



Regeneración de *Sechium edule* mediante organogénesis y uso de marcadores RAMP para evaluar la fidelidad genética

Víctor O. Cruz-Martínez | Gustavo J. Acevedo-Hernández
Osvaldo A. Castellanos-Hernández | Araceli Rodríguez-Sahagún
Centro Universitario de la Ciénega | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

correo-e: aracelicrs@gmail.com

Resumen

Se obtuvieron plantas de chayote mediante el desarrollo de un sistema eficiente de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa (MS suplementado con 0.1 mg/L de BA y 0.1 o 0.5 mg/L de GA₃). Se partió de explantes de hoja con peciolo en un tiempo aproximado de 25 días, con una eficiencia en producción promedio de 7.25 brotes por tratamiento. Para el análisis de la variabilidad genética producida por el método de regeneración de *Sechium edule* se usaron los marcadores moleculares RAMP, se evidenció la fidelidad genética que mantienen la planta donante con las regeneradas por esta vía.

Palabras clave: *Sechium edule*, regeneración, fidelidad genética.

Introducción

El chayote, *Sechium edule*, es una hortaliza popular ampliamente distribuida en regiones subtropicales con más de 2 400 mm de lluvia. Es originario del trópico americano, donde se encuentra la mayor diversidad genética, pero se cultiva de manera rústica en muchas regiones del mundo, siendo uno de los vegetales más accesibles para los grupos de bajos ingresos (Lira, 1996).

Tal especie es considerada un producto de relevancia comercial para México. Al ser éste uno de los países con mayor diversidad genética requiere estrategias para conservar sus poblaciones silvestres y asegurar la disponibilidad de material con características de importancia económica (estándares de exportación) para los agricultores, eso se lograría con la creación y mantenimiento de bancos de germoplasma. Para ello es preciso desarrollar estrategias biotecnológicas que permitan la conservación a mediano y largo plazo del material vegetal.

Los métodos de conservación deben garantizar la viabilidad y la estabilidad genética de los materiales almacenados. Lo anterior es imposible de manera convencional; se le considera una especie recalcitrante por las características de la semilla (alto contenido de agua y corto periodo de latencia), por lo que las semillas germinan aun durante la vida de anaquel.

Una alternativa viable es el establecimiento de la regeneración vía organogénesis, conocida como estrategia de propagación con bajo índice de variabilidad genética en las plantas obtenidas, lo cual puede ser evaluado mediante el uso de marcadores moleculares. Para poder implementar metodologías de conservación y mejoramiento genético es indispensable contar con un sistema de regeneración que no produzca alta variabilidad genética en las plantas obtenidas.

Establecer un protocolo eficiente de regeneración de plantas vía organogénesis es un primer paso

en el mejoramiento genético de la especie; éste podrá ser evaluado a través de marcadores moleculares empleados con éxito en la búsqueda de diferencias en los patrones genéticos entre cultivares, variedades y plantas. Los estudios de fidelidad genética constituyen una técnica válida y rápida para detectar variabilidad en las plantas regeneradas, ya que los marcadores morfológicos necesitan más tiempo y en ocasiones son menos confiables.

Metodología

Se extrajeron embriones de chayote a partir de frutos maduros, fueron desinfectados 30 segundos en una solución de alcohol al 70%, seguido de 12 min en una solución de hipoclorito de sodio al 50%, finalmente fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril en la campana de flujo laminar; dicho establecimiento y regeneración *in vitro* de chayote es el primer paso para desarrollar el mejoramiento genético de la especie.

Los explantes fueron colocados en un medio MS en condiciones asépticas, los cultivos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de $27\pm 2^\circ\text{C}$, con un foto periodo de 16h de luz fluorescente ($25 \mu\text{m}/\text{seg}/\text{m}^2$). Una vez que los embriones germinaron y presentaron crecimiento de plántulas en alrededor de 10 días de incubación, se eliminaron los cotiledones y se extrajeron las hojas de las plántulas, a cada hoja se le hizo pequeñas incisiones para una mejor respuesta. Se realizaron distintos tratamientos con benciladenina (BA) y ácido giberélico (GA_3) y como agente gelificante se empleó Phytigel.

Una vez que se hallaron las plantas regeneradas por organogénesis, se evaluaron por medio de marcadores moleculares RAMP, con los cuales se puede estimar la diversidad genética en plantas y animales; a la vez, permiten mostrar la base de la variación de los individuos, por mencionar algunas de sus aplicaciones. Se evaluaron 8 oligonucleótidos ISSR y 10 oligos RAPD.

RAPD		SSR	
No. Oligo	Secuencia	No. Oligo	Secuencia
1	CGTGCGGGAA	ARS 001	CACT(GA) ₆
2	GTAGACGCGT	ARS 002	AACC(GA) ₆
3	AACGCGCTAC	ARS 003	GACG(GT) ₆
4	CCCGACAGCA	ARS 004	AGTC(GT) ₆
5	AAGCGTCCTG	ARS 005	CATG(GT) ₆
6	ACCACAGCTC	ARS 006	AGAG(GA) ₆
7	GTGAGGTAGG	ARS 007	AGTT(GT) ₆
8	AGGAGACCGT	ARS 008	TCGG(GA) ₆
9	GCCGTAGGGTT		
10	CCACATGGGT		

Fuente: Chiba y cols., 2003.

Fuente: Gómez-Velez, 2011.

Resultados y discusión

Se desarrolló un sistema eficiente de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa de *Sechium edule*; se partió de explantes de hoja con peciolo en un tiempo aproximado de 25 días, siendo la regeneración sólo en la base del peciolo (figura 1).

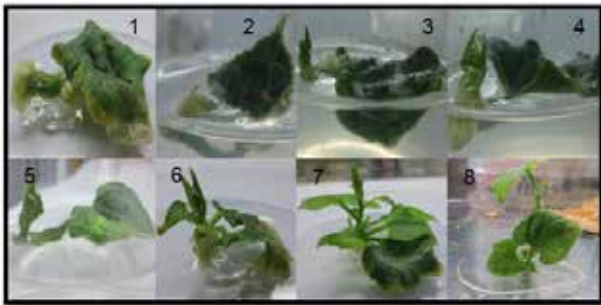


Figura 1. Regeneración de *Sechium edule*, ciclo completo. 1) Fase de inducción, explante de hoja con peciolo, 3 días de incubación. 2) Células formando órgano vegetal, 6 días de incubación. 3) Desarrollo de la plántula organogénica, 9 días de incubación. 4) Plántula, 11 días de incubación. 5) Plántula, 15 días de incubación. 6) Plántula, 18 días de incubación. 7) Plántula, 25 días de incubación. 8) Planta con desarrollo de raíz, 30 días de incubación.

Se obtuvieron plantas de chayote mediante regeneración *in vitro* vía organogénesis directa, cuando el medio MS fue suplementado con 0.1 mg/L de BA y 0.1 o 0.5 mg/L de GA₃ (figura 2).

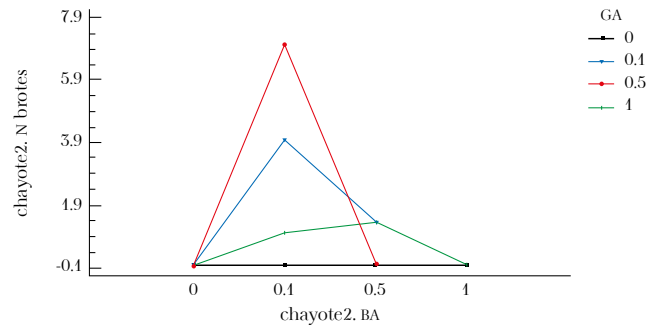


Figura 2. Interacciones de los factores concentración de (GA₃) y (BA) para la inducción de brotes en *Sechium edule*.

Una vez establecido el protocolo de regeneración de plantas de chayote vía organogénesis, se desarrolló la metodología de enraizamiento *in vitro* de los brotes; se obtuvo el 80% de enraizamiento a los 10 días de incubación en medio MS sin reguladores de crecimiento (figura 3). La técnica RAMPs permitió evaluar la fidelidad genética del método de regeneración vía organogénesis directa, además que evidenciaron ser una herramienta aplicable a estudios de variabilidad genética para *Sechium edule* (figura 4).

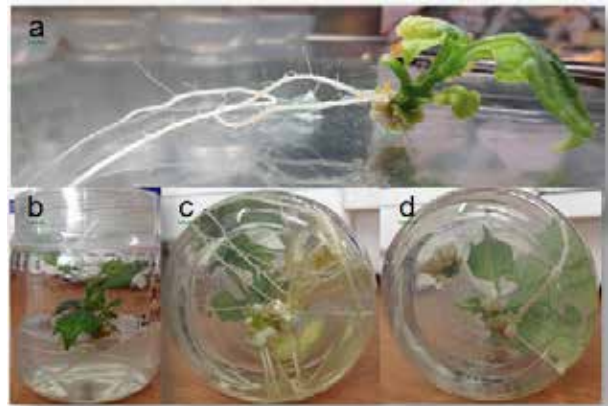


Figura 3. a) Desarrollo de raíz a los 30 días de ser individualizada la plántula. b) Plántula con raíz, 13 días de ser individualizada. c) Plántula con raíz, 16 días de ser individualizada. d) Plántula con raíz, 14 días de ser individualizada.

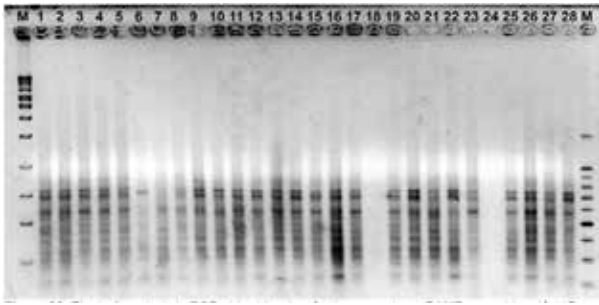


Figura 4. Patrón de bandeo. Electroforesis de la PCR obtenida a través de marcadores RAMPs, combinación 17 con los oligos (2-ISSR y 7-RAPD). 1-28 primeras plántulas regeneradas vía organogénesis directa. M izquierda: mpm 1kb. M derecha: mpm 100 pb.

El uso de marcadores RAMP ha sido utilizado con éxito para evaluar en distintas especies el grado de variabilidad existente, ya sea ocasionado por el sistema de propagación o en cultivos como lo realizado para granada (Zhao *et al.*, 2013).

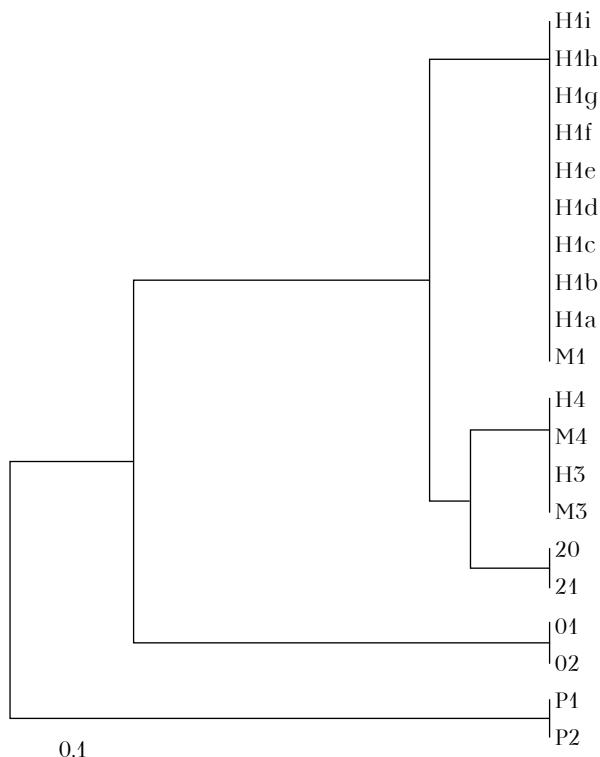


Figura 5. Dendrograma encontrado con marcadores RAMPs a partir de 16 muestras de eventos organogénicos de *Sechium edule*. H: Plantas organogénicas hijas. M: Plantas madre. 20 y 21: Plantas organogénicas. O1 y O2: Muestras de plantas de orégano como referencia. P1 y P2: Muestras de plantas de *Paulownia* como referencia.

Se demostró que mediante el sistema de regeneración *in vitro* por organogénesis directa se mantiene la estabilidad genética de las plantas, y con ello mantener las características genotípicas de las mismas. Esto fue evaluado por los marcadores moleculares tipo RAMP (figura 5).

Conclusiones

Se logró la obtención de plantas de *Sechium edule* a través de la regeneración por organogénesis. Se demostró que ese procedimiento no genera cambios genotípicos en las plantas, lo que se presume será un buen comienzo para trabajos de mejoramiento genético en la especie. Mantener la especie *in vitro* ayudaría a crear un banco de germoplasma; las características del fruto imposibilitan hacerlo de forma natural, ya que éste germina poco tiempo después de su corte y ello impide su almacenamiento. Se busca en futuros trabajos establecer protocolos de mejora genética para beneficiar al sector agrícola con la producción de plantas libres de virus, una de las problemáticas que presentan los cultivos de chayote.

Agradecimientos

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal del Centro Universitario de la Ciénega.

Referencias

- Lira-Saade, R. (1996). *Chayote Sechium edule. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 8*. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research/ International Plant Genetic Resources Institute.
- Zhao, L., Li, M., Cai, G., Pan, T., Shan, C. (2013). Assessment of the genetic diversity and genetic relationships of pomegranate (*Punica granatum* L.) in China using RAMP markers. *Scientia Horticulturae*, 151:63-67.