

Efecto del estrés hídrico inducido con PEG 6000 sobre el crecimiento *in vitro* de plantas de *Stevia rebaudiana* cv. 'KH-IAN/VC-142'

Liz Bogado Villalba, Héctor Nakayama Nakashima

Laboratorio de Biotecnología, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Universidad Nacional de Asunción. Campus de la UNA, km 11. San Lorenzo. Central. Paraguay. CC 910. e-mail: lizbog09@gmail.com

RESUMEN

La sequía constituye uno de los más importantes estreses abióticos, ya que limita la producción y crecimiento de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del estrés hídrico inducido con polietilenglicol sobre el crecimiento *in vitro* de plantas de *S. rebaudiana* cultivar 'KH-IAN/VC-142'. Se evaluaron variables de crecimiento en plantas *in vitro* sometidas a condiciones simuladas de estrés hídrico con PEG 6000 en concentraciones de 10 000, 1 000, 100, 10 y 1 ppm. Además se incluyó un control sin PEG. Las variables altura de la planta, longitud de raíces, masa fresca y seca fueron afectados negativamente conforme al incremento de la concentración de PEG. Estos resultados demostraron la baja tolerancia del cultivar 'KH-IAN/VC-142' de *S. rebaudiana* al estrés hídrico y posibilitan la aplicación futura en sistemas de selección *in vitro* para la discriminación de cultivares mejorados genéticamente en base a su tolerancia al estrés hídrico.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, estrés por sequía, polietilenglicol

Effect of induced hydric stress with PEG 6000 on *Stevia rebaudiana* cv. 'KH-IAN/VC-142' *in vitro* growth

ABSTRACT

Drought is one of the most important abiotic stresses, since it limits the production and growth of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. The objective of the present work was to determine the effect of water stress induced by polyethylene glycol on the *in vitro* growth of 'KH-IAN / VC-142' *S. rebaudiana* plants. Growth variables were evaluated on *in vitro* plants subjected to simulated conditions of hydric stress with PEG 6000 at concentrations of 10 000, 1 000, 100, 10 and 1 ppm. In addition, a control without PEG was included. The variables plant height, root length, fresh and dry mass were negatively affected as the concentration of PEG increased. These results demonstrated the low tolerance of *S. rebaudiana* 'KH-IAN / VC-142' cultivar to hydric stress and make possible the future application on *in vitro* selection systems for the discrimination of cultivars genetically improved based on their tolerance to hydric stress.

Keywords: drought stress, *in vitro* culture, polyethylene glycol

INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni es una especie vegetal de gran relevancia a nivel mundial, debido al carácter edulcorante de los esteviol glicósidos, los cuales no aportan calorías al organismo (Badran *et al.*, 2015). El cultivar 'KH-IAN/VC-142' (Eireté) obtenido a través de un programa de mejoramiento genético, presenta características agronómicas ampliamente superiores al cultivar 'Criollo', ya que triplica su potencial de rendimiento y tenor de esteviol glicósidos (Casaccia y Álvarez, 2006).

S. rebaudiana es susceptible al estrés hídrico debido a que limita la producción y crecimiento de este cultivo el cual exige un adecuado nivel de humedad del suelo para asegurar su desarrollo a causa de la escasa profundidad de su sistema radicular. Por ello, en condiciones deficitarias de agua se producen daños graves a nivel celular (Casaccia y Álvarez, 2006; Niño *et al.*, 2013).

La biosíntesis de los esteviol glicósidos también puede verse afectada en condiciones de estrés hídrico como consecuencia de la reducción en la transcripción de genes implicados en su

generación. Estos inconvenientes causados por el estrés hídrico impulsan a la búsqueda de alternativas que contribuyan a generar conocimiento y enfrentar esta problemática. Por ello, el estudio de mecanismos de tolerancia al estrés en condiciones *in vitro* mediante el cultivo de tejidos, constituye un recurso válido, que permite el control de variables ambientales y facilita la evaluación de poblaciones numerosas en un espacio reducido y durante un corto período de tiempo (Badran *et al.*, 2015). En los programas de mejoramiento genético, la selección *in vitro* de genotipos tolerantes es posible mediante la adición del polietilenglicol (PEG) a la solución de nutrientes, el cual actúa por reducción del potencial hídrico y la disponibilidad de moléculas de agua en el medio de cultivo (Gopal e Iwama, 2007; Badran *et al.*, 2015).

A pesar de que la sequía se ha acrecentado en los últimos años debido al cambio climático, no se han informado estudios sobre el efecto del estrés hídrico en el cultivar 'KH-IAN/VC-142' de *S. rebaudiana*. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del estrés hídrico inducido con polietilenglicol sobre el crecimiento *in vitro* de plantas de *S. rebaudiana* cultivar 'KH-IAN/VC-142'.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon segmentos nodales (explante) de plantas *in vitro* de *S. rebaudiana* del cultivar 'KH-IAN/VC-142', provenientes del cuarto de cultivo del Laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT). Las plantas se encontraban en sexto subcultivo de multiplicación en medio de cultivo semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962) con 30 g l⁻¹ de sacarosa y 7 g l⁻¹ de agar.

Para simular el estrés hídrico, cada explante fue cultivado en tubos de ensayo con el medio de cultivo basal MS y diferentes concentraciones de Polietilenglicol 6000 (PEG 6000) en un rango de 10 000 ppm, 1 000 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm y como control 0 ppm. Estos fueron mantenidos en una cámara de crecimiento durante un período de tres semanas, bajo condiciones de esterilidad, con fotoperíodo de 16 horas luz proporcionada por

tubos fluorescentes de luz fría con intensidad lumínica de 3000 lux a 25±2°C.

En este ensayo se utilizó un diseño completamente al azar, en el cual se estudiaron seis tratamientos con diez repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por un segmento nodal colocado en un medio de cultivo contenido en un tubo de ensayo.

Luego de tres semanas de exposición a las distintas concentraciones de PEG 6000, se midió la altura de la planta (cm) y la longitud de las raíces (cm). Además, se determinó la masa fresca y seca de las plantas *in vitro* (mg). La masa fresca se determinó inmediatamente y para la masa seca las muestras se secaron en una estufa a 70°C durante 24 horas.

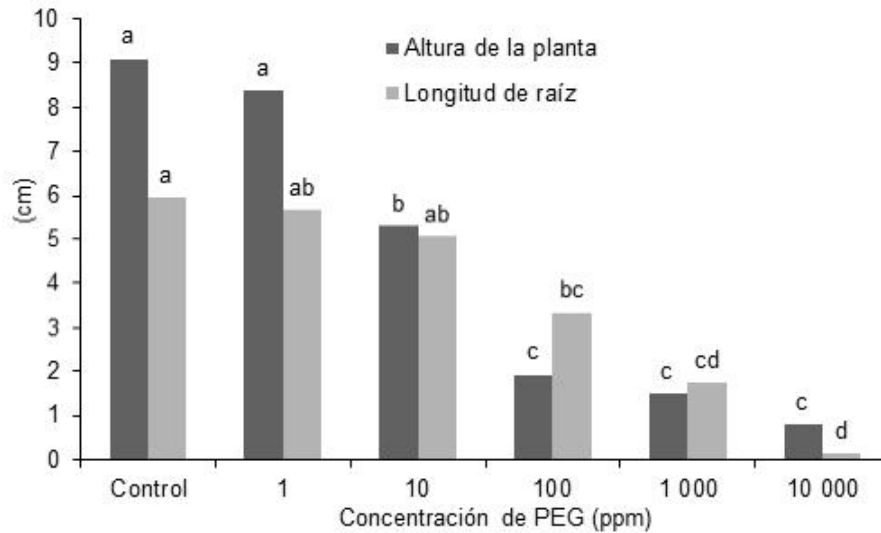
Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante el paquete estadístico InfoStat versión 2014. Para determinar el grado de significancia se utilizó la prueba de ANOVA ($p < 0.01$) y la comparación entre las medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$), previa comprobación del cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

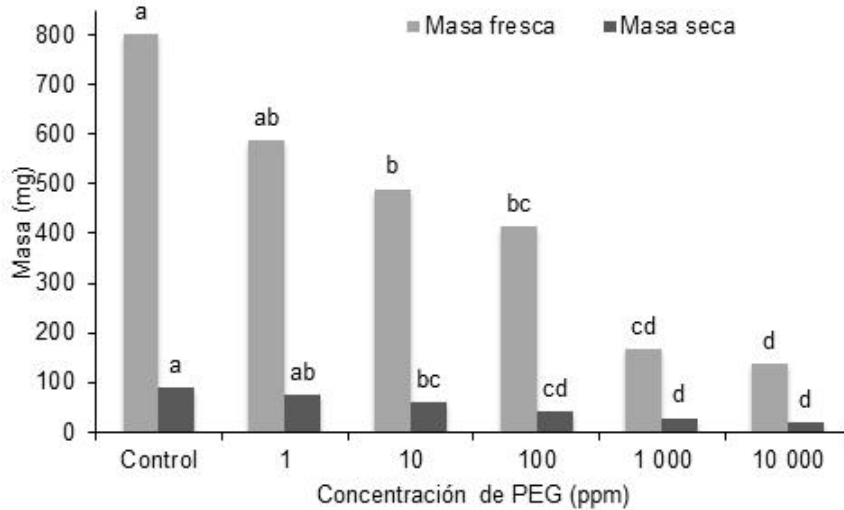
Todas las variables evaluadas en *S. rebaudiana*, disminuyeron con el incremento de la concentración de PEG. Tanto la altura de la planta (Figura 1) como la masa fresca y seca (Figura 2) mostraron una respuesta similar, ya que para ambos solo la concentración mínima correspondiente a 1 ppm de PEG en el medio de cultivo no presentó diferencia significativa en relación con el grupo control. Esto coincide con lo observado por Bradan *et al.* (2015). Estos autores hallaron la misma tendencia en dos cultivares de *S. rebaudiana* sometidos a estrés con PEG. Presiones hídricas elevadas en los tejidos de las plantas influyen en procesos tales como la elongación y la expansión celular debido a la reducción de la tasa fotosintética por el cierre estomático, además del aumento en la senescencia foliar, dadas las condiciones de estrés hídrico (Niño *et al.*, 2013).

Se detectaron inhibiciones significativas en la longitud de la raíz de *S. rebaudiana* a partir de 100 ppm de PEG con respecto al control



Letras diferentes sobre las barras para cada variable indican diferencias significativas entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey para $p < 0.05$

Figura 1. Longitud de raíces y altura de plantas *in vitro* de *S. rebaudiana* cultivar 'KH-IAN/VC-142' luego de tres semanas de exposición a distintas concentraciones de PEG 6000.



Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas entre las medias de acuerdo con la prueba de Tukey para $p < 0.05$

Figura 2. Masa fresca y seca de plantas *in vitro* de *S. rebaudiana* cultivar 'KH-IAN/VC-142' después de tres semanas de exposición a distintas concentraciones de PEG 6000.

(Figura 1). Resultados similares sobre el efecto del estrés hídrico inducido con PEG han sido informados por Gopal e Iwama (2007) quienes constataron el efecto negativo del aumento de la concentración de PEG en el medio de cultivo sobre el desarrollo de la raíz, en tres genotipos de *Solanum tuberosum* L. El déficit hídrico moderado produce un aumento de la relación raíz/tallo debido incremento del ácido abscísico,

el cual corresponde a una hormona cuyos niveles aumentan en condiciones de estrés, y favorece el crecimiento radicular e inhibe el desarrollo del tallo (Taiz y Zeiger, 2006). Este fenómeno del incremento de la relación raíz/tallo fue constatado en este estudio a las concentraciones de 100 y 1000 ppm de PEG, pudiendo ser útiles como valores de referencia de modo a contrastarlos con otros cultivares.

CONCLUSIONES

El estrés hídrico simulado con PEG 6000 en plantas *in vitro* de *S. rebaudiana* cultivar 'KH-IAN/VC-142' afecta negativamente la altura de la planta, la longitud de raíces, masa fresca y seca conforme al incremento de la concentración del agente estresante. Concentraciones superiores a 10 ppm provocan una reducción significativa de las variables anteriores lo que denota su sensibilidad y baja resistencia al estrés hídrico. Estos resultados posibilitan el empleo de variables de crecimiento afectados por el estrés hídrico en sistemas de selección *in vitro* para la discriminación de cultivares tolerantes en programas de mejoramiento genético.

REFERENCIAS

Badran AE, Mohamed RA, Abd A, Waffa AH (2015) *In vitro* evaluation of Some traits in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) under drought stress and their relationship on stevioside content. American Journal of Plant Sciences 6 (5): 746-752; doi: 10.4236/ajps.2015.65080

Casaccia J, Álvarez E (2006) Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del ka'a he'e (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) en el Paraguay. MAG. Caacupe

Gopal J, Iwama K (2007) *In vitro* screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. Plant Cell Rep 26 (5):693-700; doi: 10.1007/s00299-006-0275-6

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

Niño JA, Cuervo JL, Villalobos R (2013) Efecto del potencial mátrico del suelo en el crecimiento del cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). Rev Colomb Cienc Hortic 7(2): 240-251

Taiz L, Zeiger E (2006) Fisiología Vegetal. Universitat Jaume I, Los Angeles; ISBN: 8480216018

Recibido: 12-06-2016
Aceptado: 02-09-2016