sobresaliente y han sufrido un alto porcentaje de rechazo del fruto de exportación.

En esta investigación se muestrearon y seleccionaron plantas con características fenotípicas deseables para la exportación del fruto, y que mostraban algún grado de resistencia a plagas y enfermedades.

Los 6 fenotipos seleccionados fueron multiplicados *in vitro* a través de la inoculación de embriones sexuales y de brotes, validándose así el protocolo de micropropagación por fenotipo. El medio de cultivo más efectivo para la inoculación *in vitro* del chayote, fue el de Murashige & Skoog (1962) complementado con vitaminas (MS), myo-Inositol y 30 g/l de sacarosa. Este medio de cultivo fue el apropiado para la germinación y el desarrollo de embriones sexuales y la multiplicación del clon 13. Sin embargo, se logró una buena respuesta de los clones 15, 17, 21, 28 y 29 adicionando al medio básico, 0,1 mg/l de BA y 0,5 mg/l de GA₃.

Para el desarrollo de la metodología del cultivo de meristemas se utilizó el clon 13. Los meristemas inoculados en el medio básico suplementado con 0,1 mg/l de

BA y 0,1 mg/l de GA₃ mostraron un alto porcentaje de organogénesis y produjeron brotes bien diferenciados. Posteriormente, se desarrolló el proceso de aclimatación y se evaluó el comportamiento en el campo de las vitroplantas que mostraron características de resistencia a enfermedades y alta producción de frutos similares a las plantas donadoras.

Abstract

The constant rejection of fruit for exportation has been a major problem for farmers from the Ujarrás area in Cartago. Since farmers do not have outstanding genetic material, they have not been able to meet the specifications for exportation (health, shape, color, and cuticle texture of the fruit).

For this research, sample plants with desirable phenotypic traits for exportation were selected. These plants were resistant to plagues and diseases and high yield. The six phenotypes selected were multiplied *in vitro* through the inoculation of buds and sexual embryos, thus validating the protocol of micropropagation for each phenotype.

Murashige and Skoog's culture media (1962) was chosen as the most effective one for inoculation *in vitro*, complemented with vitamins (MS), myoInositol and 30 g/l of sucrose. This culture media was the appropriate one for the germination and development of sexual embryos and the

multiplication of clone 13. However, there was also a good response of clones 15, 17, 21, 28, and 29 by adding 0,1 mg/l of BA and 0,5 mg/l GA₃ to the basic media.

For the development of the methodology of the culture of the meristems, clone 13 was used. The meristems inoculated in the basic media, supplemented with 0,1 g/l of BA and 0,1 mg/l of GA₃, showed a high percentage of organogenesis and produced well-differentiated buds. Later on, the acclimatization process was developed, and the behavior of the vitro plants was evaluated in the field. They showed resistance to diseases and fruit production similar to the donor's.

Descripción del problema

El principal importador del chayote de nuestro país es Estados Unidos. Sin embargo, también se exporta a Gran Caimán, Suiza y Alemania pero en menores volúmenes.

Estos mercados se caracterizan por ser muy exigentes en cuanto a la calidad de la fruta que consumen, por lo tanto, el producto debe cumplir estrictas normas para que no sea rechazado. Entre ellas se citan el estado fitosanitario, la forma y el color del fruto, la ausencia de espinas y los residuos de pesticidas en el producto. De manera que el chayote debe ser sometido a un intensivo programa de selección y mejora genética, en forma paralela con un manejo cultural y post cosecha adecuado, que garanticen calidad y volumen de producción, y aseguren así la permanencia de la fruta en el mercado internacional.

Por lo anterior, se requería el desarrollo de un programa de mejoramiento que contemplara la selección de características deseables, paralelo al establecimiento de un método de propagación asexual masiva del material previamente seleccionado.

Objetivos propuestos

El presente proyecto tuvo como objetivo general el desarrollo de la metodología de selección de fenotipos superiores de chayote, su posterior micropropagación, aclimatación, siembra y evaluación en el campo.

Objetivos específicos

- Realizar un estudio fenotípico de plantas de chayote en el valle de Ujarrás, con el fin de seleccionar los fenotipos con características sobresalientes que sirvieran como fuente de explantes.
- Implementar una metodología que garantizara una propagación rápida, eficiente, relativamente barata y que asegurara la transmisión de las características de la planta donadora de explantes.
- Desarrollar ensayos conducentes a lograr la aclimatación de las plantas producidas *in vitro* para su posterior traslado a las condiciones de campo donde se evaluó su comportamiento.

Metodología empleada

1. Selección de fenotipos sobresalientes.

El trabajo se inició en 1989, con la evaluación de 250 plantas, de las que, inicialmente, se seleccionaron 34 que se reprodujeron por clones; posteriormente se escogieron 6 clones que fueron utilizados en el desarrollo de este proyecto. Se consideraron las siguientes variables:

- Características del fruto: diámetro, peso, longitud y apariencia (surcos y espinas).
- Crecimiento de las plantas: longitud de las guías, relación largo-ancho de las hojas y longitud del entrenudo.
- Producción: número de frutos/clon, porcentaje (%) de frutos exportables clon, frutos con daño mecánico/clon, número de frutos con daños provocados por insectos y hongos (*Ascochyta*,

Phoma y *Mycovellosiela*) / clon y número de frutos deformes/clon.

2. Desarrollo de la metodología de reproducción *in vitro*.

A. Constitución del banco de explantes.

En la finca experimental de la Cooperativa Coopechayote R.L., ubicada en el Valle de Ujarrás, se colectaron 20 frutos/clon, de los 6 clones seleccionados, identificados por los números: 13, 15, 17, 21, 28 y 29. Posteriormente fueron trasladados al laboratorio con el fin de iniciar los estudios de micropropagación.

B. Establecimiento de los materiales *in vitro*.

Se desarrolló la metodología para lograr el establecimiento *in vitro* de los clones seleccionados, empleando como explantes: embriones sexuales, microestacas y ápices meristemáticos. A continuación se detallan los protocolos desarrollados:

a. Desinfección del material

Embriones

Los frutos enteros de los clones 13, 15, 17, 21, 28 y 29, se lavaron con agua y jabón, luego se les eliminó toda la pulpa y se procedió a extraer la semilla, ésta fue tratada con hipoclorito de calcio al 4% por 10 minutos, posteriormente se lavó en agua estéril tres veces bajo condiciones asépticas.

Material vegetativo

Además de embriones, se emplearon como explantes, meristemos y microestacas de los clones. En el caso del material vegetativo, los explantes seleccionados se sometieron a un lavado con agua y jabón, luego se desinfectaron con hipoclorito de calcio al 4% y al 6%, durante 10 minutos, respectivamente. Por último se lavó el mate-

rial con agua estéril tres veces bajo condiciones asépticas.

b. Siembra *in vitro*

Embriones

Una vez desinfectadas las semillas y bajo condiciones asépticas, se procedió a aislar el embrión con parte de los cotiledones. Estos se sembraron en frascos que contenían el siguiente medio de cultivo: sales minerales y vitaminas descritas por Murashige & Skoog (1962), 100 mg/l de myo-Inositol, 30 g/l de sacarosa y 1,8 g/l de Phyta-Gel. Se ajustó el pH a 5,7 antes de esterilizarse en autoclave (23 minutos, 1,1 kg/cm³).

Material vegetativo

Respecto de la inducción del crecimiento de los diferentes clones de chayote, se procedió a evaluar el efecto de combinar BA y GA₃. Inicialmente se probó la adición de 0; 0,1 y 0,5 mg/l de BA y 0, 0,5 y 1 mg/l de GA₃ en el medio de cultivo de todos los clones.

En la inoculación *in vitro* de los clones 13 y 21 se probó el efecto de la adición de Bencil Adenina (BA) (0,05 mg/l) y de Ácido Giberélico (GA₃) (0,1 y 2 mg/l) sobre el crecimiento y la brotación de las vitroplantas.

Meristemos

En cuanto al cultivo de meristemos se ensayó el efecto de los siguientes compuestos: giberelinas (100, 150 y 250 mg/l) de GA₃; vitaminas (25, 50 y 100 mg/l), de Pantotenato de Calcio, citocininas (1 y 2 mg/l) de BA y auxinas (0,3 y 3 mg/l) de ANA.

Posteriormente, con base en los resultados obtenidos se probó el efecto sinérgico de citocininas, auxinas

y giberelinas sobre el crecimiento de las vitroplantas a partir de meristemos.

Los cultivos inoculados in vitro (embriones, microestacas y meristemos) fueron colocados en el cuarto de crecimiento bajo condiciones de iluminación (2000 lux), con un fotoperíodo de 16 horas y a una temperatura promedio de 22°C. Se realizaron observaciones semanales del porcentaje de sobrevivencia, contaminación, crecimiento y morfogénesis.

Aclimatación de vitroplantas

Se desarrollaron diferentes ensayos, a fin de uniformar el tamaño de la vitroplanta por aclimatar, el desarrollo del sistema radical, y condiciones de cultivo (sustrato, riego, fertilización, etc.).

Las vitroplantas se llevaron al invernadero en frascos de cultivo que contenían plántulas de varios tamaños (de 3 a 10 cm), las que se sembraron en un sustrato estéril compuesto de tierra y granza de arroz (3 : 1) previamente desinfectado con Busamid, contenido en bolsas plásticas de color negro. Durante los primeros 8 días permanecieron en el frasco, posteriormente las plántulas se sembraron en el sustrato mencionado.

Transferencia al campo de las plantas producidas in vitro

Una vez que las plántulas alcanzaron un tamaño de 20 cm o más y mostraron un desarrollo vigoroso, fueron transferidas al campo. Al inicio se colocaron bajo sombra por unos días y posteriormente se sembraron siguiendo los procedimientos usuales, (3 x 3 m, con aplicaciones de abono al momento de la siembra y luego cada 22 días). También se realizó el combate de malezas por deshierba manual y herbicidas siguiendo las prácticas usuales del agricultor.

Se evaluó el crecimiento y la producción de frutos de los diferentes clones, así como la resistencia al ataque de hongos.

Resultados alcanzados

Siembra in vitro

Embriones

En los embriones inoculados con segmentos de cotiledón en el medio Murashige & Skoog (1962) complementado con vitaminas y myo-Inositol se obtuvo una buena respuesta para la germinación y el desarrollo de las vitroplantas.

Material vegetativo

Al adicionar al medio de cultivo mezclas de reguladores (0,1 mg/l de BA y 0,5 mg/l de GA₃) se observó un crecimiento vigoroso de los explantes, coloración verde homogénea y un buen desarrollo de yemas en todos los clones, exceptuando al clon 13. Actualmente los clones 15, 17, 21, 27 y 28 se multiplican rutinariamente en este medio de cultivo y el clon 13 en el medio Murashige & Skoog (1962) básico.

Cultivo de meristemos

Debido a la detección de virus en el material vegetal de los clones seleccionados, se procedió a planificar la investigación con el fin de lograr el establecimiento del cultivo de meristemos y de esta manera desarrollar el método de esta micropropagación asegurándose la limpieza de los materiales.

Al inicio, se establecieron ensayos con altas concentraciones de BA, GA₃ y Acido Naftalenacético (ANA) y a pesar de que algunos tratamientos produjeron callogénesis y otros organogénesis, ninguno de los tratamientos evaluados indujo altos porcentajes de regeneración de plantas. Se continuó la investigación evaluando la respuesta de los meristemos a menores concentraciones de BA, GA₃ y ANA (Cuadros 1 y 2).

Como se observa en el Cuadro 1, el tratamiento que consistió en adicionar 0,1 mgr/l de BA + 0,7 mg/l de GA₃ al medio de cultivo indujo la mayor respuesta organogénica en los meristemos de chayote. Aquellos

tratamientos que incluyeron ANA aún cuando indujeron organogénesis en varios porcentajes, formaron callo en la base y tallo de las plantas.

De los resultados obtenidos en las diferentes pruebas se pudo comprobar que los dos mejores tratamientos para la obtención de plantas a partir de meristemos fue la combinación de 0,1 mg/l de BA con 0,1 mg/l de GA₃ en el cual se obtuvo un 93,3% de organogénesis (Cuadro 2). Los brotes se observaron verdes y bien diferenciados. En el tratamiento que empleó

0,2 mg/l de BA se observó un 86,6% de organogénesis y los brotes producidos bien desarrollados y de color verde (Cuadro 2). Una vez obtenida la planta a partir del meristemo, las subsiguientes multiplicaciones se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita para multiplicación del clon 13.

Aclimatación de las plantas producidas in vitro

A fin de lograr la aclimatación exitosa de las vitroplantas, se controlaron los diferentes factores

Cuadro 1

Efecto de varios reguladores del crecimiento sobre el desarrollo de plantas a partir de meristemos de chayote del clon 13

Tratamiento (mg/l)	Organogénesis (%)	Callogénesis (%)
0 BA	38	62
0,1 BA + 3 ANA	50	50
0,1 BA + 0,3 ANA	18	82
0,1 BA + 0,7 GA ₃	73	27
0,1 BA + 3 ANA + 0,7 GA ₃	50	50
0,1 BA + 0,3 ANA + 0,7 GA ₃	20	80
0,1 BA + 0,3 ANA + 1,8 GA ₃	0	100

Cuadro 2

Efecto de la Benciladenina y el Ácido Giberélico sobre el crecimiento de meristemos del clon 13 de chayote

Tratamiento BA/GA ₃	Organogénesis (%)	Observaciones
0,05/0,04	87,5	Poco crecimiento, plántulas amarillentas, presencia de vitrificación.
0,05/1,0	86,7	Brotes verdes, poco crecimiento.
0,1/0,1	93,3	Brotes bien diferenciados, verdes. Presencia de callo en la base del explante.
0,1/1,0	53,3	Muy poco crecimiento de brotes, presencia de callo.
0,2/0	86,6	Brotes verdes, bien desarrollados.
0,2/0,2	63,6	Brotes diferenciados, verdes y presencia de callo.

que las afectan, para lo que se hicieron las modificaciones del caso. Algunas de estas fueron: que las vitroplantas no midieran menos de 8 cm de longitud y con sistema radical bien desarrollado. Se llevaron al invernadero una semana antes de la siembra. Esto permitió que las plántulas tuvieran un período de preaclimatación sin sufrir estrés hídrico. Una vez sembradas, se cubrieron con plástico transparente y sarán negro (50%) durante 22 días. De esta manera se logró aumentar la humedad relativa y disminuir la luminosidad lo que influyó positivamente en la sobrevivencia de las plantas. Posteriormente el plástico fue eliminado y se dejaron cubiertas por el sarán, el cual se eliminó 4 semanas después. Se logró un porcentaje de sobrevivencia superior al 60% en los clones 17,28 y 29; en tanto que los clones 13 y 15 mostraron un porcentaje de 71,4%.

Luego, estas plantas fueron transferidas al campo donde se evaluó su desarrollo y productividad.

Evaluación de las vitroplantas transferidas al campo

La sobrevivencia del material fue del 90% aproximadamente. En general el crecimiento fue rápido y vigoroso; los clones 13, 17, 28 y 29 sobresalieron sobre el clon 15 y el clon 21. Algunas plantas mostraron un mayor desarrollo de follaje. No se observaron cambios morfológicos en las plántulas transferidas al campo.

Los frutos producidos conservaron el color y la forma deseados, así como una epidermis sin espinas ni estrías, características indispensables para el mercado de exportación.

Las partes vegetativas fueron infectadas por las plagas de la zona, como son: la mosca blanca: de la Familia Aleyrodidae, Araña roja: *Tetranychus* sp, y enfermedades fungosas como: *Ascochyta*, sin embargo, la incidencia de ataque a los frutos por *Ascochyta Phoma* y *Mycovellosyella* fue mínima.

Impacto

Actualmente los agricultores disponen de una tecnología que les permite la obtención de frutos de calidad y altos rendimientos para competir en el mercado internacional.

En el proceso de la transferencia y adopción de la tecnología se trabajó "mano a mano" con los agricultores de manera tal que se lograra la transferencia en forma exitosa.

Sin embargo, el crear conciencia en los productores sobre los cambios metodológicos y las necesidades de contar con una infraestructura adecuada no se da a la velocidad que se requiere.

Organismos que aportaron financiamiento

El proyecto fue financiado por el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), a través del convenio de Cooperación BID-CONICIT; además, el Instituto Tecnológico de Costa Rica fue la contraparte que brindó el aporte humano y la infraestructura.

La cooperativa de agricultores Coopechayote R.L. aportó el material vegetal, y en las fincas de los asociados se sembró el material obtenido *in vitro*. Posteriormente, se contó con la colaboración de agricultores independientes en cuyos terrenos se probó y evaluó el desarrollo de las vitroplantas en el campo.

Referencias bibliográficas

- Alvarenga, S.; Villalobos, V. 1988. *Estudio morfogénico de chayote (Sechium edule)*. En: Resúmenes XXXIV. Reunión del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios. San José, Costa Rica. p. 112.
- Flores, E. 1989. *El Chayote, (Sechium edule)* Swartz (Cucurbitacea). Revista de Biología Tropical, 37, supl. 1:1-54.
- Lira, R. 1992. *Chayote (Sechium edule)*. En: Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492. Editado por J.E. Hernández y J.

- León. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma, Italia. p.: 77-82.
- Lozoya, H. 1990. *Cultivo "in vitro" de ápices para la obtención de plantas libres de patógenos*. En: Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Editado por C.H. Rosell y V.M. Villalobos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma, Italia. p.: 37-42.
 - Murashige, T., Skoog, F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiological Plantarum*. 15: 473-479.
 - Rivera, C y V. Lizano. 1995. *Muestreo realizado en la zona de Ujarrás, para determinar presencia de virus y su forma de transmisión*. Centro de Biología Celular y Molecular. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. (Comunicación personal).
 - SEPSA, 1993. *Datos de experimentación de chayote, recopilados por el Banco Central y la Dirección General de Estadística y Censos*. Cartago, Coopechayote, R.L. (Comunicación personal).