

Desinfección y regeneración eficiente de chayote in vitro (*Sechium edule* Jacq.Sw.).

Oscar Del Ángel, Gilber Vela, Araceli Rodríguez, Miguel Gómez y Hugo García

O. Del Ángel, G.Vela, A.Rodríguez, M.Gómez y H. García
Instituto Tecnológico Superior de Huatusco. Av. 25 Pte. No. 100 Col. Reserva Territorial. C.P. 94100.Huatusco, Veracruz, México.
Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779. C.P. 91897. Veracruz, México.
Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Lib. Nte. Pte. No. 1150, Ciudad Universitaria. Col. Lajas Maciel. C.P. 29000, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
Centro Universitario de la Ciénega. Universidad de Guadalajara. Av. Universidad No. 1115. Col. Lindavista. C.P. 47820. Ocotlán, Jalisco, México.
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato. Km. 9.6 Lib. Nte. Carretera León. C.P. 36821. Irapuato, Guanajuato, México.
oscardelangel.coronel@hotmail.com

M.Ramos.,V.Aguilera.,(eds.) Ciencias Agropecuarias, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

Abstract

A protocol for the preparation and disinfection of chayote buds and seed material with sodium hypochlorite was tested for *in vitro* culturing. We defined that a total active chlorine concentration of 1.2% provided complete sterilization of the explants in a few minutes, with high percentages of survival and regenerated plants after aseptic treatment of buds (ca. 73.7%) and seeds (ca. 90%). All buds and complete seed were regenerate defficiently in MS culture media with or without plant growth regulators after the disinfection treatment.

3 Introducción

El chayote (*Sechium edule* Jacq. Swartz) es un cultivo nativo de Mesoamérica que pertenece a la familia Cucurbitaceae. A nivel mundial México es el principal exportador (MBW, 2012) y el estado de Veracruz el mayor productor del país contribuyendo con más del 80% de su producción (SIAP, 2012). Los estudios que existen sobre esta especie en México y alrededor del mundo pueden agruparse básicamente en: (1) usos y propiedades bioquímicas (Aung *et al.*, 1990; Modgil *et al.*, 2004; Ordoñez *et al.*, 2006; (2) botánica, origen y distribución (Newstrom, 1991; Lira, 1996; Lira *et al.*, 1999; Lira & Caballero, 2002); (3) caracterización de genotipo y fenotipo (Mercado & Lira, 1994; Abdelnour & Rocha, 2008; Cadena *et al.*, 2008; Avendaño *et al.*, 2012); (4) fisiología y patología (Vargas, 1987; Valverde *et al.*, 1989; Bernal *et al.*, 2000; Montano, 2000; Abdelnour *et al.*, 2006; Cadena *et al.*, 2006; Baiswar *et al.*, 2008; Baiswar *et al.*, 2010), y (5) otros tópicos de interés (Albone *et al.*, 1984; Vernieri *et al.*, 1989; Piaggese *et al.*, 1997; Lombardi *et al.*, 2007).

Una de estas áreas que se ha explorado pobremente es la del cultivo *in vitro*. En este sentido, Somarribas *et al.* (1991) fueron pioneros en explorar el tema con *Sechium edule*, trabajando con la propagación de meristemos, ápices y segmentos de brotes, así como también fueron los primeros en estudiar y evaluar el efecto de tratamientos de desinfección, no obstante, sus resultados no fueron muy satisfactorios ya que reportan altos porcentajes de contaminación (73-85%), así como abundante formación de callo en todos los tratamientos, lo cual es una gran limitante para la propagación eficiente de chayote *in vitro*. Por otra parte, Abdelnour *et al.* (2002) presentaron un segundo enfoque para la propagación de brotes obtenidos a partir de yemas axilares y cotiledones. Adicionalmente, también exploraron algunos tratamientos de asepsia recomendando el hipoclorito de calcio como mejor agente desinfectante que el hipoclorito de sodio, pero aun con bajos porcentajes de regeneración, sugiriendo que las concentraciones utilizadas, el periodo de incubación o el producto mismo pudieron no haber sido apropiados para dicho propósito. En reportes más recientes Abdelnour *et al.* (2006) y Alvarenga *et al.* (2007) usaron hipoclorito de calcio al 4% pero con diferentes tiempos de desinfección (6 y 10 minutos respectivamente), sin embargo, estos autores no reportan el porcentaje de explantes vivos después de la asepsia y solo presentan resultados directos de sus tratamientos de regeneración sin considerar que el explante puede ser afectado por el procedimiento de desinfección –como fue observado previamente en nuestros experimentos con chayote-. Por lo que el paso inicial y aparentemente básico para obtener explantes viables y totalmente axénicos ha probado ser uno de los obstáculos más difíciles en el establecimiento *in vitro* del cultivo de chayote.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue desarrollar un protocolo para preparar explantes de chayote totalmente asépticos que puedan ser regenerados eficientemente mediante cultivo *in vitro* ya sea por embrión cigótico o por organogénesis directa de yemas.

3.1 Materiales y métodos

Material vegetal: Los frutos y plántulas de chayote utilizadas se colectaron alrededor de las 7:00 am en huertos del municipio de Huatusco, Veracruz. Todo el material vegetal fue transportado a laboratorio dentro de un lapso de 3 horas, conservando las plántulas en agua purificada y hielo con 10 gotas de cloro comercial por litro. Las plántulas consistieron de tallos completos, de aproximadamente un mes de edad y cada uno con cuatro a seis yemas –apical y axilares-, mientras que para el tratamiento con frutos éstos se cosecharon entre los 18 y 22 días post-antesis y se utilizó la semilla completa y madura (ya sea desnuda o recubierta con pulpa y testa).

Tratamiento de asepsia: Se determinó *a priori* una solución de desinfección con 1.2% de hipoclorito de sodio –NaOCl- (aproximadamente 20% de cloro comercial), 0.1% de Tween 20^{MR} y 79.9% de agua destilada desionizadaestéril. Todos lo explantes (semillas y yemas) fueron evaluados en esta solución usando tres tiempos de exposición (5, 15, y 25 minutos) con o sin aplicación de vacío (600 mmHg) y con agitación constante a 100 rpm, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Arreglo de tratamientos para la desinfección de explantes.

Vacío	Explante	Tiempo de desinfección (min)	No. Explantes usados*
Si (600 mmHg)	-	5	16
	-	15	16
	Semillas cubiertas	25	16
	-	5	16
	-	15	16
	Semillas desnudas	25	16
	-Yemas	5	11
	-Yemas	15	11
	-Yemas	25	11
	-	5	16
	-	15	16
	Semillas cubiertas	25	16
No	-	5	16
	-	15	16
	Semillas desnudas	25	16
	-Yemas	5	11
	-Yemas	15	11
	-Yemas	25	11

*Se evaluaron tres repeticiones de este diseño experimental.

Antes de los tratamientos la superficie de los frutos fue lavada con detergente líquido y agua potable. Posteriormente se les extrajo la semilla ya sea en forma desnuda (sin testa ni mesocarpio) o cubierta (incluyendo la testa y aproximadamente 10 mm de mesocarpio). Éstas se colocaron en etanol 70% por tres minutos y posteriormente se sumergieron en la solución desinfectante. Después del tratamiento, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada desionizada estéril bajo condiciones axénicas en campana de flujo laminar horizontal y luego fueron colocadas en frascos con 50 mL de medio MS con vitaminas (Murashigue & Skoog, 1962) complementado con 3% de sacarosa y 0.25% de Phytigel^{MR}, e incubadas por dos semanas a $25\pm 1^\circ\text{C}$ con 16 h de fotoperiodo para observar el porcentaje de germinación de semillas vía embrión cigótico.

Para la desinfección de yemas, la unidad experimental fue de una plántula completa proveniente de campo con cuatro a seis yemas cada una. En total se usaron 33 plántulas agrupadas en tres bloques de 11 unidades cada uno, a los cuales se les asignó un tiempo de exposición a la solución desinfectante. Este mismo arreglo se aplicó para el tratamiento de vacío. Las yemas contenidas en cada plántula fueron disectadas con bisturí a una distancia de cinco milímetros arriba y debajo del entrenudo. Posteriormente fueron colocadas en etanol 70% y desinfectadas como se describe arriba. Después del tratamiento las yemas se colocaron en cajas Petri (100x15 mm) con 20 mL de medio MS con vitaminas y se incubaron por dos semanas bajo las mismas condiciones señaladas anteriormente. En forma complementaria, las yemas fueron probadas bajo dos condiciones: (1) usando como tratamiento testigo el medio MS con vitaminas, suplementado con 3% de sacarosa, 0.25% de Phytigel^{MR}, y el medio descrito por Abdelnour *et al.* (2002) con algunas modificaciones, conteniendo MS con vitaminas, 3.5% de sacarosa, BAP ($0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y 0.25% de Phytigel^{MR}. La unidad experimental fue de un frasco con tres a cuatro yemas, las cuales fueron incubadas bajo las mismas condiciones señaladas anteriormente y el experimento completo se repitió dos veces.

Diseño experimental: El experimento se ajustó a un diseño experimental en bloques completos al azar con tres repeticiones. Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) usando el modelo general lineal a través del comando “proc glm” del programa estadístico de computo SAS V.8.0, y prueba de rango múltiple de Duncan a $P\leq 0.05$ para la comparación de medias.

3.2 Resultados y discusión

En un primer bloque, frutos de chayote fueron lavados y disectados bajo condiciones asépticas hasta obtener 48 semillas libres de daños, sin testa y mesocarpio. Debido a que el embrión cigótico se necesitó para evaluar el porcentaje de germinación, éste no fue removido para evitar daños al tejido completo. Las semillas extraídas fueron sumergidas de inmediato en una solución de etanol 70% y luego en la solución de desinfección usando tres tiempos de exposición (5, 15 y 25 minutos) con o sin vacío y en agitación constante. Después del tratamiento de esterilización las semillas fueron cultivadas y mantenidas en cámara de incubación por dos semanas a $25^\circ\pm 1^\circ\text{C}$ y 16 horas de fotoperiodo. Durante este tiempo no se observó ninguna contaminación por patógenos en ningún tratamiento, incluyendo vacío. Sin embargo, en ambos casos el porcentaje de supervivencia de semilla fue muy baja (0.4% en promedio).

En relación a los tiempos de exposición a la solución desinfectante, el mayor porcentaje de supervivencia fue de 10% obtenido después de cinco minutos de tratamiento y sin usar vacío. Este problema a supervivencia fue relacionado principalmente a los efectos de toxicidad causados por el hipoclorito de sodio, seguido por el tiempo de exposición y el explante mismo, lo cual causó problemas de blanqueo y destrucción superficial del tejido debido a la acumulación de especies reactivas del oxígeno, las cuales causan un estrés oxidativo como señala Benson (2000). Para los tratamientos con vacío se observó un incremento en los efectos del blanqueo. De acuerdo con varios autores (Abdul, 1974; Abdelnour *et al.*, 2002; Sugii, 2011), el hipoclorito de sodio es un producto recomendado normalmente para la desinfección *in vitro* de explantes, pero para algunas especies este compuesto puede ser tóxico. Además, también han reportado que las semillas esterilizadas con NaOCl pueden retener suficientes cantidades del agente reactivo como para interferir con la germinación y que, aun lavando el tejido varias veces con agua no se elimina por completo, de esta manera, el cloro residual es absorbido por el tejido y probablemente induce la decarboxilación de ácidos orgánicos, tales como aminoácidos, vitamina C, compuestos fenólicos, flavonoides y AIA. Este efecto está estrechamente relacionado con la duración del tratamiento de asepsia y el contenido de materia orgánica, más que con la concentración del hipoclorito de sodio en sí misma.

Se ha reportado previamente en varias especies que el cultivo de óvulos intactos previene los daños al embrión durante el tratamiento de desinfección (Bhojjwani & Razdan, 1983; Evans *et al.*, 1986), tomando ésta evidencia, se aplicó el mismo tratamiento usando otro bloque de semillas cubiertas con la testa y una porción de mesocarpio. Después del tratamiento de asepsia, la testa y mesocarpio se eliminaron para extraer la semilla desnuda y cultivarla directamente en medio MS. Para este ensayo no hubo diferencia significativa entre la aplicación o no de vacío, obteniendo resultados muy favorables con un 90% de germinación de semillas *in vitro* dentro de un periodo de dos semanas (ver Figura 1). Las plántulas obtenidas crecieron completamente saludables y no mostraron ningún efecto de blanqueo ni toxicidad por el hipoclorito de sodio. El 10% de semillas no germinadas permaneció en estado latente, aunque esto parece estar más relacionado con el desarrollo de la semilla que con los daños por toxicidad. Estos hallazgos son relevantes debido a que ningún estudio hasta el momento ha reportado valores similares de germinación y/o tiempos de regeneración, así como el protocolo para desinfección de chayote usado aquí. En este sentido, la mejor aproximación a nuestro trabajo es la presentada por Alvarenga *et al.* (2007) quienes reportaron el aislamiento y desinfección de semillas maduras de chayote usando una solución de hipoclorito de calcio (4%) y Tween 20^{MR} durante 20 minutos, no obstante, los autores no especifican el número de explantes que sobrevivieron al tratamiento de asepsia y solo hacen mención de haber seleccionado los explantes en buena condición física y fisiológica para sus experimentos.

Figura 3. Germinación *in vitro* después de la aplicación del tratamiento de desinfección a semillas de chayote.



De manera adicional, también se exploró si el medio MS con vitaminas y reguladores de crecimiento ($BAP = 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) puede aumentar la eficiencia de germinación después de los tratamientos. Después de cuatro semanas no se obtuvieron diferencias significativas entre el porcentaje de germinación, así como el desarrollo de plántulas a partir de las semillas cultivadas en MS con y sin hormonas. Por tal motivo y para propósitos de germinación *in vitro* de chayote la aplicación de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo es innecesaria. Estos resultados difieren de los reportados previamente por Somarribas *et al.* (1991) y Abdelnour *et al.* (2002) quienes sugieren que los reguladores de crecimiento son necesarios para alcanzar una regeneración efectiva de explantes de chayote cultivados *in vitro*, no obstante, existe la posibilidad de que los resultados de estos autores hayan sido afectados por sus tratamientos de desinfección, en tal caso, el uso de hormonas vegetales sería requerido para reactivar nuevamente el tejido dañado.

Para la desinfección de yemas el experimento se corrió usando las mismas condiciones empleadas para semillas. Los resultados de este ensayo se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Efecto del tratamiento de asepsia en yemas de chayote provenientes de campo.

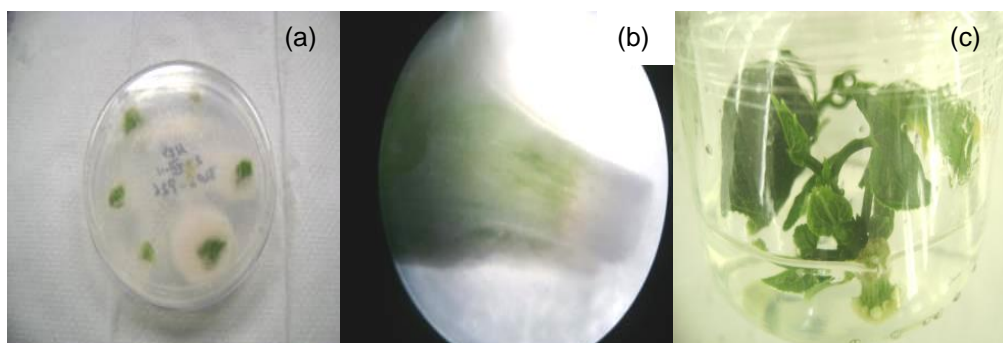
Variable (%)	Tiempo de desinfección (min.)*		
	5	15	25
Yemas vivas	98.4 ^a	100 ^b	97.9 ^a
Yemas sin ningún daño	73.7 ^a	60.5 ^{ab}	57.9 ^b
Yemas contaminadas	17.5 ^a	4.5 ^b	4.5 ^b
Yemas blanqueadas	24.7 ^b	39.4 ^b	40.0 ^a
Yemas con brotes	2.0 ^a	1.1 ^a	1.4 ^a
No. de brotes por yema	1.4 ^a	1.1 ^a	1.3 ^a
Yemas con callo	0.2 ^a	0.1 ^a	0.6 ^a

*Medias con la misma letra en cada fila no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan ($P \leq 0.05$).

De acuerdo a los resultados del ANOVA, no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de desinfección de 15 y 25 minutos, siendo estos tratamientos los más eficientes para el cultivo axénico de explantes de chayote con muy bajos porcentajes de contaminación (4.5%); sin embargo, después de una semanas de cultivo estos tratamientos también mostraron mayor incidencia de explantes blanqueados y/o brotes débiles (ver Figura 3.1).

Mientras que el tratamiento con el tiempo de exposición de cinco minutos permitió obtener un mayor número de yemas totalmente sanas (73.7%).

Figura 3.1 Yemas de chayote contaminada (a), blanqueada (b) y regenerando (c).



Estos resultados fueron superiores a los reportados por Alvarenga *et al.* (2002) quienes evaluaron tres tratamientos de desinfección en brotes vegetativos de chayote usando hipoclorito de sodio (2.5%) por seis minutos, hipoclorito de calcio (4%) por seis minutos y Xilol (11%) por 30 minutos, reportando porcentajes supervivencia y regeneración de explantes en el orden del 22%, 49% y 23% respectivamente. De manera similar Abdelnour *et al.* (2006) ensayaron con hipoclorito de calcio (4%) por seis minutos para desinfectar meristemos de chayotes y obtuvieron un porcentaje de regeneración del 23% en MS sin hormonas. Para corroborar esto, se ensayaron varios tiempos de desinfección así como diferentes concentraciones de NaOCl, incluyendo las usadas por Alvarenga *et al.* (2002), y en todos los casos se observó que a mayores porcentajes de hipoclorito de sodio se ocasionaban mayores daños o muerte debido a los efectos de blanqueo casi inmediatamente después de la aplicación (datos no mostrados). Como observación adicional, los explantes de mayor edad fisiológica (especialmente los que presentan el tallo hueco) fueron muy susceptibles a los efectos de blanqueo en todos los casos.

3.3 Conclusiones

El uso de hipoclorito de sodio al 1.2% probó ser una concentración conveniente para la desinfección de yemas y semillas de chayote provenientes de campo, sin embargo, para futuros trabajos se recomienda usar el protocolo de desinfección de semillas con testa y mesocarpio presentado aquí y posteriormente obtener plántulas germinadas *in vitro* como una mejor fuente de material vegetal aséptico (brotes, yemas o meristemos). El medio de cultivo para tal propósito puede ser empleado sin el uso de hormonas vegetales ya que estas no son requeridas cuando el tratamiento de asepsia no resulta tóxico. El protocolo descrito aquí ha sido aplicado rutinariamente en nuestro laboratorio debido a que permite obtener explantes asépticos en forma segura, eficiente y económica, para los diversos experimentos de cultivo de tejidos e ingeniería genética en chayote.

3.5 Referencias

- Abdelnour, A., Ramírez, C. & Engelmann, F. (2002). Micropropagación del chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw) a partir de brotes vegetativos. *Agron Mesoam*, 13:147-151.
- Abdelnour, A. & Rocha, O.J. (2008). Genetic characterization of a collection of chayote, *Sechium edule* (Jacq.) Swartz, in Costa Rica by using isozyme markers. *Genet. Resour. Crop. Evol.*, 55:163-170. doi: 10.1007/s10722-007-9225-6
- Abdelnour-Esquivel, A., Bermudes, L.C., Alvarenga, S. & Rivera, C. (2006). Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) para la erradicación del virus mosaico del chayote (ChMV). *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 77:17-23.
- Abdul-Baki, A.A. (1974). Pitfalls in using sodium hypochlorite as a seed disinfectant in ¹⁴C incorporation studies. *Plant Physiol.*, 53:768-771.
- Albone, K.S., Gaskin, P., MacMillan, J. & Sponsel, V.M. (1984). Identification and localization of gibberellins in maturing seeds of the cucurbit *Sechium edule*, and a comparison between this cucurbit and the legume *Phaseolus coccineus*. *Planta*, 162:560-565.
- Alvarenga, V.S., Abdelnour, E.A. & Villalobos, A.V. (2007). Conservación *in vitro* de chayote (*Sechium edule*). *Agron Mesoam* 18:65-73.
- Aung, L.H., Ball, A. & Kishad, M. (1990). Developmental and nutritional aspects of chayote (*Sechium edule*, Cucurbitaceae). *Econ. Bot.*, 44:157-164.
- Avendaño-Arrazate, C.H., Cadena-Iñiguez, J., Arévalo-Galarza, M.L., Cisneros-Solano, V.M., Aguirre-Medina, J.F., Moreno-Pérez, E.C., Cortés-Cruz, M., Castillo-Martínez, C.R. & Ramírez-Vallejo, P. (2012). Variación genética en el complejo infraespecífico de chayote evaluada mediante sistemas isoenzimáticos. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 47:244-252.
- Baiswar, P., Chandra, S. & Ngachan, S.V. (2008). Powdery mildew on *Sechium edule* in India. *Australasian Plant Disease Notes*, 3:160-161.
- Baiswar, P., Chandra, S. & Ngachan, S.V. (2010). *Pseudoperonospora cubensis* on *Sechium edule* in India. *Australasian Plant Disease Notes*, 5:3-4.
- Benson, E.E. (2000). Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cell Dev. Biol. – Planta*, 36:163-170.
- Bernal, J.J., Jiménez, I., Moreno, M., Hord, M., Rivera, C., Koenig, R. & Rodríguez-Crezo, E. (2000). *Chayote mosaic virus*, a new tymovirus infecting Cucurbitaceae. *Phytopatology*, 90:1098-1104.

Bhojwani, S.S. & Razdan, M.K. (1983). Plant tissue culture: theory and practice. Developments in crop sciences Vol 5. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, Netherlands.

Cadena-Iñiguez, J., Arévalo-Galarza, L., Ruis-Posadas, L.M., Aguirre-Medina, J.F., Soto-Hernández, M., Luna-Cavazos, M. & Zavaleta-Mancera, H.A. (2006). Quality evaluation and influence of 1-MCP on *Sechium edule* (Jacq.) Sw. fruit during postharvest. *Postharvest Biol. and Technol.*, 40:170-176. doi: 10.1016/j.postharvbio.2005.12.013

Cadena-Iñiguez, J., Avendaño-Arrazate, C.H., Soto-Hernández, M., Ruiz-Posadas, L.M., Aguirre-Medina, J.F. & Arevalo-Galarza, L. (2008). Intraspecific variation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. in the state of Veracruz, Mexico. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 55:835-847. doi: 10.1007/s10722-007-9288-4

Evans, D.A., Sharp, W.R. & Ammirato, P.V. (1986). Handbook of plant cell culture: techniques and applications. Vol 4. Macmillan Publishing Company. New York, USA. 698 pp.

Lira, S.R. (1996). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 8. Chayote. *Sechium edule* (Jacq.) Sw. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Lira, R., Castrejon, J., Zamudio, S. & Rojas, Z.C. (1999). Propuesta de ubicación taxonómica para chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. *Acta Botanica Mexicana*, 49:47-61.

Lira, R. & Caballero, J. (2002). Ethnobotany of the wild Mexican cucurbitaceae. *Economic Botany*, 56:380-398.

Lombardi, L., Casani, S., Ceccarelli, N., Galleschi, L., Picciarelli, P. & Lorenzi, R. (2007).

Programmed cell death of the nucellus during *Sechium edule* Sw. seed development is associated with activation of caspase-like proteases. *J. Exp. Bot.*, 58:2949-2958. doi: 10.1093/jxb/erm137

MBW (2012, 9 de Octubre) México lidera producción de nopal y chayote. Mexican Business Web Newsletter. Recuperado de: <http://www.mexicanbusinessweb.mx/sectores-productivos-de-mexico/agropecuario/mexico-lidera-produccion-de-nopal-y-chayote/>

Mercado, P. & Lira, R. (1994). Contribución al conocimiento de los números cromosómicos de los géneros *Sechium* P. BR. Y *Sicana* NAUDIN (Cucurbitaceae). *Acta Bot. Mexic.*, 27:7-13.

Modgil, M., Modgil, R. & Kumar, R. (2004). Carbohydrate and mineral content of chayote (*Sechium edule*) and bottle gourd (*Lageneria siceraria*). *J. Hum. Ecol.*, 15:157-159.

- Montano, H.G. (2000). Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. *Plant Disease*, 84:429-436.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15:473-497.
- Newstrom, L.E. (1991). Evidence for the origin of chayote *Sechium edule* (Cucurbitaceae). *Econ. Bot.*, 45:410-428.
- Ordoñez, A.A.L., Gómez, J.D., Vattuone, M.A. & Isla, M.I. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem.*, 97:452-458. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.024
- Piaggese, A., Picciarelli, P., Ceccarelli, N. & Lorenzi, R. (1997). Cytokinin biosynthesis in endosperm of *Sechium edule* Sw. *Plant Sci.*, 129:131-140.
- SIAP. (2012, 9 de Octubre). Base de datos de Producción anualizada de cultivos agrícolas. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado de: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=10&Itemid=15
- Somarribas, G., Sandoval, J., & Müller, L. (1991). Propagación vegetativa *in vitro* de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.). Fase de establecimiento. *Turrialba*, 41(4):538-544.
- Sugii, N.C. (2011). The establishment of axenic seed and embryo cultures of endangered Hawaiian plant species: special review of disinfection protocols. *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant*, 47:157-169. doi: 10.1007/s11627-010-9324-5
- Valverde, E., Sánchez, M.V. & Vargas, E. (1989). Estudios preliminares sobre la conservación de la fruta de chayote (*Sechium edule*) después de la cosecha. *Agronomía Costarricense*, 13:25-33.
- Vargas, E. (1987). La vejiga del fruto, una nueva enfermedad del chayote (*Sechium edule* L.). *Agronomía Costarricense*, 12:123-126.
- Vernieri, P., Perata, P., Lorenzi, R., Ceccarelli, N. (1989). Abscisic acid levels during early seed development in *Sechium edule* Sw. *Plant Physiol* 91: 1351-1355.x