

Efecto del AIA y el AIB sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Sechium edule* (Jacq.) Sw

José García García^{1*}, Eduardo Salas Alvarado¹, José Azofeifa Bolaños². *Autor para correspondencia

¹Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Costa Rica, Campus Omar Dengo. Heredia, Costa Rica. Avenida 1, Calle 9. Apartado Postal: 86-3000.

²Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional de Costa Rica, Santa Lucía, Barva, Heredia, Costa Rica. Apartado Postal: 86-3000. e-mail: dendrogar@yahoo.com, glomus123@yahoo.com

RESUMEN

La presente investigación tuvo como finalidad determinar la respuesta de brotes de chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Sw.] a la aplicación de ácido indol butírico (AIB) y ácido-3-indol acético (AIA) en la fase de enraizamiento. Se estudió el efecto de tres medios de cultivo, modificados a partir del propuesto por Murashige y Skoog (MS): 1- Sales MS al 65%, 2- Sales MS al 65% + 0.05 mg l⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), y 3- Sales MS al 65% + 3.0 mg l⁻¹ de ácido-3 indolacético (AIA). Las variables evaluadas fueron: número de raíces, longitud y número de brotes por plántula *in vitro*. El mejor resultado se logró al utilizar el medio de cultivo MS al 65% con 3.0 mg l⁻¹ de AIA. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$), entre tratamientos que contenían los reguladores de crecimiento, para las variables número de raíces y longitud de plántulas *in vitro*. En la accesión UNA-730 la inducción de raíces se produjo en un medio de cultivo con sales MS al 65% sin reguladores de crecimiento; sin embargo, cuando se adicionó AIA o AIB la inducción fue del 100%. Las diferencias indicadas en la inducción de raíces en el presente trabajo probablemente son el resultado conjunto del genotipo y las condiciones específicas de cultivo.

Palabras clave: auxinas, chayote, cultivo *in vitro*, reguladores del crecimiento

Effects of IAA and IBA on the *in vitro* rooting of stem cuttings of *Sechium edule* (Jacq.) Sw

ABSTRACT

This investigation was carried out with the objective of evaluating the response of shoots of chayote [*S. edule* (Jacq.) Sw.] to the application of indole-3-butyric acid (IBA) and indole-3-acetic acid (IAA) on the *in vitro* rooting phase. The effect of three culture media, modified from the proposed of Murashige and Skoog (MS) was studied: 1- 65% MS salt base, 2- 65% MS salt base + 0.05 mg l⁻¹ of indolebutyric acid (AIB) and 3- 65% MS salt base + 3.0 mg l⁻¹-3-indole acetic acid (IAA). The variables evaluated were: number of roots, length and number of shoots per *in vitro* seedling. The best result were obtained when using 65% MS salt base with 3.0 mg l⁻¹ of IAA. Significant differences ($P \leq 0.05$) among treatments containing growth regulators was obtained for the variables number of roots and length of *in vitro* plantlets. In the UNA-730 accession root induction was obtained in a 65% MS salt base culture medium without growth regulators; however, when IAA and IBA was added the induction was 100%. The differences identified in this work with regards to the root induction were probably the combined result of genotype and specific culture conditions.

Key words: auxins, chayote, growth regulators, *in vitro* culture

INTRODUCCIÓN

El chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Sw.], es una cucurbitácea de origen mesoamericano, la cual presenta en la región una riqueza importante en diversidad genética, usos y elementos etnobotánicos (Brenes *et al.*, 2003).

La importancia socioeconómica del chayote en Costa Rica se debe a la diversidad de recetas que se pueden realizar al utilizar frutos, raíces y quelites, a lo cual se suma la generación de empleos directos e indirectos para satisfacer la creciente demanda en los mercados internacionales mediante el establecimiento de cultivos comerciales (Somarribas *et al.*, 1991; Brenes *et al.*, 2003).

Además, es un importante alimento básico, fácil de digerir, bajo en calorías y uno de los vegetales más baratos disponibles para los grupos de escasos ingresos (Newstrom, 1985).

En Mesoamérica la actividad de producción de chayote se ha convertido en una fuente importante de divisas para Costa Rica y México (Lira, 1996), lo cual se refleja también en la mayor atención que estos países brindan a la investigación agronómica y biotecnológica en esta especie.

El chayote es una planta alógama que produce descendencias heterogéneas; no obstante, se pueden obtener poblaciones homogéneas de genotipos más productivos y de mejor calidad mediante propagación asexual a través de la macropropagación (esquejes) o por micropropagación (Somarribas *et al.*, 1991). Esta última se convierte en la alternativa más viable para la propagación de clones selectos, pues la experimentación utilizando esquejes no es común (Somarribas *et al.*, 1991) y las iniciativas de conservación *ex situ* llevadas a cabo en bancos de germoplasma en campo han fracasado (Lira *et al.*, 2008).

Las técnicas de cultivo *in vitro* en chayote son herramientas importantes para la conservación de germoplasma, el mejoramiento genético y la producción de semillas. Si bien es cierto que en Costa Rica se han logrado avances importantes en esta materia (Somarribas *et al.*, 1991; Alvarenga y Morera, 1992; Brenes *et al.*, 2003; Alvarenga-Venutolo *et al.*, 2007), no se han realizado estudios específicos para analizar en condiciones de cultivo *in vitro*, la respuesta de los brotes de chayote al enraizamiento, en presencia de diferentes tipos de auxinas.

Puesto que la emergencia y desarrollo de raíces en los sistemas de cultivo *in vitro*, está frecuentemente influenciada por el tipo de auxina añadida al medio de cultivo, el presente trabajo tuvo como finalidad, determinar la respuesta de brotes de chayote a la aplicación de ácido indol butírico (AIB) y ácido-3-indol acético (AIA) en la fase de enraizamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los explantes usados para iniciar el cultivo *in vitro* fueron obtenidos de una planta

correspondiente a la accesión UNA-730, de una colección de germoplasma de chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Sw.], ubicada en la Finca Experimental Santa Lucía, de la Universidad Nacional (UNA), Santa Lucía, Barva, Heredia, Costa Rica (Coordenadas geográficas aproximadas 10° 01' 20.07" N - 84° 06' 35.54" O).

Se consideraron como explantes microestacas de 5.0 mm de longitud, aproximadamente. Para el proceso de desinfección los explantes fueron inmersos por 45 minutos, en una solución de Benlate (0.5 g l⁻¹), estreptomycin (0.15 g l⁻¹) y oxitetraciclina (0.015 g l⁻¹), después de lo cual fueron lavados tres veces en agua destilada. Seguidamente se colocaron en una solución de hipoclorito de calcio al 4.0% por 15 minutos y se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril, en la cámara de flujo laminar previo a colocar los explantes en el medio de cultivo. Para la fase de establecimiento, se empleó el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) con las sales al 65%, 0.2 mg l⁻¹ de 6-bencil amino purina (BAP) y 0.3 mg l⁻¹ de ácido giberélico (AG₃).

Una vez establecidas las microestacas, a los dos meses se realizó un subcultivo a un nuevo medio de cultivo, de igual composición al citado anteriormente, para inducir la brotación, la cual se completó a los dos meses de iniciado este subcultivo.

Para estudiar la capacidad de enraizamiento *in vitro*, se tomaron brotes de aproximadamente 1.0 cm de longitud, provistos de dos yemas: una apical y otra axilar. Los tratamientos evaluados fueron tres medios de cultivo, modificados a partir del medio de cultivo basal MS:

- 1- Sales del medio de cultivo MS al 65%,
- 2- Sales del medio de cultivo MS al 65% + 0.05 mg l⁻¹ de AIB,
- 3- Sales del medio de cultivo MS al 65% + 3.0 mg l⁻¹ de AIA.

En cada caso se adicionaron al medio de cultivo 30 g l⁻¹ de sacarosa y 2.4 g l⁻¹ de Phytigel. El pH de las soluciones de los medios de cultivo se ajustó a 5.8 antes de su esterilización.

Se utilizaron frascos cilíndricos de vidrio con un diámetro de 5.5 cm, y una altura de 9.5 cm, con

capacidad de 175 ml de volumen, aproximadamente, en los cuales se dispensaron 20 ml del medio de cultivo elaborado. Posteriormente, fueron esterilizados a una presión de 15 kg cm⁻² y 121°C por 15 minutos, en una autoclave vertical.

Luego, se colocó un brote en el medio de cultivo contenido en cada frasco y este se ubicó, junto al resto de frascos, en un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h (proporcionada por tubos fluorescentes de luz fría, intensidad lumínica de 2000 lux) y 8 h de oscuridad, a 19 °C por cinco semanas, al cabo de las cuales se realizó la evaluación de la formación de raíces.

Para el ensayo se usó un diseño experimental irrestricto al azar, en el cual se estudiaron tres tratamientos con diez repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por un brote colocado en un medio de cultivo contenido en un frasco de cultivo.

Las variables evaluadas fueron las siguientes: número de raíces, longitud (cm) y número de brotes por plántula *in vitro*. También se registró como dato de referencia, el porcentaje de brotes con emisión de raíces.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un Análisis de Varianza previa normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas y se analizaron en el *Statistical Analysis System* (SAS) (SAS Institute Inc. 1996), y para los casos en los cuales se registraron diferencias significativas, se aplicó la Prueba de Tukey de diferencia entre medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los brotes de chayote en el medio de cultivo MS al 65% sin reguladores de crecimiento produjeron raíces en un 90%; mientras que en los casos en los cuales se adicionó AIA o AIB al medio de cultivo, la producción de raíces se observó en el 100% de los brotes (Tabla 1). Respecto a la respuesta morfogénica de la producción de raíces *in vitro*, en ausencia de auxinas y con variantes en la concentración de sales del medio de cultivo MS, los resultados de este trabajo coinciden con referencias previas de otros autores. En este sentido, Abdelnour *et al.* (2002) en los cultivares '13', 'Claudio' y 'JM' el cultivo de brotes de chayote en ausencia de enraizadores indujo el

surgimiento de raíces. No obstante, al utilizar AIB observaron que el porcentaje de plantas enraizadas aumentó al 100%. Igualmente, en ausencia de reguladores, en un medio de cultivo MS a 22°C, Alvarenga (1990) obtuvo un 50% de enraizamiento, mientras que Somarribas *et al.* (1991), encontraron rizogénesis al complementar el medio de cultivo basal MS, con auxinas, principalmente ácido naftalenacético (ANA). No obstante, la inclusión de ANA, BAP, kinetina y carbón activado en el mismo medio de cultivo no produjo enraizamiento.

Por otra parte, los resultados apoyan los informados por Abdelnour *et al.* (2002) quienes evaluaron los porcentajes de enraizamiento utilizando un medio de cultivo MS completo y diferentes cultivares en ausencia de enraizadores. Estos autores en los cultivares '13' y 'Claudio' obtuvieron un porcentaje de enraizamiento del 69% y 85%, respectivamente, en ausencia de BA. Sin embargo, al utilizar el cultivar '13' en el mismo medio de cultivo (MS 100%) con 0.1 mg l⁻¹ y 0.2 mg l⁻¹ de AIB se obtuvo un 100% de enraizamiento con un promedio de 8.9 y 9.7 raíces por planta, respectivamente, mientras que en ausencia de AIB el porcentaje de enraizamiento se redujo a un 75% con un promedio de 1.8 raíces por planta.

Esta respuesta fue documentada por Hurtado (1994) quien argumentó que el estrés derivado de las bajas concentraciones de sales del medio de cultivo MS, estimulan el surgimiento de raíces en las plántulas *in vitro*. Además, estos resultados apoyan el trabajo de Rai *et al.* (2012) quienes afirmaron que la formación de raíces se favorece al disminuir la concentración de iones de nitrógeno en el medio de cultivo.

La estrategia de disminuir la fuerza iónica del medio de cultivo basal MS y complementarlo con auxinas ha sido ampliamente utilizada para la inducción e incremento del porcentaje de raíces en cucurbitáceas (Rai *et al.*, 2012; Sangeetha y Venkatachalam, 2013). Por el contrario, algunos investigadores obtuvieron mejores resultados de enraizamiento al utilizar medio de cultivo MS conformado por la totalidad de las sales complementado con al menos una auxina (Ugandhar *et al.*, 2011, Thiruvengadam *et al.*, 2012;). Sin embargo, en otras cucurbitáceas la ausencia de reguladores de crecimiento favoreció el enraizamiento (Pal *et al.*, 2007).

Tabla 1. Efecto de AIB y AIA sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Sechium edule* (Jacq.) Sw.

Medio de cultivo	No. brotes con raíces (%)	Número de raíces por plántula <i>in vitro</i>	Longitud de plántula <i>in vitro</i> (cm) *	Número de brotes por plántula <i>in vitro</i>
MS 65%	90.0	3.4 a	4.70 ab	5.0 a
MS 65% + 0.05 mg l ⁻¹ de AIB	100.0	5.1 ab	3.45 a	3.7 a
MS 65% + 3.0 mg l ⁻¹ de AIA	100.0	6.7 b	5.60 b	5.0 a
Probabilidad*		0.0087	0.0033	

Medias en cada columna con diferente letra difieren ($P \leq 0.05$), según Prueba de Tukey. $n=10$

* Probabilidad asociada al análisis de varianza.

Se presentaron diferencias significativas entre tratamientos para las variables número de raíces ($P=0.0087$) y longitud ($P=0.0033$). La adición de 3.0 mg de AIA al medio de cultivo MS estimuló en casi el doble el número de raíces ($P < 0.05$), mientras que con 0.05 mg l⁻¹ de AIB el incremento en esta variable fue de 1.5 veces, respecto al medio de cultivo MS 65%, sin embargo, esta diferencia no fue significativa. De igual forma, la diferencia entre los tratamientos con auxinas para la variable número de raíces no fue significativa (Tabla 1).

En lo que se refiere a la variable longitud de la plántula *in vitro*, no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento que contenía MS 65% y los otros dos con auxinas. Sin embargo, entre los tratamientos con auxinas se presentaron diferencias significativas, donde la adición de 3.0 mg l⁻¹ de AIA propició un 62% más longitud de plántula respecto al MS 65% + 0.05 mg l⁻¹ AIB.

Si bien los resultados indicaron que se puede obtener un alto porcentaje de plántulas *in vitro* con emisión de raíces, incluso en ausencia de reguladores de crecimiento, debe considerarse la importancia de otras variables tales como el número de raíces formadas, la longitud y funcionalidad de éstas, pues según Alvarenga *et al.* (1999), la aclimatización exitosa de las plántulas *in vitro* de chayote depende de una longitud apropiada de éstas (no menor a 8.0 cm), y de la presencia de un sistema radical bien desarrollado. En el presente trabajo, al considerar de manera conjunta estas dos variables, se perfila como mejor tratamiento el correspondiente a MS 65% + 3.0 mg l⁻¹ de AIA,

pues se obtuvieron los mayores valores en ambos casos. En efecto, a pesar de que este tratamiento no presentó diferencias significativas con el MS 65% + 0.05 mg l⁻¹ de AIB, respecto al número de raíces formadas, sí fue superior a él en cuanto a la longitud de la plántula *in vitro*. Estos resultados podrían explicarse, al menos parcialmente, por lo que señala Hurtado (1994), quien indicó que el AIA y otras auxinas naturales no se acumulan en grandes cantidades a nivel celular, debido a que existen procesos naturales de inactivación y degradación de las auxinas endógenas, los cuales son menos eficientes actuando sobre auxinas sintéticas como el AIB. Lo anterior puede conducir a una mayor acumulación de este tipo de reguladores, llegando incluso a niveles de toxicidad lo cual podría ser comprobado posteriormente.

En cuanto a los resultados con el uso del AIA en el presente ensayo, está documentado su efecto estimulante sobre la respiración y la síntesis de proteínas, lo que repercute en un efecto benéfico sobre el crecimiento de la plántula (Ashmore, 1997). Sin embargo, hay que considerar la especificidad de la acción de esta auxina con el cultivar de chayote analizado, pues el uso de AIB está ampliamente referido en muchas cucurbitáceas por su acción efectiva durante la fase de enraizamiento (Sangeetha y Venkatachalam, 2013). Al respecto, Abdelnour *et al.* (2002) informaron un 100% de enraizamiento cuando utilizaron este mismo regulador para los cultivares de chayote analizados. Por lo tanto, es probable que la variación de las respuestas rizogénicas indicadas en este trabajo sean

el resultado del genotipo y las condiciones específicas de cultivo.

CONCLUSIONES

La adición de 3.0 mg l⁻¹ de AIA al medio de cultivo MS, estimuló la producción de raíces (P<0.05) e incrementó la longitud de las plántulas *in vitro* de chayote (P<0.05). La auxina AIB mostró resultados inferiores al AIA, a pesar de sus semejanzas en cuanto a función. La diferencia más evidente se mostró en la longitud de las plántulas *in vitro*, lo cual sugiere que a pesar de la naturaleza auxínica de ambas sustancias, el origen sintético del AIB podría relacionarse con una disminución de sus efectos benéficos sobre el enraizamiento de brotes.

REFERENCIAS

Abdelnour, A, Ramírez C, Engelmann F (2002) Micropropagación de chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) a partir de brotes vegetativos. Agron. Mesoam. 13: 147–151

Alvarenga, S (1990) Micropropagación y estudio de algunas opciones para la conservación de germoplasma de chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) *in vitro*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba

Alvarenga-Venutolo, S, Abdelnour-Esquivel A, Villalobos-Aránbula V (2007) Conservación *in vitro* de chayote (*Sechium edule*). Agron. Mesoam. 18: 65–73

Alvarenga, S, Flores D, Abdelnour A (1999) Micropropagación de fenotipos seleccionados de chayote. Tecnología en marcha 13: 9-15

Ashmore, SE (1997) Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. IPGRI. Rome

Brenes, A, Saborío J, Vega M (2003) Formación y caracterización preliminar de una colección de germoplasma de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz) en Costa Rica. En: Meléndez, G (Ed) Memoria Congreso Alianza Tecnológica para la Agricultura con Calidad, pp. 177. Asociación de Profesionales en Enfermedades de Plantas. Comité Iberoamericano de Desarrollo y Adaptación del Plástico para la Agricultura. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo, San José

Hurtado, D (1998) Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México

Lira, R (1996) Chayote, *Sechium edule* (Jacq.) Sw. IPK/IPGRI. Rome

Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473–497

Lira, R, Téllez O, Dávila P (2008) The effects of climate change on the geographic distribution of Mexican wild relatives of domesticated Cucurbitaceae. Genet. Resour. & Crop Evol. 56(5): 691–703

Newstrom, L (1985) Collection of chayote and its wild relatives. FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter 64: 14–20

Pal, SP, Alam I, Anisuzzaman M, Sarker KK (2007) Indirect organogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). Turk. J. Agric. For. 31(1): 63–70

Rai, GK, Singh M, Rai NP, Bhardwaj DR, Kumar S (2012) *In vitro* propagation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb.) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. Physiol. Mol. Biol. Plants. 18(3): 273–280

Sangeetha, P, Venkatachalam P (2013) Induction of direct shoot organogenesis and *in vitro* flowering from shoot tip explants of cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Green long). *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant Nov. 2013: 3–9

SAS Institute (1996) Statistical Analysis System User's Guide. SAS Institute. Cary. USA. 956 p.

Somarribas, G, Sandoval J, Müller L (1991) Propagación vegetativa *in vitro* del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.). Fase de establecimiento. Turrialba 41: 538–544

Thiruvengadam, M, Praveen N, Chung I (2012) *In vitro* regeneration from internodal explants of bitter melon (*Momordica charantia* L.) via indirect organogenesis. Afr. J. Biotechnol. 11(33): 8218–8224

Ugandhar, T, Venkateshwarlu M, Begum G, Srilatha T, Jaganmohanreddy K (2011) *In vitro* plant regeneration of Cucumber (*Cucumis sativum* (L.) from cotyledon and hypocotyl explants. Sci. Res. Rep. 1(3): 164–169

Recibido: 20-2-2014

Aceptado: 24-9-2014