

Efecto de edulcorante a base de *Stevia rebaudiana* en el cultivo *in vitro* de *Cuitlauzina pendula*

Juan Christian Altamirano López, Agustín Iván Cabezas Aguilar, David García Hernández

Universidad Tecnología de Morelia. Calle vicepresidente Pino Suárez No 750. Col Ciudad industrial. Morelia Michoacán de Ocampo. México. CP 58 200. e-mail: ing_agustin_utm@hotmail.com

RESUMEN

El cultivo *in vitro* es una alternativa para la conservación de orquídeas (*Orchidaceae*) amenazadas. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de un edulcorante a base de *Stevia rebaudiana* sobre el desarrollo de plántulas y formación de pseudobulbos en *Cuitlauzina pendula*. Las semillas se germinaron en medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento. Las plántulas obtenidas se subcultivaron en un medio de cultivo MS con las sales al 100%, 1 g l⁻¹ de carbón activado y 0.5 ml de 6-bencilaminopurina y se adicionaron diferentes concentraciones del edulcorante CANDEREL® stevia (5, 10, 15, 20, 25 g l⁻¹). Se usó un control que contenía sacarosa (25 g l⁻¹) como fuente de carbono. Se midió la altura de las plántulas (cm) y se observó la presencia de pseudobulbos en cada tratamiento. La presencia del edulcorante en el medio de cultivo de 5 a 25 g l⁻¹ no tuvo influencia en la altura de las plántulas. Las plántulas cultivadas con el edulcorante y el control con sacarosa desarrollaron pseudobulbos *in vitro* pero concentraciones superiores a 5 g l⁻¹ se favoreció la formación de estas estructuras con respecto al control. El edulcorante CANDEREL® stevia puede ser utilizado como fuente alternativa de carbono en el cultivo *in vitro* de *Cuitlauzina pendula* ya que no afecta la altura de las plantas y favorece la formación de pseudobulbos. Este es el primer informe donde se utiliza como fuente de carbono un producto de stevia en el cultivo *in vitro* de orquídeas.

Palabras clave: carbohidratos, orquídea, pseudobulbos

Effect of *Stevia rebaudiana* based sweetener on *Cuitlauzina pendula* *in vitro* culture

ABSTRACT

In vitro culture is an alternative for the conservation of endangered orchids (*Orchidaceae*). The objective of this work was to determine the effect of a *Stevia rebaudiana* sweetener based on the development of seedlings and pseudobulbs formation in *Cuitlauzina pendula*. The seeds were germinated in MS culture medium without growth regulators. The seedlings obtained were subcultured in an MS culture medium with 100% salts, 1 g l⁻¹ activated charcoal and 0.5 ml 6-benzylaminopurine and different concentrations of the sweetener CANDEREL® stevia (5, 10, 15, 20, 25 g l⁻¹). A control containing sucrose (25 g l⁻¹) was used as the carbon source. The height of the seedlings (cm) was measured and the presence of pseudobulbs was observed in each treatment. The presence of the sweetener in the culture medium of 5 to 25 g l⁻¹ had no influence on the height of the seedlings. Seedlings cultured with sweetener and control with sucrose developed pseudobulbs *in vitro* but concentrations higher than 5 g l⁻¹ favored the formation of these structures with respect to the control. The sweetener CANDEREL® stevia can be used as an alternative carbon source in the *in vitro* culture of *Cuitlauzina pendula* as it does not affect the height of the plants and favors the pseudobulbs formation. This is the first report where a stevia product is used as the carbon source in the *in vitro* culture of orchids.

Keywords: carbohydrate, orchid, pseudobulbs

INTRODUCCIÓN

La familia *Orchidaceae* es una de los más grandes del Reino *Plantae*. Estimaciones sugieren que deben existir entre 20 000 y 30 000 especies (Hagsater *et al.*, 2005). La mayoría son plantas epífitas, algunas son terrestres y otras son litofíticas (Damon, 2006). Las orquídeas son consideradas como una de las flores más hermosas a nivel mundial.

Cuitlauzina pendula La Llave & Lex. (1825) es una planta endémica de México, su distribución abarca desde el sureste del país, la sierra madre occidental y la Sierra Madre del sur. Se han encontrado en bosques de robles, en los estados de Jalisco, Nayarit, Michoacán, México, Guerrero y Oaxaca, desde los 1400 a 2300 metros sobre el nivel del mar (Jenny, 2007). Es una de las orquídeas más conocidas por la población local, tiene el nombre común de chorrillo.

Grandes cantidades de *C. pendula* son ofrecidos cada año en los mercados de las ciudades del sur del país (Soto y Solano, 2007). Esto ha ocasionado que esta orquídea de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (NOM-059-SEMARNAT, 2010) se considere una especie amenazada.

Otra desventaja para la conservación de las orquídeas es que sus semillas se caracterizan por ser diminutas y carecer de endospermo (Aguilar y López, 2013). El cultivo *in vitro* es una alternativa de conservación que incrementa el porcentaje de germinación de las semillas (Flores-Escobar *et al.*, 2011; Salazar y Orlando, 2012; Zhao *et al.*, 2013; Afraire *et al.*, 2015; Bertolini *et al.*, 2014).

Para el desarrollo de las orquídeas en cultivo *in vitro* la fuente de carbono es muy importante (Harvais y Hadley, 1967). Se conoce que la glucosa en diferentes concentraciones favorece el crecimiento *in vitro* de orquídeas (Hong *et al.*, 2008). Otros estudios informan del uso de fructuosa y sacarosa (Faria *et al.*, 2004; Murdad *et al.*, 2010; Rafique *et al.*, 2013). La concentración de los carbohidratos también favorece la formación de callos para regenerar plantas por embriogénesis u organogénesis indirecta (Tokuhara y Mii, 2003; Rafique *et al.*, 2013).

Varios autores mencionan que los pseudobulbos son una fuente de almacenamiento de carbohidratos, los cuales son utilizados por las orquídeas cuando se encuentran bajo condiciones de estrés para la formación de nuevos brotes e inflorescencias (Zimmerman y Whigham, 1992; Vaz *et al.*, 1998; Yew y Sin, 2000; Cesare *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2013). En este sentido, Vaz *et al.* (1998) determinaron que los carbohidratos solubles en agua representaron una alternativa de reserva en los pseudobulbos de *Catasetum umbriatum* (C. Morren) Lindl., siendo los glucomananos el principal carbohidrato de las plantas jóvenes con el 70% del total.

Los extractos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), contienen un alto nivel de compuestos edulcorantes (esteviósido y rebaudiósido A), conocidos como glucósidos de esteviol. Son termoestables incluso a temperaturas de hasta 200°C. Se cree que poseen actividad antioxidante, antimicrobiana y antifúngica (Lemus *et al.*, 2012). Teixeira (2015) informó del uso de un extracto de hojas frescas de *S.*

rebaudiana en el cultivo *in vitro* de *Syngonium podophyllum* L. Resultó en pobre crecimiento de las plantas posiblemente atribuido a la baja concentración usada. Su uso como fuente de carbono en el medio de cultivo para la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas podría ser una alternativa al empleo de sacarosa y permitir el desarrollo de las plántulas. Atendiendo a lo anterior, el objetivo del trabajo fue determinar el efecto *in vitro* de un edulcorante a base de *S. rebaudiana* sobre el crecimiento de plántulas y formación de pseudobulbos en *Cuitlauzina pendula*. Este es el primer informe donde se utiliza como fuente de carbono un producto de stevia en el cultivo *in vitro* de orquídeas.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se emplearon semillas de orquídea *C. pendula* que fueron donadas de una colección privada de la ciudad de Morelia, México.

Obtención de plántulas

A las semillas se les dio un tratamiento de desinfección de acuerdo con el método propuesto por SEMARNAT (2011) y en la campana de flujo laminar se colocaron en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento. Aproximadamente 0.5 g de semillas fueron distribuidas en tres frascos de vidrio tipo Gerber®. Los frascos de cultivo con las semillas de *C. pendula* se ubicaron a 27°C, 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Las plántulas se mantuvieron en este medio de cultivo hasta obtener una altura promedio de 1.4 cm.

Efecto de la adición de edulcorante a base de *S. rebaudiana* en el medio de cultivo

Las plántulas obtenidas se subcultivaron en un medio de cultivo MS con las sales al 100%, 1 g l⁻¹ de carbón activado y 0.5 ml de 6-bencilaminopurina (BAP). El pH fue ajustado a 5.7 antes de la esterilización y se adicionaron diferentes concentraciones del edulcorante a base de *S. rebaudiana* (CANDEREL® stevia, composición: azúcar 1.45 g 100 g⁻¹ de producto y rebaudiósido A 0.40 g 100 g⁻¹ de producto) (5, 10, 15, 20, 25 g l⁻¹). Se usó un control que contenía sacarosa (25 g l⁻¹) como fuente de carbono.

Todos los medios de cultivo utilizados en los tratamientos se esterilizaron en autoclave (1 atm de presión/15min/121°C). Cada tratamiento consistió en un total de ocho frascos con cinco plántulas cada uno. Estos se mantuvieron a 27°C, 16/8 h de luz/oscuridad durante 30 días. Después de este periodo se tomaron tres muestras por tratamiento durante 10 semanas, se midió la altura de las plántulas (cm) y se observó la presencia de pseudobulbos en cada tratamiento.

Análisis estadístico

Los datos se sometieron a análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas con prueba de Bartlett. Se llevó a cabo un ANOVA simple y las medias se compararon mediante la prueba Tukey con una $p < 0.05$. Los datos

se procesaron mediante el software STATGRAPHICS Centurion XV Versión 15.2.06.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de 8 meses *in vitro*, a partir de las semillas germinadas se obtuvieron 180 plántulas con una altura promedio de 1.4 cm (Figura 1).

La presencia del edulcorante en el medio de cultivo de 5 a 25 g l⁻¹ no tuvo influencia en la altura de las plántulas. No se encontraron diferencias significativas con respecto al control con sacarosa en las evaluaciones realizadas (Figura 2). Este aspecto indicó que la incorporación del edulcorante al medio de cultivo puede ser una alternativa para el crecimiento de las plántulas de esta especie de orquídea.

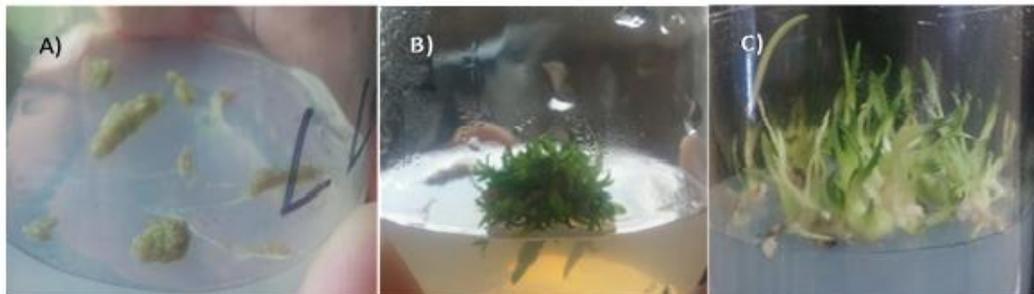


Figura 1. Semillas germinadas de *Cuitlauzina pendula* en medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento. A) Germinación a los 23 días después de la siembra. B) Plántulas de tamaño irregular a los 2 meses de cultivo. C) Plántulas con una altura uniforme (~1.4 cm) después de 8 meses de cultivo.

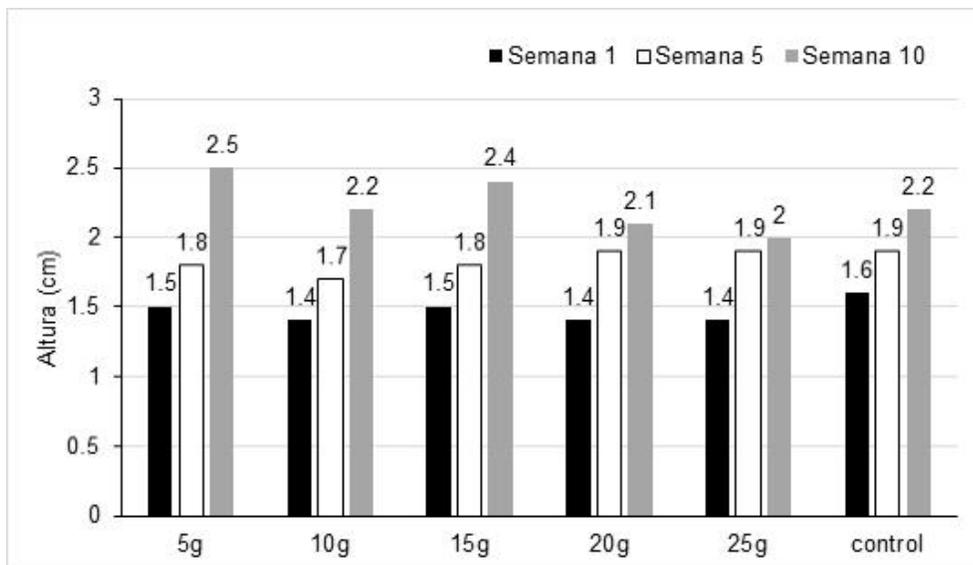


Figura 2. Altura de las plántulas de *Cuitlauzina pendula* en medio de cultivo con diferentes concentraciones de edulcorante a base de *Stevia rebaudiana* (5-25 g l⁻¹) y un control con sacarosa (25 g l⁻¹).

Por otra parte, las plántulas cultivadas con las diferentes concentraciones del edulcorante y el control con sacarosa desarrollaron pseudobulbos *in vitro*. A

partir de la semana 5 y hasta la semana 10 de cultivo se apreciaron en los tratamientos con el producto a base de *S. rebaudiana* (Figura 3).

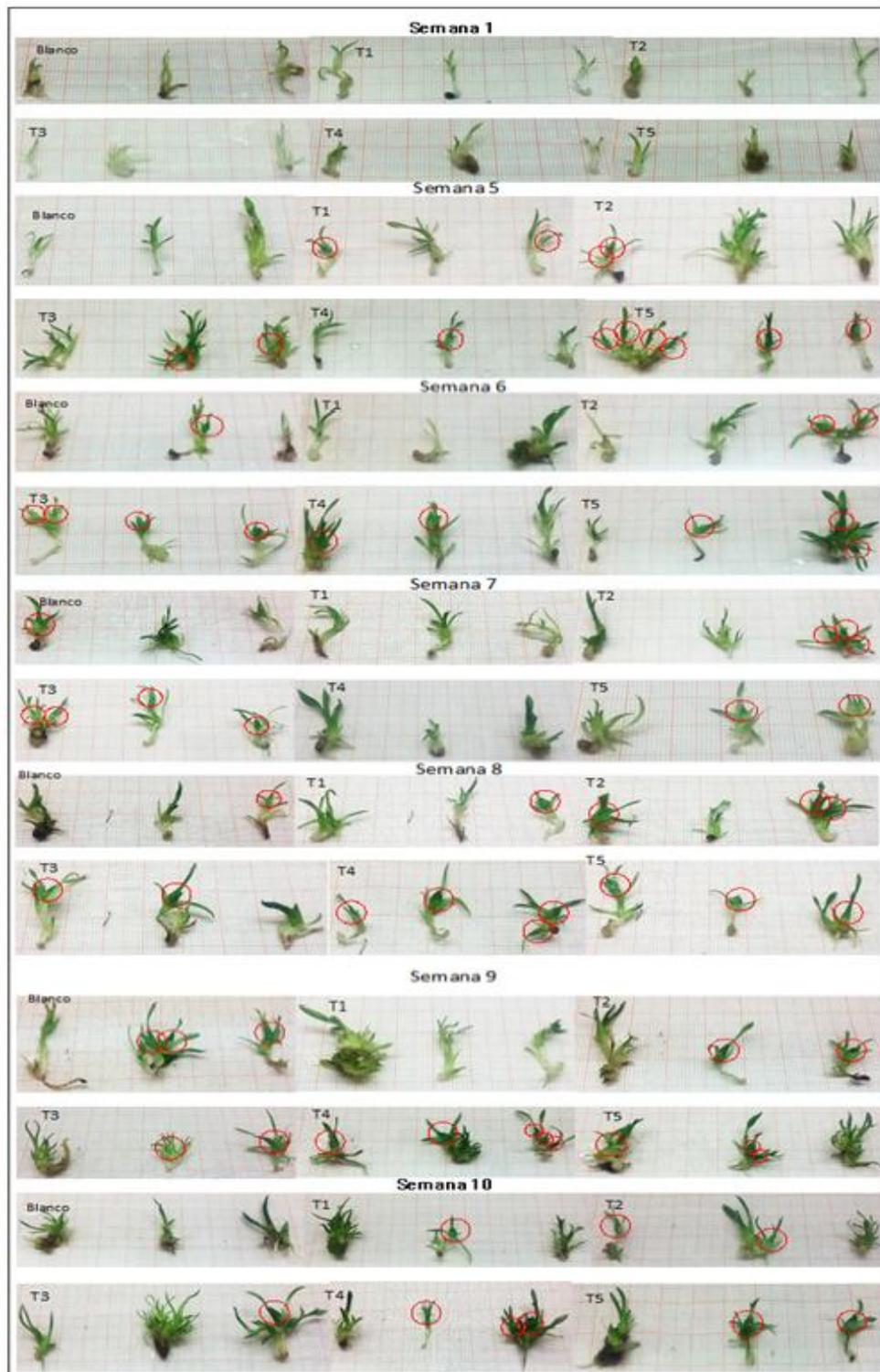


Figura 3. Presencia de pseudobulbos (círculos rojos) en plántulas de *Cuitlauzina pendula* desde la semana 5 a la 10 de cultivo en presencia de edulcorante a base de *S. rebaudiana* y un control con sacarosa.

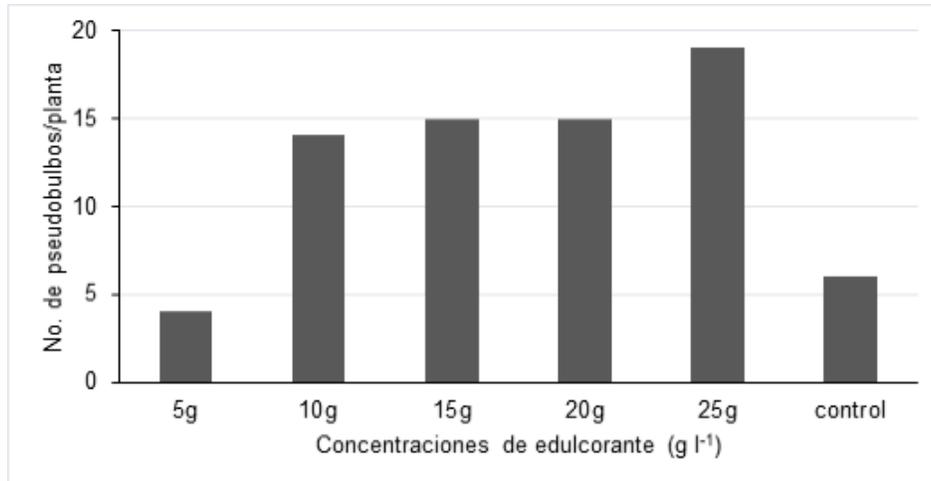


Figura 4. Presencia de pseudobulbos en plantas de *Cuitlauzina pendula* después de cinco semanas *in vitro* en medio de cultivo con diferentes concentraciones (5-25 g l⁻¹) de un edulcorante a base de *S. rebaudiana* (Canderel®). Control con sacarosa 25 g l⁻¹ en el medio de cultivo.

La presencia del edulcorante en el medio de cultivo en los tratamientos con concentraciones superiores a 5 g l⁻¹ favoreció la formación de pseudobulbos. A excepción de este tratamiento, en el resto, el número de estas estructuras sobrepasó al control con sacarosa (Figura 4).

Vaz *et al.* (1998), mencionaron que las plantas jóvenes almacenan el 70% de los carbohidratos en los pseudobulbos. Los glucósidos contenidos en el edulcorante, donde el Rebaudiósido A tiene la mayor proporción, pudieron haber sido asimilados por las plántulas y esto ayudó a la formación de los pseudobulbos y posiblemente a la acumulación de sustancias de reserva. En el cultivo *in vitro* de otras plantas ornamentales se ha comprobado que los niveles elevados de carbohidratos como glucosa, fructuosa o sacarosa inducen la formación de órganos de almacenamiento. Especialmente, la glucosa puede actuar como molécula señal ya que las hexosas son consideradas como un regulador de muchos procesos biológicos (Koch, 1996; Podwyszynska, 2012).

Sin embargo, se requieren otros estudios que permitan dilucidar el papel de estas sustancias en la morfogénesis de los pseudobulbos de *C. pendula* quizás vinculado al mayor número de moléculas de glucosa presentes en el edulcorante, su solubilidad en el medio de cultivo o al potencial osmótico. El incremento de la osmolaridad del medio de cultivo y la

adición de fuentes metabolizables de carbono estimula la formación de bulbos independientemente del tipo de carbohidrato (Koch, 1996). Según Yaseen *et al.* (2013) en sistemas de micropropagación el potencial morfogénico de los tejidos de las plantas puede ser manipulado por variaciones en el tipo y concentración de fuentes de carbono.

CONCLUSIONES

El edulcorante a base de *S. rebaudiana* CANDEREL® stevia puede ser utilizado como fuente alternativa de carbono en el cultivo *in vitro* de *Cuitlauzina pendula* ya que no afecta la altura de las plantas y favorece la formación de pseudobulbos.

AGRADECIMIENTOS

Al programa CONACYT-FORDECYT-SICDET del Gobierno del Estado de Michoacán por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto y a Karen Monserrat Rodríguez Solís, Ricardo Santillán Mendoza y Amelia Cristina Montoya Martínez por su apoyo otorgado.

REFERENCIAS

Afraire L, Borges V, Galdi B, Fernanda F, Aguiar T, Ferreira S, Campos O (2015) *In vitro* propagation of *Cyrtopodium saintlegerianum* rchb. f. (orchidaceae), a native orchid of the Brazilian Savanna. Crop Breeding and Applied Biotechnology 15(1): 10-17; doi: 10.1590/1984-70332015v15n1a2

- Aguilar M, López A (2013) Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr, una herramienta para su conservación *ex situ*. En: Pulido-Flores G y Scoot M (eds). Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas, pp. 18-24. Zea Books, Lincoln
- Bertolini V, Damon A, Rojas A (2014) Quelato de hierro y agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae). Acta Agronómica 63(3): 229-237; doi: 10.15446/acag.v63n3.42735
- Cesare G, Mazzaferab P, Silveira M (2001) Effect of a drought period on the mobilisation of non-structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid. Plant Physiology and Biochemistry 39(11): 1009-1016; doi: 10.1016/S0981-9428(01)01321-3
- Damon A (2006) Cultivo rústico y sustentable de orquídeas nativas del Soconusco. Fundación produce Chiapas, Chiapas
- Faria R, Rodrigues F, Oliveira L, Müller C (2004) *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentration. Horticultura Brasileira 22(4): 780-783; doi: 10.1590/S0102-05362004000400023
- Flores-Escobar G, Gil I, Colinas M, Mata M (2011) Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* bateman ex. Lind. Revista Chapingo Serie Horticultura 17(1): 5-8
- Harvais G, Hadley G (1967) The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. New Phytologist 66(2): 217-230
- Hagsater E, Soto M, Salazar G, Jiménez R, López M, Dressler L (2005) Las orquídeas de México. Productos Farmacéuticos, México; ISBN: 968-7889-07-1
- Hong P, Chen J, Chang W (2008) Promotion of direct somatic embryogenesis of *Oncidium* by adjusting carbon sources. Biologia Plantarum 52(3): 597-600; doi: 10.1007/s10535-008-0119-z
- Jenny R (2007) *Cuitlauzina pendula* History and Culture of an Orchid Described in 1825. Disponible en: https://aos.org/am/images/pdf/cuitlauzina_pendula.pdf. Consultado 22/12/2016
- Jin Y, Jae H, Sun K (2013) Carbohydrate changes in *Cymbidium* 'Red Fire' in response to night interruption. Scientia Horticulturae 162: 82-89; doi: 10.1016/j.scienta.2013.07.045
- Koch KE (1996) Carbohydrate regulated gene expression in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47: 509-540; doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.509
- Lemus R, Vega A, Zura L, Ah L (2012) *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry 132(1): 1121-1132; doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology plant 15(3): 473-497; doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Murdad R, Latip M, Abdul Z, Ripin R (2010) Effects of carbon source and potato homogenate on *in vitro* growth and development of Sabah's Endangered orchid: *Phalaenopsis gigantea*. Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 18(1): 199-202
- NOM-059-SEMARNAT (2010) NOM-059-SEMARNAT-2010 Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial, México DF
- Rafique R, Fatima B, Usma M, Iqbal M, Hassan S, Shabbir K, Rasheed M (2013) Effect of sucrose on *in vitro* callogenesis, embryogenesis and organogenesis of *Dendrobium sabin* H. International Journal of Modern Agriculture 2(1): 43-47
- Salazar S, Orlando G (2012) Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología 14(1): 53-59
- SEMARNAT (2011) Manual para la propagación de orquídeas. Gobierno federal, México
- Soto M, Solano A (2007) Ficha técnica de *Cuitlauzina pendula*. En: Soto- Arenas M A (ed). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY- NOM-059-ECOL-2000, pp. 1-9. Instituto Chinoin AC Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología AC Bases de datos SNIB-CONABIO Proyecto W029, México.
- Tokuhara K, Mii M (2003) Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of phalaenopsis orchids by adjusting carbohydrate sources. *In Vitro Cellular, Developmental Biology Plant* 39(6): 635-639; doi: 10.1079/IVP2003466
- Vaz A, Kerbauy G, Figueiredo R (1998) Changes in soluble carbohydrates and starch partitioning during vegetative bud formation from root tips of *Catasetum umbriatum* (Orchidaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54(2): 105-111; doi: 10.1023/A:1006179404376

Yaseen M, Touqeer A, Gaurav S, Alvaro S, Ahmad H (2013) Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. Molecular Biology Reports 40(4): 2837–2849; doi: 10.1007/s11033-012-2299-z

Yew C, Sin C (2000) Orchid pseudobulbs - 'false' bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival. Scientia Horticulturae 83(3): 165-172; doi: 10.1016/S0304-4238(99)00084-9

Zimmerman J, Whigham D (1992) Ecological Functions of Carbohydrates Stored in Corms of

Tipularia discolor (Orchidaceae). Functional Ecology 6 (5): 575-58; doi: 10.2307/2390055

Zhao D, Hu G, Chen Z, Shi Y, Zheng L, Tang A, Long C (2013) Micropropagation and *in vitro* flowering of *Dendrobium wangliangii*: a critically endangered medicinal orchid. Journal of Medicinal Plants Research 7(28): 2098-2110; doi: 10.5897/JMPR11.1777

Recibido: 31-03-2017
Aceptado: 10-05-2017