



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y  
PRODUCTIVIDAD**

**FISIOLOGÍA VEGETAL**

**USO DE ACTIVADORES EN LA  
PRODUCCIÓN DE  
ESTEVIÓSIDOS A PARTIR DE  
CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE  
*Stevia rebaudiana* Bertoni**

LIZBETH MEJIA ESPEJEL

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

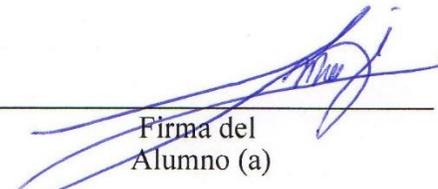
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe LIZBETH MEJIA ESPEJEL, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis USO DE ACTIVADORES EN LA PRODUCCIÓN DE ESTEVIÓSIDOS A PARTIR DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE Stevia rebaudiana Bertoni y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 22 de mayo de 2018

  
Firma del  
Alumno (a)

  
ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ  
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Uso de activadores en la producción de esteviósidos a partir de células en suspensión de *Stevia rebaudiana* Bertoni**, realizada por la alumna: **Lizbeth Mejía Espejel**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

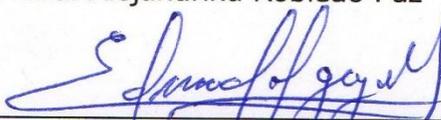
DOCTORA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FISIOLOGÍA VEGETAL  
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



\_\_\_\_\_  
Dra. Alejandrina Robledo Paz

ASESOR



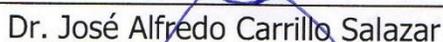
\_\_\_\_\_  
Dr. Edmundo Lozoya Gloria

ASESORA



\_\_\_\_\_  
Dra. Cecilia B. Peña Valdivia

ASESOR



\_\_\_\_\_  
Dr. José Alfredo Carrillo Salazar

ASESOR



\_\_\_\_\_  
Dr. Gregorio Arellano Ostoa

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo de 2018

# USO DE ACTIVADORES EN LA PRODUCCIÓN DE ESTEVIÓSIDOS A PARTIR DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Stevia rebaudiana* Bertoni

Lizbeth Mejía Espejel, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2018

## RESUMEN

*Stevia rebaudiana* Bertoni produce glucósidos conocidos como esteviósidos y han aumentado su demanda. Las técnicas biotecnológicas se utilizan como una alternativa para aumentar la producción de estos compuestos. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de activadores en la síntesis de esteviósidos en los callos de *S. rebaudiana*. Para cumplir con este objetivo, se cultivaron segmentos de hoja y nudos (explantes) en el medio nutritivo de Murashige y Skoog (MS) que contenía diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores del crecimiento (bencilaminopurina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido naftaleno acético y ácido 4-fluorofenoxiacético). Los callos obtenidos de segmentos de hojas se cultivaron en un medio que contenía ácido salicílico (10 y 100 mM), metil jasmonato (10 y 100 mM), ácido cítrico (200 mg L<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (100 mg L<sup>-1</sup>), 2,4 -ácido diclorofenoxiacético (1.5 mg L<sup>-1</sup>) y bencilaminopurina (1.5 mg L<sup>-1</sup>), bajo luz roja, azul o blanca durante 24 h, a 25 o 28 ° C. Concentraciones de 1.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 2,4-D produjeron el mayor número de callos friables y muy baja oxidación fenólica en explantes de hojas. Los callos cultivados a 28 °C o con 100 mM de ácido salicílico aumentaron su producción de esteviósido en 9.8 veces en comparación con la de las hojas de plantas cultivadas en condiciones de invernadero. La concentración de rebaudiósido A exhibió los valores más altos (34.6 veces más altos que en las hojas) mediante la aplicación de 10 mM de ácido salicílico. La acumulación de esteviol se dio en presencia de antioxidantes y reguladores del crecimiento y combinando 100 mM de ácido salicílico con 28 °C. El ácido salicílico, ciertos tipos de antioxidantes exógenos, reguladores del crecimiento y la temperatura pudieron promover la acumulación de esteviósidos.

**Palabras clave:** estevia, callo, ácido salicílico, metil jasmonato, luz, temperatura, esteviósidos.

# ELICITORS ON STEVIOSIDES PRODUCTION IN *Stevia rebaudiana* Bertoni CALLI

Lizbeth Mejía Espejel, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2018

## ABSTRACT

*Stevia rebaudiana* Bertoni produces glycosides known as steviosides and they have increased their demand. Biotechnological techniques are used as an alternative to increase the production of these compounds. The aim of this study was to determine the effect of elicitors on the synthesis of steviosides in the calli of *S. rebaudiana*. To meet this goal, leaf segments and nodes (explants) were grown in the nutrient medium of Murashige and Skoog (MS) that contained different concentrations and combinations of growth regulators (benzylaminopurine, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, naphthalene acetic acid and 4-fluorophenoxyacetic acid). Calli obtained from leaf segments were cultured on medium containing salicylic acid (10 and 100 mM), methyl jasmonate (10 and 100 mM), citric acid (200 mg L<sup>-1</sup>), ascorbic acid (100 mg L<sup>-1</sup>), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (1.5 mg L<sup>-1</sup>), and benzylaminopurine (1.5 mg L<sup>-1</sup>), under red, blue or white light for 24 h, at 25 or 28 °C. Concentrations of 1.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP and 2,4-D produced the highest number of friable calli and very low phenolic oxidation in leaf explants. The calli cultivated at 28 °C or with 100 mM of salicylic acid increased their stevioside production by 9.8 times compared to that of the leaves of plants grown under greenhouse conditions. The concentration of rebaudioside A exhibited the highest values (34.6 times higher than in leaves) by applying 10 mM of salicylic acid. The accumulation of steviol was given in the presence of antioxidants and growth regulators and combining 100 mM of salicylic acid with 28 °C. Salicylic acid, certain types of exogenous antioxidants, growth regulators and temperature may promote the accumulation of steviosides.

**Keywords:** *Stevia*, callus, methyl jasmonate, salicylic acid, light, temperature, steviosides.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico que me concedió durante el periodo de mis estudios doctorales.

Al Colegio de Postgraduados, por brindarme la oportunidad de haber formado parte de esta reconocida Institución.

A la Dra. Alejandrina Robledo Paz, por el espacio que me otorgó para aprender de Ella, quien además de Consejera es una valiosa persona. Gracias por todo.

Al Dr. Edmundo Lozoya Gloria, por aportar conocimiento y tiempo a este trabajo de investigación.

Al Dr. Gregorio Arellano Ostoa, por abrirme las puertas de su laboratorio y facilitarme las herramientas necesarias para cumplir algunos de los objetivos de este trabajo.

A la Dra. Cecilia B. Peña Valdivia, por dedicar tiempo para aportar valiosas opiniones con el objetivo de mejorar el resultado del presente escrito.

Al Dr. J. Alfredo Carrillo Salazar, por darme a conocer sus observaciones basadas en su experiencia y conocimiento para culminar este trabajo.

Al Dr. R. Marcos Soto Hernández, por compartir sus conocimientos y equipo de laboratorio, además de siempre haber tenido el espacio para aclarar mis dudas.

A la señora Silvia Antero de la Torre (†), por su apoyo y compañía tan valiosa en los días de trabajo en el laboratorio.

Al M. C. Rubén San Miguel Chávez, y a todos los laboratoristas y personas que de alguna forma contribuyeron a que pudiera avanzar en mi trabajo de investigación.

## DEDICATORIA

A Emelia Espejel Sánchez, mis logros comenzaron gracias a ti mami, y siguen siendo en gran medida gracias a ti; sin tu amor y apoyo incondicional mi camino en esta vida se tornaría muy difícil. Gracias por existir.

A mi padre, Fernando Mejía Araoz (†), que ahora estas con el dador de vida, pero por siempre presente en mi corazón...

“Ya no estás aquí, ya no,  
en la región donde de algún modo se existe,  
nos dejaste sin provisión en la tierra” (Nezahualcóyotl).

A Bruno Paul Mejía, porque a tu corta edad me has demostrado ser una persona sumamente valiosa, siempre apoyando y comprendiendo mis ausencias por alcanzar este objetivo, te amo hijo.

A Julio Paul Mejía, sé que no hace falta un día en especial para reconocer tu valiosa presencia en mi vida, pero esta es otra oportunidad más para agradecer el soporte que me otorgas, siempre dándome aliento para salir adelante, te amo.

A Oralia Mejia Espejel, cómo no quererte tanto, gracias por ser mi hermanita mayor. Te quiero mucho.



## CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
DEDICATORIA.....	vii
LISTA DE CUADROS .....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVOS.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Particulares .....	4
HIPÓTESIS .....	5
Hipótesis General.....	5
Hipótesis Particulares.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
Descripción botánica de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni .....	6
Importancia de <i>S. rebaudiana</i> .....	6
Otros sustitutos del azúcar .....	9
Aspartame.....	9
Fructosa cristalina.....	10
Sorbitol, manitol y xilitol.....	11
Cultivo de tejidos: formación de callo y cultivos en suspensión .....	11
Reguladores de crecimiento .....	12
Auxinas.....	13
Citocininas.....	14
Giberelinas .....	15
Etileno .....	15
Ácido abscísico (ABA).....	16

Brasinoesteroides .....	16
Metabolitos secundarios .....	17
Activación de la síntesis de metabolitos secundarios .....	19
Ácido salicílico (AS) .....	19
Metil jasmonato (MeJA).....	20
Espectro de luz.....	21
Temperatura .....	23
LITERATURA CITADA .....	25
CAPÍTULO I. OBTENCIÓN DE CALLOS FRIABLES A PARTIR DE EXPLANTES DE HOJA Y SEGMENTOS NODALES DE <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	39
1.1 RESUMEN.....	39
1.2 INTRODUCCIÓN .....	40
1.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
1.3.1 Material Vegetal .....	41
1.3.2 Desinfestación del material vegetal .....	41
1.3.3 Medios de cultivo para la inducción de callo friable.....	42
1.3.4 Inducción del callo .....	42
1.3.5 Multiplicación de los callos .....	43
1.3.6 Variables de respuesta.....	44
1.3.7 Análisis estadístico de las variables de respuesta.....	45
1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	46
1.4.1 Efecto del medio de cultivo en la formación de callo .....	46
1.4.2 Efecto del medio de cultivo en la oxidación fenólica.....	47
1.4.3 Efecto del medio de cultivo sobre el tipo de callo .....	48
1.5 CONCLUSIONES.....	51
1.6 LITERATURA CITADA .....	52
CAPÍTULO II. TEMPERATURA DE INCUBACIÓN PARA EL CRECIMIENTO DE CALLOS FRIABLES DE <i>Stevia rebaudiana</i> BERTONI .....	54
2.1 RESUMEN.....	54

2.2 INTRODUCCIÓN .....	55
2.3 MATERIALES Y METODOS .....	56
2.3.1 Material vegetal y medio de cultivo.....	56
2.3.2 Cinética de crecimiento celular .....	56
2.3.3 Variables de respuesta.....	57
2.3.4 Análisis de las variables de respuesta .....	58
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	58
2.4.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento de los callos cultivados en medio semisólido. ....	58
2.4.2 Peso seco de células en suspensión y producción de estevósido .....	60
2.5 CONCLUSIONES.....	63
2.6 LITERATURA CITADA .....	64
CHAPTER III. ELICITORS ON STEVIOSIDES PRODUCTION IN <i>Stevia rebaudiana</i>	
Bertoni CALLI.....	67
3.1 ABSTRACT .....	67
3.2 INTRODUCTION .....	68
3.3 MATERIALS AND METHODS.....	69
3.3.1 Plant material.....	69
3.3.2 Callus-inducing medium.....	70
3.3.3 Callus induction and multiplication.....	70
3.3.4 Effect of activators on stevioside production in the calli .....	70
3.3.5 Evaluation of the effects of light.....	71
3.3.6 Evaluation of the effects of temperature .....	71
3.3.7 Evaluation of the effects of salicylic acid (SA).....	71
3.3.8 Evaluation of the effects of salicylic acid and growth temperature .....	72
3.3.9 Evaluation of the effect of methyl jasmonate (MeJA) .....	72
3.3.10 Evaluation of the effect of antioxidants and growth regulators .....	72
3.3.11 Extraction and analysis of steviosides .....	72
3.3.12 Experimental design and statistical analysis .....	73

3.4 RESULTS AND DISCUSSION .....	74
3.4.1 Effects of the light.....	74
3.4.2 Effects of temperature.....	76
3.4.3 Effects of salicylic acid .....	77
3.4.4 Effects of methyl jasmonate.....	78
3.4.5 Effect of antioxidants and growth regulators .....	79
3.4.6 Effects of salicylic acid at 28 °C.....	81
3.4.7 Best treatment for increasing the production of steviosides <i>in vitro</i> .....	82
3.5 CONCLUSIONS .....	88
3.6 REFERENCES .....	89
CAPÍTULO IV. ÁCIDO SALICÍLICO EN LA PRODUCCIÓN DE ESTEVIÓSIDOS EN PLANTAS DE <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni CRECIDAS EN INVERNADERO.....	96
4.1 RESUMEN.....	96
4.2 INTRODUCCIÓN .....	97
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	98
4.3.1 Extracción y cuantificación de esteviósidos.....	98
4.3.2 Diseño experimental.....	99
4.4 RESULTADOS .....	99
4.5 CONCLUSIÓN .....	101
4.6 LITERATURA CITADA .....	102
CONCLUSIONES GENERALES .....	104

## LISTA DE CUADROS

<b>CAPÍTULO I</b>	<b>Pag.</b>
Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo para la inducción de callo en explantes de hoja y segmentos nodales de <i>S. rebaudiana</i> Bertoni.....	43
Cuadro 2. Efecto del medio de cultivo en la inducción de callo en explantes de hoja de <i>S. rebaudiana</i> después de cuatro semanas de cultivo.....	49
Cuadro 1. Efecto del medio de cultivo en la inducción de callo en segmentos nodales de <i>S. rebaudiana</i> después de cuatro semanas de cultivo.....	50
<b>CHAPTER III</b>	
Table 1. Steviosides concentration in suspended calli of <i>Stevia rebaudiana</i> exposed to activator agents (light and temperature).....	84
Table 2. Steviosides concentration in suspended calli of <i>Stevia rebaudiana</i> B. exposed to salicylic acid and methyl jasmonate.....	85
Table 3. Steviosides concentration in suspended calli of <i>Stevia rebaudiana</i> B. exposed to different activator agents.....	86

Table 4. Comparison the means of the best treatments for each activator to induction of steviosides from suspension calli cultures of *Stevia rebaudiana*..... 87

**CAPÍTULO IV.**

Cuadro 1. Contenido de esteviósidos en plantas de *S. rebaudiana* crecidas en invernadero, tratadas con ácido salicílico..... 100

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
Figura 1. Sitios de biosíntesis para glucósidos de esteviol en la hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	8
<b>CAPÍTULO I</b>	
Figura 1. Explantes de hoja de <i>S. rebaudiana</i> con callo y distinto grado de oxidación.....	45
Figura 1. Callos friables (a y b) formados en explantes de hoja y callos compactos (c y d) en segmentos nodales de <i>S. rebaudiana</i> .....	45
<b>CAPÍTULO II</b>	
Figura 1. Cinética de crecimiento de callos friables de <i>S. rebaudiana</i> cultivados en medio semisólido.....	59
Figura 2. Crecimiento de células de <i>S. rebaudiana</i> cultivadas en medio líquido a 25 °C y 16 h de luz.....	61
Figura 2. Concentración de esteviósido en el medio de cultivo de células en suspensión de <i>S. rebaudiana</i> cultivadas a 25 °C y 16 h de luz.....	62

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El consumo de alimentos y bebidas que contienen edulcorantes no calóricos ha aumentado dramáticamente en las últimas décadas. Se estima que 15 % de la población en EE.UU. y cerca de 99 % de los escolares chilenos los consume (Durán *et al.*, 2011). En México 33 % de los yogurts o bebidas energéticas y 42 % del agua natural y saborizada contienen edulcorantes no calóricos como sacarina, aspartame, sucralosa, ciclamato u otros (González, 2013).

Otros edulcorantes naturales que se han incorporado son los esteviósidos; estos son glucósidos producidos por *Stevia rebaudiana*. El sabor de estos compuestos es parecido al de la sacarosa, pero a diferencia de otros edulcorantes artificiales no deja sabor metálico residual y no son cancerígenos (Bautista *et al.*, 2005; Durán *et al.*, 2012). Los esteviósidos son benéficos para la salud humana, porque no elevan los niveles de glucosa en la sangre, son considerados como antiácidos, cardiotónicos y no producen caries al no ser sustrato para fermentación por las bacterias en la cavidad oral (Jarma *et al.*, 2010).

La demanda de los esteviósidos ha aumentado por sus propiedades. Japón es uno de los principales consumidores de esteviósidos, se estima que su consumo pasó de 400 ton de hojas secas por año, en la década de 1980, a casi 2000 ton a finales de los años noventa (Marín, 2004). Aunque la superficie sembrada con estevia también ha aumentado en los últimos años, se prevé que será insuficiente para cubrir la

demanda mundial, si se considera que se producen de 1500 y 2000 kg de hojas secas por ha (Díaz *et al.*, 2015).

Una herramienta biotecnológica que podría contribuir a cubrir la demanda creciente de esteviósidos, sin requerir grandes extensiones de tierra, mano de obra e insumos que involucra la producción de plantas de manera convencional, es el cultivo de células en suspensión. Esta técnica, además de reducir la variabilidad intrínseca en el contenido de esteviósidos de las plantas de estevia y la ocasionada por los ambientes en los que se cultiva la planta (Jarma *et al.*, 2011), permitiría incrementar la producción de estos metabolitos con el uso de activadores.

Los activadores son compuestos que al aplicarse de manera externa a los cultivos celulares pueden estimular el metabolismo secundario de las plantas. La exposición de cultivos celulares de especies como *Taxus chinensis*, *Cistanche deserticola*, *Taxus yunnanensis*, *Physalis peruviana*, *Brugmansia candida* a activadores, ha incrementado significativamente la producción de diversos metabolitos secundarios importantes para la industria farmacéutica como taxuyuanina C, feniletanoides y paclitaxel, escopolamina, (Wu *et al.*, 2001; Dong y Zhong, 2002; Lu y Mei, 2003; Piñeros *et al.*, 2009; Niño *et al.*, 2009).

Aunque, existen protocolos para el cultivo *in vitro* de células de estevia (Striedner *et al.*, 1991; Bondarev *et al.*, 1998; Bondarev *et al.*, 2001; Janarthanam *et al.*, 2010; Mathur y Shekhawat, 2013), los estudios enfocados a probar el efecto de activadores

en la síntesis de esteviósidos en esos cultivos celulares son escasos y sólo han incluido compuestos como NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, prolina, polietilenglicol y algunos microorganismos (Striedner *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015). Por todo lo anterior, esta investigación tuvo los siguientes objetivos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar el efecto de diferentes activadores en la producción de esteviósidos a partir de células en suspensión de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

### **Objetivos Particulares**

1. Inducir callo friable a partir de explantes de hoja y segmentos nodales y diversos reguladores de crecimiento.
2. Establecer cultivos en suspensión con los callos generados.
3. Determinar la concentración de esteviósidos producidos por células en suspensión cultivadas en presencia de activadores, como ácido salicílico, metil jasmonato, espectro de luz, temperatura, antioxidantes y reguladores de crecimiento.

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis General**

Los activadores aplicados a los cultivos celulares en suspensión de *S. rebaudiana* incrementan la producción de esteviósidos.

### **Hipótesis Particulares**

1. La combinación de citocininas con auxinas en proporciones iguales inducen la formación de callo friable en explantes de hoja y segmentos nodales.
2. Los callos obtenidos de explantes de hoja permiten establecer cultivos de células en suspensión.
3. Al menos uno de los activadores incrementa la producción de esteviósidos en los cultivos celulares de *S. rebaudiana*.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Descripción botánica de *Stevia rebaudiana* Bertoni

*Stevia rebaudiana* pertenece a la familia de las Asteráceas, es nativa de Brasil y Paraguay, sus tallos se arraigan con facilidad y generan plantas nuevas, es herbácea, perenne y sus hojas lanceoladas tienen aproximadamente 5 cm de longitud y 2 cm de anchura; las hojas son alternas y enfrentadas de dos en dos. En ambiente silvestre la altura de las plantas varía entre 40 y 80 cm, y cultivadas pueden tener 1 m. Para la producción comercial la planta puede utilizarse por cinco años con varias cosechas anuales de sus hojas y tallos; las raíces permanecen en el suelo y permiten el rebrote de la planta (Jarma *et al.*, 2005). Comercialmente se propaga asexualmente porque la geminación de sus semillas es baja (Goettemoeller, 1999; Janarthanam, 2010).

### Importancia de *S. rebaudiana*

Esta planta es valorada entre las plantas nativas de Brasil y Paraguay por su contenido de compuestos conocidos como esteviósidos; estos, cuando están puros y en estado cristalino tienen poder edulcorante 300 veces mayor que la sacarosa de caña (Jarma *et al.*, 2010) y aporte energético bajo ( $2.7 \text{ kcal g}^{-1}$ ) (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). De las 110 especies de estevia estudiadas sólo 18 tienen sabor dulce y de ellas *S. rebaudiana* Bertoni es la más dulce (Durán *et al.*, 2012).

La estevia se ha utilizado desde hace años como endulzante y producto terapéutico; como en el tratamiento contra la diabetes tipo 2 (Lee *et al.*, 2001; Gil *et al.* 2008; Durán *et al.*, 2012). Además la estevia estimula el estado de alerta, facilita la digestión, las funciones gastrointestinales y mantiene la sensación de vitalidad y bienestar, disminuye el deseo de consumir dulces y alimentos grasos, reduce el deseo del tabaco y de bebidas alcohólicas (Durán *et al.*, 2012). Se le atribuyen también propiedades anticonceptivas (Melis, 1999) y se ha usado en el tratamiento de alteraciones de la piel y prevención de caries, ya que las bacterias de la boca no la fermentan (Brandle *et al.*, 2002).

Aunque, la planta produce más de 10 diferentes esteviósidos, los que están en proporción mayor son esteviósido (5 a 10 %) que es de 110 a 270 veces más dulce que la sacarosa, rebaudiósido A (2 a 4 %) 180 a 400 veces más dulce que la sacarosa, esteviol, rebaudiósido C (1 a 2 %) y dulcósido A (0.5 a 1%) (Jarma *et al.*, 2005; Erkukuc *et al.*, 2009; Lemus-Mondaca *et al.*, 2012; Ceunen y Geuns, 2013).

Los esteviósidos se sintetizan a partir de unidades de acetato del acetil-coenzima-A derivado del mevalonato en la misma ruta del ácido giberélico (Kasahara *et al.*, 2002; Hsieh y Goodman, 2005). El ácido mevalónico al ingresar al cloroplasto se transforma en pirofosfato de isopentenil, luego en pirofosfato de geranilgeraniol, pirofosfato de copalillo y kaureno; este es substrato para síntesis de giberelinas y glucósidos de esteviol. En estevia, el kaureno se transforma en esteviol, que es base de los glucósidos de diterpeno, en el retículo endoplasmático (Totté *et al.*, 2000, 2003;

Brandle *et al.*, 2002; Geuns, 2003; Brandler y Telmer, 2007); este esteviol puede ser glucosilado o ramnosilado en el citosol y formar los cuatro principales edulcorantes antes mencionados, que se envían a las vacuolas (Totté *et al.*, 2000 y 2003; Yadav y Guleria, 2012) (Figura 1).

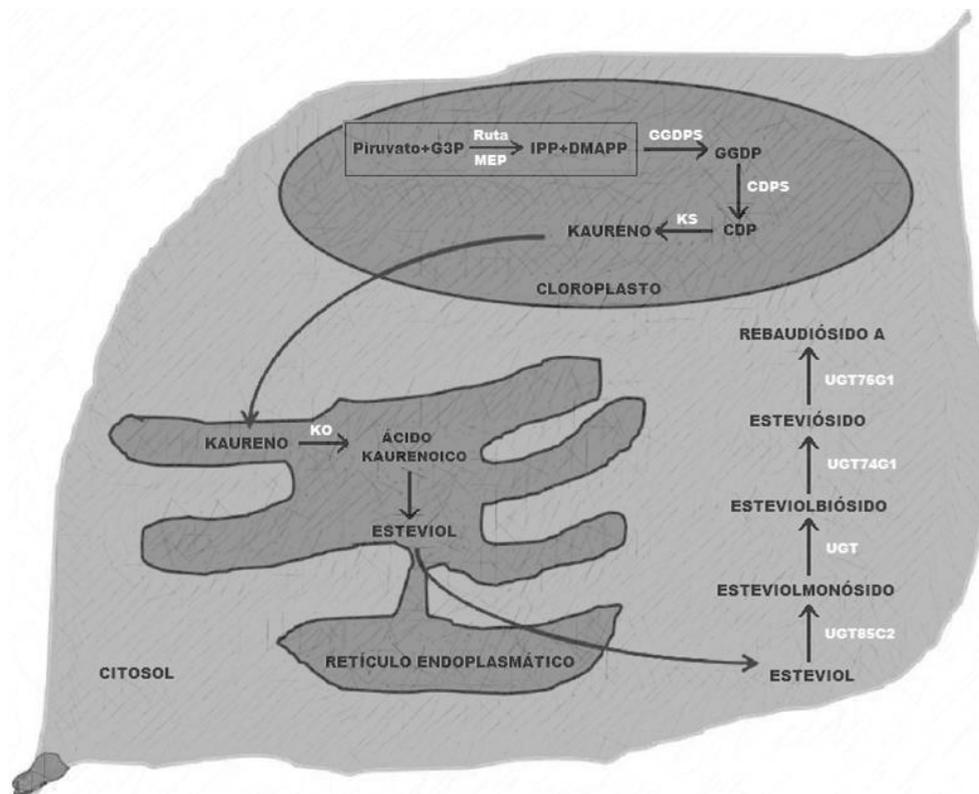


Figura 1. Sitios de biosíntesis para glucósidos de esteviol en la hoja de *Stevia rebaudiana*. Tomado y modificado de Yadav y Guleria, 2012.

El papel de los esteviósidos en la planta se desconoce (Jarma *et al.*, 2005), algunos investigadores afirman que estos metabolitos secundarios permiten rechazar ciertos insectos y otros especulan que son parte de un mecanismo para regular los niveles de ácido giberélico (Brandle *et al.*, 2002). Las plantas reaccionan a presencia de

patógenos, insectos, herbívoros y otros factores inductores de estrés, biótico y abiótico, mediante la activación de un conjunto de mecanismos de protección que incluyen la producción de metabolitos secundarios; por lo que los esteviósidos podrían tener funciones similares en *S. rebaudiana* (Sabater, 2013).

Se sabe que la época y densidad de siembra, radiación solar, precipitación pluvial y temperatura pueden provocar diferencias en el contenido de esteviósidos entre las plantas y clones (Jarma *et al.*, 2005, 2011).

## **Otros sustitutos del azúcar**

### **Aspartame**

Aspartame es un dipéptido que consiste de los aminoácidos: ácido aspártico y fenilalanina (N-L- $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanina-1-metil éster), se usa como edulcorante nutritivo, con poder de dulzor de 180 a 220 veces mayor que la sacarosa y se metaboliza de manera similar a los péptidos. Las temperaturas altas alteran la molécula de aspartame; actualmente existe aspartame encapsulado que se protege de la degradación. El compuesto se metaboliza en el tracto gastrointestinal y produce ácido aspártico, fenilalanina y metanol (Bautista *et al.*, 2005). Por su contenido de fenilalanina puede afectar a las personas con fenilcetonuria (incapacidad de degradar parte de la proteína fenilalanina, puede provocar daño cerebral). El aspartame es un factor desencadenante de cefaleas y es por ello que se recomienda no consumir alimentos que lo contengan (Sánchez, 2006). Además,

parece que empeora los síntomas de diabetes y se transforma en fenilalanina, ácido aspártico y alcohol metílico que son tóxicos neurológicos para humanos y animales. El aspartame es el edulcorante más utilizado en los productos llamados "light" o dietéticos (Zaninovic, 2002).

### **Fructosa cristalina**

La fructosa cristalina es edulcorante natural que se usó inicialmente en la década de 1970 como sustituto del azúcar "de mesa"; la fuente principal de este azúcar es el jarabe de maíz rico en fructosa. Inicialmente, los efectos de este azúcar en la glicemia (cantidad de glucosa en la sangre), insulinemia (presencia de insulina en la sangre), producción de ácidos grasos o triglicéridos se desconocía; ahora se reconoce que su ingesta puede provocar desórdenes en el metabolismo de lípidos y síntomas gastrointestinales (Esquivel y Gómez, 2007). Además, el consumo excesivo de fructosa causa dislipidemia (alteración del metabolismo de los lípidos que ocasiona que incrementa los niveles de colesterol, triglicéridos o ambos tipos de compuestos en la sangre), aumenta la adiposidad visceral y disminuye la sensibilidad a la insulina (Duran *et al.*, 2012).

Aunque la fructosa cristalina es un azúcar que aporta 3.7 kcal g<sup>-1</sup>, dependiendo de su estado anomérico, pH y temperatura de la solución puede ser entre 1.2 y 1.8 veces más dulce que la sacarosa, su metabolismo es menor al de otros azúcares. Se

usa de forma agregada en alimentos etiquetados como "diet" o light, bebidas, néctares y como sustituto de sacarosa (Riveros *et al.*, 2014).

### **Sorbitol, manitol y xilitol**

Sorbitol, manitol y xilitol son azúcares que tienen efecto menor en el nivel de azúcar en la sangre (en el tiempo) comparados con la sacarosa, a menudo se les combina con lípidos; por esto, los alimentos endulzados con estos compuestos pueden tener valor calórico semejante al del que se desea reemplazar. Estos compuestos pueden producir molestias gástricas y su ingesta en cantidades altas puede causar diarrea. Generalmente, esos productos se usan en dulces, gomas de mascar y panificación. El sorbitol en dosis de 25 a 80 g al día tiene efecto laxativo (Bautista *et al.*, 2005).

### **Cultivo de tejidos: formación de callo y cultivos en suspensión**

El cultivo de tejidos es una técnica que consiste en cultivar en condiciones asépticas tejidos, órganos o células vegetales (explantes) en un medio nutritivo de composición definida, bajo condiciones físicas (luz, temperatura, humedad) y químicas (micro y macronutrientes, fuente de carbono y reguladores de crecimiento) controladas. La técnica de cultivo de tejidos puede aplicarse para investigar procesos bioquímicos y morfológicos de la desdiferenciación y diferenciación celular, propagación clonal, mejoramiento genético, conservación de germoplasma y producción de metabolitos secundarios. El cultivo *in vitro* de un explante vegetal puede generar proliferación celular y formar una masa de células desorganizadas

que recibe el nombre de callo. El callo puede mantenerse en un medio de cultivo líquido, con agitación, para separar sus células y obtener un cultivo de células en suspensión (Roca y Ramírez, 2000).

Los cultivos celulares en suspensión pueden crecer en biorreactores, que son recipientes con volumen variable, diseñados para propiciar el crecimiento y la multiplicación de distintos tipos de células (Segretín, 2013).

El cultivo en suspensión es uno de los sistemas *in vitro* que se usa en investigación por permitir la distribución homogénea de las células en el medio de cultivo, facilitar la transferencia de nutrientes y oxigenación. La ventaja de este tipo de cultivo es que permite el control de variables como temperatura, pH y oxígeno disuelto (Arias *et al.*, 2009a).

Una suspensión de células normalmente consta aproximadamente de tres fracciones: células individuales libres y diversas formas, agregados celulares que contienen diez células o más y grupos celulares con morfología filiforme (Neumann *et al.*, 2009).

### **Reguladores de crecimiento**

Los reguladores de crecimiento vegetal se definen como compuestos que en concentración baja tienen actividad biológica y regulan el desarrollo. Estas moléculas parecen ser señalizadores celulares de carácter vital, pues actúan como interruptores que regulan procesos específicos del desarrollo. Entre los grupos de

reguladores de crecimiento están auxinas, citocininas, giberelinas, jasmonatos, brasinoesteroides, etileno y ácido abscísico. El tipo de reguladores de crecimiento en las plantas depende de la especie, pero en todas estas existen auxinas y citocininas de forma imprescindible (Taiz y Zeiger, 2006).

En el cultivo de tejidos los reguladores de crecimiento se proporcionan al medio de cultivo de forma externa. La naturaleza y cantidad de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo dependerá de la especie vegetal, variedad de la planta, naturaleza del tejido, etapa de cultivo y tipo de respuesta que se desee inducir en las células, como la formación de callo, embriogénesis somática, diferenciación o multiplicación de brotes o enraizamiento (Roca y Ramírez, 2000; Bhojwani y Dantu, 2013; Hernández-Meneses *et al.*, 2013).

## **Auxinas**

Las auxinas fueron las primeras hormonas vegetales descubiertas; controlan el alargamiento del tallo, la dominancia apical, iniciación radical, desarrollo del fruto y crecimiento orientado. La principal auxina de las plantas es el ácido indol-3-acético (AIA) y su biosíntesis está asociada a los tejidos de crecimiento y división celular acelerados, como meristemos apicales de tallos, hojas jóvenes, frutos en desarrollo y semillas. Las plantas transforman AIA por vías diferentes, como la ruta del ácido indol-3-pirúvico, de la triptamina o del indol-3-acetonitrilo que son dependientes del triptófano; pero también por rutas independientes del triptófano. Los orgánulos de

acumulación del AIA son el citosol y los cloroplastos (Mano y Nemoto, 2012). En cultivo de tejidos las auxinas se han usado para inducir la división celular, la diferenciación de órganos y embriones, iniciación de la raíz e inducción y crecimiento de callos. Las auxinas comúnmente usadas en el cultivo de tejidos son ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB) (auxinas naturales), ácido naftalenacético (ANAA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) (auxinas sintéticas) (Bhojwani y Dantu, 2013).

### **Citocininas**

Las citocininas suelen ser formas modificadas de adenina que se sintetizan en la raíz, en embriones en desarrollo, hojas jóvenes, frutos, tumores y heridas. Las citocininas estimulan la división celular, retardan la senescencia en las hojas o pueden contrarrestar la dominancia apical en las plantas (Taiz y Zeiger, 2006). Las citocininas en cultivos *in vitro* estimulan la división celular y la diferenciación de brotes adventicios y raíces (morfogénesis) (Davies, 1995), y promueven el desarrollo de yemas axilares. Las citocininas comúnmente usadas en los cultivos *in vitro* son cinetina (6-furfurilamino-purina), bencilaminopurina (BAP), 6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino) purina (zeatina) y 1-fenil-3-(1, 2, 3-tiadiazol-5-il) urea (tidiazurón) (Arias *et al.*, 2009b; Bhojwani y Dantu, 2013).

## **Giberelinas**

Las giberelinas regulan procesos fisiológicos como la germinación, crecimiento del tallo, la floración y formación del fruto. La biosíntesis de las giberelinas depende estrictamente de la genética y ambiente de crecimiento de la planta. Son compuestos de la familia de los diterpenos y se sintetizan a partir del gliceraldehído-3-fosfato y piruvato, en los plastidios, o del ácido mevalónico en el citosol (Davies, 1995). El nivel endógeno de giberelinas regula su propia síntesis al iniciarla o inhibirla, con la intervención de factores ambientales, como fotoperiodo, temperatura o luz (Taiz y Zeiger, 2006). Las giberelinas se utilizan en el cultivo de tejidos vegetales para estimular el alargamiento de entrenudos, el crecimiento de meristemas y el desarrollo normal de plántulas a partir de embriones somáticos (Bhojwani y Dantu, 2013).

## **Etileno**

Etileno es una hormona gaseosa importante que participa en los mecanismos que controlan el crecimiento y desarrollo, la mayoría de los órganos de las plantas superiores lo sintetizan. Los tejidos senescentes y frutos en maduración producen más etileno que los jóvenes o maduros (Taiz y Zeiger, 2006). Varios procesos del desarrollo y estrés por factores ambientales inducen su biosíntesis a partir del aminoácido metionina y del S-adenosil-metionina (SAM) para obtener ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) que es el precursor del etileno (Reid, 2007).

El etileno en el cultivo de tejidos se produce por la exposición de los constituyentes orgánicos del medio al calor, la oxidación, la luz solar o la radiación ionizante. El etileno parece influir en procesos morfogénicos, como embriogénesis y organogénesis, y sus efectos se conocen parcialmente. El etileno puede promover o inhibir el mismo proceso en especies diferentes; por ejemplo, en maíz promueve la embriogénesis somática, pero la inhibe en árboles de caucho (Bhojwani y Dantu, 2013).

### **Ácido abscísico (ABA)**

El ácido abscísico está desde la cofia radical hasta la yema apical en todas las plantas vasculares, lo sintetizan casi todas las células que contienen cloroplastos o amiloplastos, a partir de la ruta de los terpenoides. Esta hormona regula la latencia de semillas y yemas, participa en la respuesta al estrés hídrico y es antagonista de auxinas, citocininas, etileno, giberelinas y brasinoesteroides (Taiz y Zeiger, 2006). En el cultivo de tejidos se utiliza para el crecimiento normal, el desarrollo y la maduración de los embriones somáticos (Bhojwani y Dantu, 2013).

### **Brasinoesteroides**

Estos compuestos estimulan la germinación de las semillas por su influencia en el metabolismo de las proteínas y el contenido de aminoácidos, lo cual está acompañado del incremento en el contenido de ácido indolacético y disminución del contenido de ácido abscísico; también, estimulan la división y el alargamiento

celular, además tienen efectos específicos sobre la diferenciación. Esto incluye modificaciones en las propiedades de la pared celular, efectos sobre la asimilación de carbohidratos y el control de la actividad de acuaporinas (Núñez *et al.*, 2014). En cultivo de tejidos, los brasinoesteroides pueden incrementar el tamaño de los brotes, cambiar los patrones de brotación (dominancia apical), inducir callo y embriones somáticos (Gomes, 2011).

### **Metabolitos secundarios**

El metabolismo de un organismo está constituido por un conjunto de reacciones bioquímicas que utilizan como sustratos carbono y nitrógeno, junto con energía para generar moléculas como aminoácidos, lípidos, nucleótidos y azúcares, a los que se les conoce como metabolitos primarios necesarios para el funcionamiento de las células de dicho organismo. Las plantas destinan parte del carbono asimilado y energía para la síntesis de diferentes moléculas orgánicas, conocidas como metabolitos secundarios, que no tienen una función directa en procesos fisiológicos vitales como la fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes o síntesis de proteínas, carbohidratos y lípidos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Los metabolitos secundarios tienen implicación ecológica en la protección contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, o pueden funcionar como sustancias alelopáticas, fitoalexinas, disuasorios nutritivos atrayentes de polinizadores y dispersores de las semillas (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). Los metabolitos secundarios están frecuentemente relacionados con la adaptación de la planta a su entorno, principalmente en

presencia de algún tipo de estrés provocado por factores bióticos o abióticos (Nascimento y Fett-Neto, 2010). Los metabolitos secundarios incluyen compuestos como los alcaloides, terpenoides, esteroides, antocianinas, antraquinonas y fenoles simples o polifenoles. El uso de estos compuestos puede clasificarse en cinco grupos: fármacos, aromas, perfumes, pigmentos y plaguicidas (Roca y Ramírez, 2000).

Los metabolitos secundarios se producen en gran escala a partir de células vegetales, en fermentadores. En estos las células en suspensión crecen hasta la fase estacionaria en la que el metabolito se extrae. En otro sistema las células se embeben o atrapan en una matriz polimérica inerte, como gel o espuma, el producto se libera naturalmente o por inducción se permeabiliza reversiblemente a las células (Roca y Ramírez, 2000).

Para obtener metabolitos secundarios en nivel industrial se han desarrollado procesos mediante el cultivo de células en suspensión (75 000 L). Un caso es el paclitaxel (droga anticancerígena), que se obtiene de cultivos celulares del género *Taxus*. Otro ejemplo es la producción de shikonina y berberina a partir de células en suspensión de *Lithospermum erythrorhizon* y *Coptis japonica*, respectivamente. Los extractos de *Panax ginseng* es otro caso en el que se ha logrado obtener metabolitos secundarios en gran escala en reactores de hasta 25,000 litros (Arias *et al.*, 2009a).

## **Activación de la síntesis de metabolitos secundarios**

La concentración de los metabolitos secundarios en las plantas generalmente es baja, respecto a los metabolitos primarios, y, frecuentemente la síntesis ocurre cuando las plantas se encuentran en ciertas condiciones, generalmente relacionadas con su ambiente. Por esto, el uso de compuestos activadores, que estimulen la biosíntesis del o los metabolitos secundarios, es frecuente (Gupta *et al.*, 2015). Los activadores se clasifican en bióticos (quitosano, metil jasmonato, ácido salicílico, alginato, extractos fúngicos, bacterias) y abióticos (metales pesados, luz UV, pH, estrés térmico, estrés osmótico). Estos actúan como señales endógenas en los mecanismos de protección de las plantas desencadenando respuestas a dicha protección (Pitta *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2009b).

### **Ácido salicílico (AS)**

Ácido salicílico es una fitohormona involucrada en procesos fisiológicos como crecimiento, termogénesis, resistencia a patógenos y enfermedades, floración, germinación de semillas, respiración, cierre de estomas o senescencia (Guzmán-Antonio *et al.*, 2012). El AS estimula la protección de las plantas por su particularidad de moverse sistémicamente, provocando resistencia contra patógenos e insectos (Rangel *et al.*, 2010), e induce la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). El AS dentro de la planta forma parte de una red de transducción de señales compleja, y su modo de acción puede variar en los

diferentes sistemas utilizados. La formación de radicales libres por medio de la inhibición de enzimas como peroxidasas y catalasas es su mecanismo de acción, ya que inician la peroxidación de lípidos y los productos resultantes de este proceso activan los mecanismos de protección como la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Horváth *et al.*, 2007; Rangel *et al.*, 2010).

El AS se ha utilizado como activador para incrementar la producción de diferentes metabolitos secundarios, como en callos de *Calendula officinalis* logrando incrementar la producción de aceites esenciales al suministrarles 1.5 mM de AS (Al-oubaidi y Ameen, 2014), la aplicación de 0.1 mM de AS en cultivos celulares de *Hibiscus sabdariffa* L. aumentó la síntesis de compuestos fenólicos en 50 % (De Dios-López *et al.* 2011), y en suspensiones celulares de *Polygonum multiflorum* Thunb expuestas a 0.125 mM de AS se promovió la producción de 2,3,5,4'-tetrahidroxistilbeno-2-O- $\beta$ -D-glicósido (Li *et al.*, 2012).

### **Metil jasmonato (MeJA)**

El ácido jasmónico (AJ), moléculas relacionadas y sus derivados, todos llamados jasmonatos (JAs), son fitohormonas de origen lipídico formados principalmente en las hojas de las plantas a partir de ácidos grasos no saturados, linoleico y linolénico, que se liberan de los fosfolípidos de las membranas celulares por la acción de lipasas. Estos se encuentran en diferentes especies vegetales y están relacionados con

diversas funciones de resistencia y senescencia (Camarena, 2002). Se produce en la planta después del daño ocasionado por un patógeno, microorganismo o insecto.

El AJ y JAs son considerados componentes de la vía de transducción de señales con el mecanismo de protección de las plantas, inducen la expresión de genes que codifican proteínas específicas como inhibidores de proteasas, proteínas relacionadas con la patogénesis e inducen la biosíntesis de enzimas como la fenilalanina-amonio liasa (PAL). El AJ interacciona con moléculas señalizadoras que inducen la ruta de señalización hormonal cuando la planta es herida por algún patógeno, ya que se induce la producción de etileno, generando elementos de la pared celular destruida, lo que promueven diversas reacciones como hipersensibilidad conectada con la explosión oxidativa, la muerte programada de las células alrededor del lugar infectado, así como la formación de oxígeno que ayuda a la oxidación del ácido linolénico, para generar más AJ (Laredo *et al.*, 2017).

Se ha probado que el MeJA mejora el crecimiento celular y la producción de antocianinas en cultivos de células de *Melastoma malabathricum* (Koay *et al.*, 2011), en cultivos celulares de *Taxus baccata* se incrementó la producción de taxanos de entre 120 y 130 veces al cultivarlos con 0.1 mM de MeJA (Yukimune *et al.*, 1996).

### **Espectro de luz**

Las respuestas de las plantas a la luz impactan en casi todos los aspectos de crecimiento, al comportarse como dispositivos de recolección de luz para satisfacer

sus necesidades energéticas, desde la germinación hasta la maduración de la semilla (López-Juez y Devlin, 2008); estas poseen tres clases principales de fotorreceptores, que actúan como interruptor para controlar la expresión de genes específicos implicados en el crecimiento, en procesos de desarrollo y el metabolismo secundario en las plantas (Jenkins *et al.*, 1995), dichos fotorreceptores son fitocromos, criptocromos y fototropinas (Jiao *et al.*, 2007). Los fitocromos actúan "fotocromáticamente" en la región roja del espectro de luz solar, siendo activados reversiblemente por las longitudes de onda rojas e inactivados por el rojo lejano; los criptocromos son fotorreceptores de luz azul (Kim *et al.*, 2007), al igual que las fototropinas (Lin, 2002), asociadas con la membrana plasmática, controlan principalmente respuestas a corto plazo a la luz, como tropismos, apertura de estomas y reubicación de cloroplastos (Ohgishi *et al.*, 2004). Los criptocromos actúan en conjunto con los fitocromos para regular las respuestas fotomorfogénicas, como el alargamiento celular y la floración fotoperiódica; las fototropinas median las respuestas del movimiento, como la curvatura fototrópica (Lin, 2002).

Durante la transición inicial de la oscuridad a la luz, se produce una modificación dramática del programa de crecimiento de la planta y esto se acompaña de una reprogramación transcripcional masiva (Jiao *et al.*, 2007). La mayoría de dichos cambios en la expresión génica están controlados por los fitocromos y los criptocromos (Ma *et al.*, 2001). Al menos en las primeras horas después de la exposición a la luz, los criptocromos median la mayoría de los cambios en la

expresión génica iniciados por la luz azul (Ohgishi *et al.*, 2004), mientras que las fototropinas median sus acciones a través de respuestas basadas en citoesqueleto o membrana. La transducción de señales de fitocromo y criptocromo, que a menudo interactúan, se produce a través de múltiples vías, muchas de ellas localizadas en el núcleo (López-Juez y Devlin, 2008).

La luz promueve la biosíntesis de metabolitos, como antocianinas en células y tejidos de *Ipomoea batatas* (Nozue y Yasuda, 1985), *Daucus carota* (Takeda, 1990), *Perilla frutescens* (Zhong *et al.*, 1993) y *Pueraria lobata* (Liu y Li, 2002) cultivados *in vitro*.

## **Temperatura**

La temperatura del ambiente, puede generar estrés en las plantas cuando esté por encima o por debajo de su temperatura óptima de desarrollo, trayendo como consecuencia que las plantas acumulen metabolitos secundarios en sus tejidos como un mecanismo de adaptación y protección.

Reyes y Martínez (2001) mencionan que las diferencias en cuanto al tipo de respuesta de las plantas, demuestran la plasticidad genotípica de los individuos en ambientes heterogéneos, ajustando su morfología y su fisiología y que las bases genéticas de esta plasticidad, pueden ser complejas al interactuar diferentes tipos de genes.

La temperatura influye en diferentes etapas y procesos de desarrollo de una planta, como la germinación de la semilla, el crecimiento de nuevos brotes, la fotosíntesis, la respiración y la síntesis de diversas moléculas.

## LITERATURA CITADA

- Al-oubaidi H. K. M. and Ameen A. S. M. 2014. Increasing secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. using salicylic acid *in vitro*. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 3(5): 1146-1155.
- Arias M. A., Aguirre M., Angarita C., Montoya V. C. y Restrepo J. 2009a. Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. Dyna. 76 (157): 109-121.
- Arias Z. M., Angarita V. M. J., Aguirre C. A. M., Restrepo F. J. M. y Montoya V. C. 2009b. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín. 62(1): 4881-4895.
- Ávalos G. A. y Pérez-Urria C. E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145.
- Bautista J. M., Barboza C. Z., Gamiño S. y Alanís M. G. 2005. Alimentos Bajos en Energía: ¿Qué es lo que debemos saber de ellos? Acta Universitaria. 15: 25-33.
- Bhojwani S. S. and Dantu P. K. 2013. Plant tissue culture: an introductory text. Springer India.

- Bondarev N. I., Nosov A. M., and Kornienko A. V. 1998. Effects of exogenous growth regulators on callusogenesis and growth of cultured cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Russian Journal of Plant Physiology*. 45: 770-774.
- Bondarev N., Reshentnyak O. and Nosov A. 2001. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Science*. 161: 155-163.
- Brandle J. E., Richman A., Swanson A. K. and Chapman B. P. 2002. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. *Plant Molecular Biology*. 50: 613-22.
- Brandle J.E. and Telmer P.G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*. 68: 1855–1863.
- Camarena G., G. 2002. Octadecanoides como reguladores de la defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 8: 107-112.
- Ceunen S. and Geuns J. M. C. 2013. Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. *Journal of Natural Products*. 76: 1201-1228.
- Davies P. J. 1995. The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Davies P. J. (Ed.). Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pages. 1-12.

- De Dios–López A., Montalvo–González E., Andrade–González I. y Gómez–Leyva J. F. 2011. Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) *in vitro*. Revista Chapingo. Serie Horticultura. 17(2): 77-87.
- Díaz P. R. A., Ramírez L. M. y Dihigo C. M. 2015. La Stevia como sustituto del azúcar de caña. CD de monografías 2015. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Disponible en <http://monografias.umcc.cu/monos/2015/CUM%20Betancourt/mo1527.pdf>
- Dong H. D. and Zhong J. J. 2002. Enhanced taxane productivity in bioreactor cultivation of *Taxus chinensis* cells by combining elicitation sucrose feeding and ethylene incorporation. Enzyme and Microbial Technology. 31(1): 116-121.
- Durán S., Quijada M. P., Silva L., Almonacid N., Berlanga M. R. y Rodríguez M. P. 2011. Niveles de ingesta diaria de edulcorantes no nutritivos en escolares de la región de Valparaíso. Revista Chilena de Nutrición. 38: 444-449.
- Durán A. S., Rodríguez N. M. P., Córdón K. A. y Record J. C. 2012. Estevia (*Stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico. Revista Chilena de Nutrición. 39(4): 203-206.

- Erkucuk A., Akgun I.H. and Yesil-Celiktas O. 2009. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization. The Journal of Supercritical Fluids. 51: 29-35.
- Esquivel S. V. y Gómez S. G. 2007. Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. Acta Médica Costarricense. 49 (4):198-202.
- Geuns J. M. C. 2003. Molecules of interest stevioside. Phytochemistry. 64: 913–921.
- Gil J. C., Ligan P., Flores C. y Chimoy P. J. 2008. Efecto a largo plazo del consumo de *Stevia rebaudiana* (Magnoliopsida, Asteraceae) en la fertilidad de ratones. Revista Peruana de Biología. 15(1): 85-90.
- Goettemoeller J. 1999. Stevia Sweet Recipes: Sugar-Free-Naturally!. United Graphics Inc. Mattoon Illinois, United State of America. pp. 196.
- Gomes M. M. A. 2011. Physiological effects related to brassinosteroid application in plants. Chapter 7 in: Brassinosteroids: a class of plant hormone by Hayat S. and Ahmad A. (eds.), Springer Science+Business Media B.V. 193-242.
- González C. A. 2013. Posición de consenso sobre las bebidas con edulcorantes no calóricos y su relación con la salud. Revista Mexicana de Cardiología. 24(2): 55-68.

- Gupta P., Sharma S. and Saxena S. 2014. Effect of salts (NaCl and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) on callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* for steviol glycoside production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 172: 2894-2906.
- Gupta P., Sharma S. and Saxena S. 2015. Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline and polyethylene glycol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 176: 863-874.
- Guzmán-Antonio A., Borges-Gómez L., Pinzón-López L., Ruiz-Sánchez E. y Zúñiga-Aguilar J. 2012. Efecto del ácido salicílico y la nutrición mineral sobre la calidad de plántulas de chile habanero. *Agronomía Mesoamericana*. 23: 247-257.
- Hernández-Meneses E., López-Peralta M. C. G. y Estrada-Luna A. A. 2013. Callogenesis de *Heliconia collinsiana* GRIGGS *in vitro*: establecimiento, inducción y proliferación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4(8):1175-1186.
- Horváth E., Szalai G. and Janda T. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*. 26: 290-300.
- Hsieh M. and Goodman H. M. 2005. The Arabidopsis *IspH* homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiology*. 138: 641 – 653.

- Janarthanam B., Gopalakrishnan M. and Sekar T. 2010. Secondary metabolite production in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research. 45: 243-248.
- Jarma A., Rengifo T. y Araméndiz-Tatis H. 2005. Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano: I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa. Agronomía Colombiana. 23(2): 207-216.
- Jarma O. A. J., Combatt C. E. M. y Cleves L. J. A. 2010. Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Agronomía Colombiana. 38(2): 199-208.
- Jarma O. A., Araméndiz T. H. y Cleves L. A. 2011. Estabilidad fenotípica y densidades de planta de genotipos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) en la región Caribe de Colombia. Acta Agronómica. 60(2): 165-175.
- Jiao Y., Lau O. S. and Deng X. W. 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. Nature Reviews Genetics. 8: 217–230.
- Jenkins G. I., Christie J. M., Fuglevanc G., Long J. C. and Jackson J. A. 1995. Plant response to UV and blue light: biochemical and genetic approaches. Plant Science. 112: 117-138.

- Kasahara H., Hanada A., Kuzuyama T., Takagi M., Kamiya Y. and Yamaguchi S. 2002. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(47): 45188-45194.
- Koay S. S., Arvind B. and Chan L. K. 2011. Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of *Melastoma malabathricum* (Melastomaceae). *Revista de Biología Tropical*. 59: 597-606.
- Kim W. Y., Fujiwara S., Suh S. S., Kim J., Kim Y., Han L., David K., Putterill J., Nam H. G. and Somers D. E. 2007. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*. 449: 356–360.
- Laredo A. E. I., Martínez H. J. L., Iliná A., Guillen C. L. y Hernández C. F. D. 2017. Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8(3): 673-683.
- Lee C. N., Wong K. L., Liu J.C., Chen Y.J., Cheng J.T. and Chan P. 2001. Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce anti-hypertension. *Planta Medica*. 67: 796–799.
- Lemus-Mondaca R., Vega-Gálvez A., Zura-Bravo L. y Kong A. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A

comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects.  
Food Chemistry. 132: 1121-1132.

Li S., Shu-Jin Z., Tang-Bing C., Zhong-Yu L. and Wei Z. 2012. 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glycoside biosynthesis by suspension cells cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb and production enhancement by methyl jasmonate and salicylic acid. *Molecules*. 17(2): 2240-2247.

Lin C. 2002. Blue light receptors and signal transduction. *The Plant Cell*. 14: 207-225.

Liu H. L. and Li L. 2002. Cell cultures of *Pueraria lobata* (Willd.): growth and production of isoflavones and puerarin. *South African Journal of Botany*. 68: 542–544.

López-Juez E. and Devlin P. F. 2008. Light and the Control of Plant Growth. In: *Plant Growth Signaling, Plant Cell monographs*. Bögre L. and Beemster, G. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp: 223-242.

Lu C. T. and Mei X. G. 2003. Improvement of phenylethanoid glycosides production by a fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*. *Biotechnology Letters*. 25(17): 1437-1439.

- Ma L., Li J., Qu L., Hager J., Chen Z., Zhao H. and Deng X. W. 2001. Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell*. 13: 2589-2607.
- Mano Y. and Nemoto K. 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*. 63(8): 2853-2872.
- Marín W. 2004. Sondeo de mercado de la Estevia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia.
- Mathur S. and Shekhawat G. S. 2013. Establishment and characterization of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cell suspension culture: an *in vitro* approach for production of stevioside. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35: 931-939.
- Melis M. S. 1999. Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 67: 157-61.
- Nascimento N. C. and Fett-Neto A. G. 2010. Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview. Chapter 1, In: *Plant secondary metabolism engineering*. Fett-Neto A. G. (Ed.), Humana Press. New York, USA. Pags. 1-13.
- Neumann K. H., Kumar A. and Imani J. 2009. *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology, Principles and Practice*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 333 p.

- Niño O. J., Grajales G. E. J. y Mosquera M. O. M. 2009. Elicitación de raíces cultivadas *in vitro* de *Brugmansia candida* (solanaceae) con L-arginina, precursor de alcaloides del tropano. *Scientia et Technica*. 42: 257-262.
- Nozue M. and Yasuda H. 1985. Occurrence of anthocyanoplasts in cell suspension cultures of sweet potato. *Plant Cell Reports*. 4: 252-255.
- Núñez V. M., Reyes G. Y., Rosabal A. L. y Martínez G. L. 2014. Análogos espirostánicos de brasinoesteroides y sus potencialidades de uso en la agricultura. *Cultivos Tropicales*. 35(2): 34-42.
- Ohgishi M., Saji K., Okada K. and Sakai T. 2004. Functional analysis of each blue light receptor, *cry1*, *cry2*, *phot1*, and *phot2*, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101: 2223–2228.
- Pérez-Alonso N. y Jiménez E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*. 11(4): 195-211.
- Piñeros C. Y. A., Otálvaro A. y Velásquez L. M. 2009. Efecto de la aplicación de activadores sobre la producción de 4b-hidroxiwithanólido E, en raíces transformadas de *Physalis peruviana* L. *Universitas Scientiarum*. 14(1): 23-28.
- Pitta A. S. I., Spollansky T. C. and Giulietti A. M. 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids

in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 252–258.

Rangel S. G., Castro M. E., Beltran P. E., Reyes C. H. y García P. E. 2010. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*. 12(2): 90-95.

Reid M. S. El etileno en la tecnología postcosecha. 2007. En: *Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas*. Kader A. A. (Ed). Centro de Información e Investigación en Tecnología Postcosecha. Series de Horticultura Postcosecha. 24: California, USA. Capítulo 16. Tercera edición. 177-192.

Reyes M. J. M. y Martínez M. D. 2001. La plasticidad de las plantas. *Elementos*. 8(41): 39-43.

Riveros M. J., Parada A. y Pettinelli P. 2014. Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud; malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico. *Nutrición Hospitalaria*. 29(3): 491-499.

Roca W. y Ramírez H. 2000. *Introducción a la Biotecnología Vegetal*. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. CEDAF. Vicente Zapata S., Serie Proyecto ÁGORA. Ed D., Cali Colombia. 156 p.

- Sabater J. A. B. 2013. Estudio de las respuestas de defensa inducidas por activadores en cultivos de células vegetales. Universidad de Mursia, Facultad de Biología, España. 237 p.
- Sánchez G. E. 2006. ¿Qué sabe usted acerca de Cefalea?. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 37(1): 45.
- Segretín M. E. 2013. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología.
- Striedner J., Gutjahr E., Czygan F. C. and Braunegg G. 1991. Contributions to the biotechnological production of sweeteners from *Stevia rebaudiana* Bertoni. Accumulation of secondary metabolites by means of a precursor and by elicitation of cell cultures. Acta Biotechnologica. 5:505-509.
- Takeda J. 1990. Light-induced synthesis of anthocyanin in carrot cells in suspension: II Effects of light and 2,4-D on induction and reduction of enzyme activities related to anthocyanin synthesis. Journal of Experimental Botany. 41: 749-755.
- Taiz L. y Zeiger E. 2006. Fisiología vegetal (Volumen II). Publicacions de la Universitat Jaume I. Castelló de la Plana, España. 583-1338 pp.

- Totté N., Charon L., Rohmer M., Compernelle F., Baboeuf I. and Geuns J. 2000. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. *Tetrahedron Letters*. 41: 6407-6410.
- Totté N., Van den Ende W., Van Damme E., Compernelle F., Baboeuf I. and Geuns J. 2003. Cloning and heterologous expression of early genes in gibberellin and steviol biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Canadian Journal of Botany*. 81(5): 517-522.
- Wu J., Wang C. and Mei X. 2001. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus spp* cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *Journal of Biotechnology*. 85(1): 67-73.
- Yadav S. K. and Guleria P. 2012. Steviol glycosides from stevia: Biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 52(11): 988-998.
- Yukimune Y., Tabata H., Higashi Y. and Hara Y. 1996. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnology*. 14: 1129-1132.
- Zaninovic V. 2002. Emergencias en salud pública. *Colombia Médica*. 33(3): 129-130.

Zhong J. J., Yoshida M., Fujiyama K., Seki T. and Yoshida T. 1993. Enhancement of anthocyanin production by *Perilla frutescens* cells in a stirred bioreactor with internal light irradiation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 75: 299–303.

# **CAPÍTULO I. OBTENCIÓN DE CALLOS FRIABLES A PARTIR DE EXPLANTES DE HOJA Y SEGMENTOS NODALES DE *Stevia rebaudiana* Bertoni.**

## **1.1 RESUMEN**

El efecto de auxinas y citocininas se evaluó en la formación de callo a partir de explantes de hoja y segmentos nodales de *Stevia rebaudiana* Bertoni. El cultivo se desarrolló en medio MS (Murashige y Skoog) adicionado con bencilaminopurina (BAP) (1 a 2 mg L<sup>-1</sup>), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (1.0 y 1.5 mg L<sup>-1</sup>), ácido naftalenacético (ANA) (2 mg L<sup>-1</sup>) y ácido 4-flourofenoxiacético (AFFA) (0.2 a 10 mg L<sup>-1</sup>). El diseño experimental fue completamente al azar con cuarenta repeticiones por tratamiento. Concentraciones de 1.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 2,4-D produjeron el número mayor de explantes de hoja y segmentos nodales que formaron callo; los callos generados de hoja mostraron consistencia disgregable (friable) y los que se formaron en los nudos compacta. Los explantes de hoja, cultivados en el medio con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP combinado con 1 mg L<sup>-1</sup> de AFFA y en el que solo tenía 10 mg L<sup>-1</sup> de AFFA presentaron menor oxidación fenólica; una respuesta similar se observó en los segmentos nodales cultivados en presencia de 8 mg L<sup>-1</sup> de AFFA.

**Palabras clave:** estevia, callogénesis, medio de cultivo, reguladores de crecimiento, oxidación fenólica, callo friable

## 1.2 INTRODUCCIÓN

*Stevia rebaudiana* B. se caracteriza por sintetizar, mayoritariamente en sus hojas, metabolitos secundarios que le confieren sabor dulce. Estos se conocen como esteviósidos y su potencial de uso es alto en la industria farmacéutica y alimentaria. La producción de esteviósidos requiere de gran número de plantas, las técnicas biotecnológicas, como el cultivo de células en suspensión, permiten incrementar la producción uniforme de esteviósidos, mediante el uso de biorreactores (Davies y Deroles, 2014). Para establecer cultivos en suspensión se requieren callos friables, ya que las células de este tipo de callo pueden disgregarse fácilmente, lo que permite su distribución homogénea, incrementar su contacto con el medio de cultivo y mejorar el intercambio gaseoso. Todo esto incrementa la tasa de división respecto a los medios semisólidos (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota, 2006; Bhojwani y Dantu, 2013). La producción de callos friables depende de la composición de medio de cultivo, especialmente la combinación y concentración de reguladores de crecimiento, y el tipo de células o tejidos que se utilicen como explante, debido a que la concentración endógena de fitohormonas varía entre tejidos (Kryvenki *et al.*, 2008). Asimismo, el grado de oxidación fenólica de los explantes debe reducirse para garantizar la viabilidad de las células del callo y su capacidad de multiplicación una vez que se establecen los cultivos en suspensión (Azofeifa, 2009).

Las auxinas son necesarias para causar la desdiferenciación celular en los explantes (Terzi y Loschiavo, 1990) y combinadas con citocininas pueden favorecer el

desarrollo de callos friables (Costa *et al.*, 2008). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo en la inducción de callo friable a partir de explantes de hoja y segmentos nodales de estevia, partiendo de que la combinación de auxinas con citocininas en proporciones iguales inducen la formación de callo y que el tipo de explante puede determinar las características de friabilidad o no del mismo.

### **1.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **1.3.1 Material Vegetal**

Se utilizaron hojas de 5 a 6 cm de longitud y segmentos nodales de 1 cm de longitud colectados de la parte media y apical de plantas de estevia de la variedad Eirete crecidas en invernadero.

#### **1.3.2 Desinfestación del material vegetal**

Las hojas y segmentos nodales se enjuagaron con agua corriente y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (1.2 % de cloro activo) y 120  $\mu\text{L L}^{-1}$  de una solución de nano-partículas de plata al 20 % (Agrovit ®) por 15 min para las hojas y 30 min para los segmentos nodales; el exceso de solución desinfectante se eliminó del material vegetal con papel absorbente esterilizado.

### **1.3.3 Medios de cultivo para la inducción de callo friable**

El medio de cultivo consistió de las sales basales propuestas por Murashige y Skoog (MS) (1962) al 100 % suplementado con 2 % de sacarosa, 0.23 % de "phytagel" y 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico con 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico como antioxidantes. Para evaluar el efecto de la combinación de auxinas y citocininas en la formación de callo, se adicionó ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), bencilaminopurina (BAP) y ácido 4-fluorofenoxiacético (AFFA) en diferentes concentraciones (Cuadro 1). El pH se ajustó a  $5.75 \pm 0.05$  antes de adicionar "phytagel" y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min.

### **1.3.4 Inducción del callo**

Segmentos de 10 a 15 mm<sup>2</sup> de hoja (lado abaxial en contacto con el medio de cultivo) y segmentos nodales de 10 mm de longitud (horizontalmente sobre el medio) previamente desinfectados, se establecieron en cajas Petri (90 x 15 mm) que contenían 30 mL de cada uno de los medios de cultivo descritos en el Cuadro 1. Los cultivos fueron incubados en completa oscuridad en una cámara de crecimiento a  $25 \pm 2$  °C por un periodo de seis semanas para su evaluación.

Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo para la inducción de callo en explantes de hoja y segmentos nodales de *S. rebaudiana* Bertoni

Medio de cultivo	Regulador de crecimiento (mg L <sup>-1</sup> )			
	2,4-D	BAP	AFFA	ANA
Testigo	-	-	-	-
1	-	-	0.2	-
2	-	-	0.5	-
3	-	-	1.0	-
4	-	-	4.0	-
5	-	2.0	-	-
6	-	2.0	0.2	-
7	-	2.0	0.5	-
8	-	2.0	1.0	-
9	1.0	1.0	-	-
10	1.5	1.5	-	-
11	-	2.0	-	2.0
12	1.0	1.0	1.0	-
13	-	-	6.0	-
14	-	-	8.0	-
15	-	-	10.0	-

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BAP: bencilaminopurina; AFFA: ácido 4, flourofenoxiacético; ANA: ácido naftalenacético.

### 1.3.5 Multiplicación de los callos

Los explantes de hoja y segmentos nodales, con o sin callo, se transfirieron al mismo medio de cultivo pero fresco cada tres semanas.

### **1.3.6 Variables de respuesta**

Las variables de respuesta evaluadas fueron: explantes que formaron callo (%), grado de oxidación fenólica y características del callo. Las evaluaciones se realizaron después de seis semanas de haberse establecido los cultivos.

#### **Porcentaje de explantes con callo**

Esta variable se evaluó de forma visual haciendo el conteo de explantes de hoja y segmentos nodales que formaron callo después de seis semanas de cultivo, y se realizó el cálculo porcentual con base al total de explantes evaluados por cada tratamiento.

#### **Oxidación fenólica**

La evaluación se llevó a cabo en forma visual considerando la siguiente escala: 0, sin oxidación; 1, oxidación muy baja; 2, oxidación baja; 3, oxidación moderada; 4 oxidación alta y 5, oxidación muy alta (Figura 1).

#### **Características del callo**

La clasificación de los callos formados en los explantes fue de acuerdo a su capacidad para disgregarse: friable, alta capacidad para disgregarse (Figura 2 a y b), y compacto, baja capacidad para disgregarse (Figura 2 c y d).

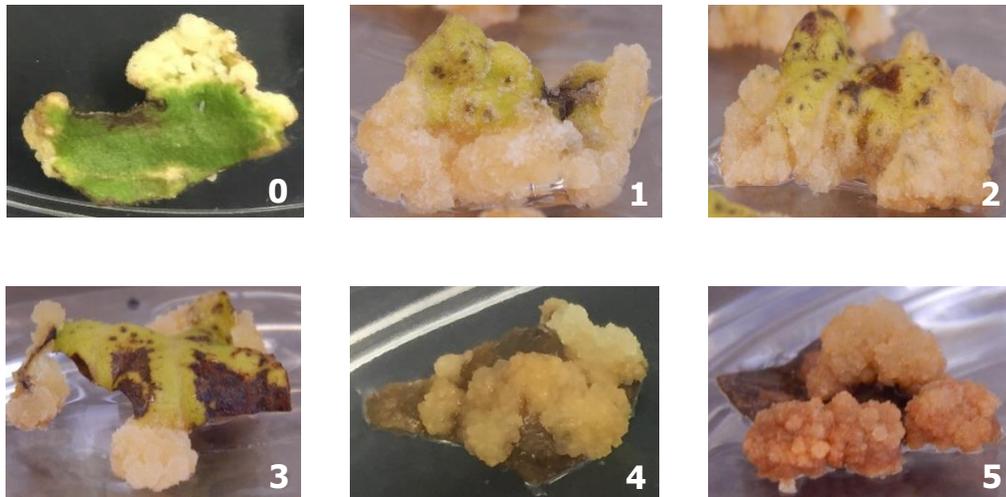


Figura 1. Explantes de hoja de *S. rebaudiana* con callo y distinto grado de oxidación. Donde 0, sin oxidación; 1, oxidación muy baja; 2, oxidación baja; 3, oxidación moderada; 4, oxidación alta y 5, oxidación muy alta.



Figura 3. Callos friables (a y b) formados en explantes de hoja y callos compactos (c y d) en segmentos nodales de *S. rebaudiana*.

### 1.3.7 Análisis estadístico de las variables de respuesta

Los 32 tratamientos que se evaluaron resultaron de la combinación del tipo de explante (hoja y nudo), medio de cultivo (15) y dos testigos (sin hormonas). El arreglo fue completamente al azar con cuarenta repeticiones por tratamiento, cada

repetición estuvo representada por una caja Petri con cinco explantes. Los datos de porcentaje de callo fueron sometidos a la transformación angular de Bliss ( $Y = \arcsen \sqrt{Y/100}$ ). Los datos transformados se analizaron estadísticamente realizando análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ) con el paquete de Análisis Estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc.).

## **1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1.4.1 Efecto del medio de cultivo en la formación de callo**

Los resultados mostraron que todas las combinaciones de reguladores de crecimiento promovieron la formación de callo tanto en los explantes de hoja como en los segmentos nodales. La producción de callo en ambos tipos de explante se favoreció principalmente por el medio que contenía 1.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y BAP (medio 10) (Cuadros 2 y 3). El porcentaje de explantes de hoja que formaron callo en el medio de cultivo con 1.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y BAP fue 1.3 veces mayor que el obtenido en los segmentos nodales con la misma combinación de reguladores (Cuadros 2 y 3). Los resultados concordaron con los de Kryvenki *et al.* (2008), ellos observaron que 95 % de los explantes de hoja de *S. rebaudiana* formaron callo, y sólo 80 % de los segmentos nodales lo hicieron. Los mismos autores observaron que la combinación de 2,4-D con BAP en proporciones iguales (0.49 mg L<sup>-1</sup>) indujo porcentaje mayor de explantes con callo. Asimismo, Lopéz-Gomez *et al.* (2010)

observaron que el tipo de explante y la composición del medio de cultivo afectaron la capacidad de formación de callo en hojas de café.

Además, al incluir sólo un regulador de crecimiento en el medio de cultivo se estimuló la formación de callo en porcentaje menor, tanto en explantes de hoja como en segmentos nodales (78 y 66 % menos, respectivamente) (medios 13, 14 y 15) comparado con lo obtenido en el medio 10 (Cuadros 2 y 3).

Al respecto, Besspalhok y Hattori (1997) observaron que la formación de callos embriogénicos en explantes de florete (conjunto de flores completamente cerradas) de *S. rebaudiana* dependió del tipo y concentración de reguladores de crecimiento, ya que el mayor porcentaje de callo lo obtuvieron con 4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D combinado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina. Asimismo, Kryvenki *et al.* (2008) observaron que la combinación de 2,4-D (0.5 mg L<sup>-1</sup>) y BAP (0.5 mg L<sup>-1</sup>) indujo un mayor número de explantes provenientes de estevia *in vitro*, y el porcentaje de explantes con callos se vio favorecido, además el tamaño del callo se incrementó y su aspecto en general mejoró.

#### **1.4.2 Efecto del medio de cultivo en la oxidación fenólica**

La oxidación menor se presentó en los explantes de hoja cuando éstos se cultivaron en los medios 8 (2.0 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP y AFFA), 10 (1.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y BAP), 12 (1.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, BAP y AFFA) y 15 (10 mg L<sup>-1</sup> de AFFA); mientras que en el

medio con 2.0 y 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y AFFA (medio 6), se registró el mayor índice de oxidación (Cuadro 2).

Para los segmentos nodales se presentó oxidación en todos los tratamientos, siendo los explantes cultivados en el medio que contenía 8 mg L<sup>-1</sup> de AFFA (medio 14) los que mostraron un nivel de oxidación fenólica bajo (Cuadro 3). Azofeifa (2009) menciona que los procesos de oxidación en el cultivo de tejidos pueden ser causados por el agente desinfectante, las heridas que sufren los explantes al momento de obtenerlos, la composición del medio de cultivo, entre otros.

#### **1.4.3 Efecto del medio de cultivo sobre el tipo de callo**

La formación de callo friable o compacto dependió de la concentración y combinación del tipo de regulador de crecimiento incluido en el medio de cultivo. No obstante, los explantes de hoja formaron callo friable en 66 % de los medios de cultivo evaluados; mientras que los segmentos nodales generaron callo compacto en todos los medios probados (Cuadro 2 y 3). Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Delgado-Paredes *et al.* (2013) en *Piper sp.*, ellos observaron que la producción de callos friables fue diferente dependiendo del tipo de explante y combinación de hormonas utilizados. Asimismo, Roca y Ramírez (2000) confirmaron que la respuesta del explante al cultivo *in vitro* está determinada por la interacción de aspectos como el genotipo, tipo de explante, normas de asepsia, composición de los medios de cultivo y las condiciones de incubación.

Cuadro 3. Efecto del medio de cultivo en la inducción de callo en explantes de hoja de *S. rebaudiana* después de cuatro semanas cultivo.

Medio de cultivo	Regulador de crecimiento (mg L <sup>-1</sup> )				Callogénesis (%)	Oxidación fenólica	Tipo de callo
	2,4-D	BAP	AFFA	ANA			
Testigo	-	-	-	-	2.0 i	4.8 ab	S/F
1	-	-	0.2	-	26.8 efgh	2.0 cde	Friable
2	-	-	0.5	-	32.7 cdefg	2.5 bcde	Friable
3	-	-	1.0	-	39.2 bcdef	3.0 abcde	Friable
4	-	-	4.0	-	29.8 defgh	2.8 abcde	Compacto
5	-	2.0	-	-	36.9 bcdefg	3.0 abcde	Friable
6	-	2.0	0.2	-	48.5 bcd	5.0 a	Friable
7	-	2.0	0.5	-	52.0 b	3.5 abc	Friable
8	-	2.0	1.0	-	45.3 bcde	0.8 e	Compacto
9	1.0	1.0	-	-	49.9 bc	1.7 cde	Friable
10	1.5	1.5	-	-	78.5 a	1.0 de	Friable
11	-	2.0	-	2.0	40.9 bcde	4.0 abc	Friable
12	1.0	1.0	1.0	-	44.4 bcde	1.0 de	Friable
13	-	-	6.0	-	11.7 hi	1.7 cde	Compacto
14	-	-	8.0	-	19.2 ghi	3.2 abcd	Compacto
15	-	-	10.0	-	20.8 fghi	0.7 e	Compacto
DMS					18.9	2.4	

0, sin oxidación; 1, oxidación muy baja; 2, oxidación baja; 3, oxidación moderada; 4, oxidación alta; 5, oxidación muy alta; S/F: sin formación de callo; DMS: diferencia mínima significativa. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, 0.05).

Cuadro 4. Efecto del medio de cultivo en la inducción de callo en segmentos nodales de *S. rebaudiana* después de cuatro semanas de cultivo.

Medio de cultivo	Regulador de crecimiento (mg L <sup>-1</sup> )				Callogénesis (%)	Oxidación fenólica	Tipo de callo
	2,4-D	BAP	AFFA	ANA			
Testigo	-	-	-	-	12.1 e	5.0 a	S/F
1	-	-	0.2	-	29.2 bcde	3.7 abc	Compacto
2	-	-	0.5	-	36.8 abcde	3.5 abc	Compacto
3	-	-	1.0	-	21.1 cde	3.5 abc	Compacto
4	-	-	4.0	-	16.8 de	3.7 abc	Compacto
5	-	2.0	-	-	36.3 abcde	4.0 ab	Compacto
6	-	2.0	0.2	-	42.7 abcd	4.2 ab	Compacto
7	-	2.0	0.5	-	49.1 ab	3.5 abc	Compacto
8	-	2.0	1.0	-	45.4 abc	2.0 bc	Compacto
9	1.0	1.0	-	-	45.1 abc	3.0 abc	Compacto
10	1.5	1.5	-	-	59.7 a	3.5 abc	Compacto
11	-	2.0	-	2.0	35.0 abcde	4.2 ab	Compacto
12	1.0	1.0	1.0	-	42.5 abcd	2.7 abc	Compacto
13	-	-	6.0	-	19.7 cde	2.2 abc	Compacto
14	-	-	8.0	-	21.5 cde	1.0 c	Compacto
15	-	-	10.0	-	20.0 cde	1.5 bc	Compacto
DMS					27.1	2.98	

0: sin oxidación; 1: oxidación muy baja; 2: oxidación baja; 3: oxidación moderada; 4: oxidación alta; 5: oxidación muy alta; S/F: sin formación de callo; DMS: diferencia mínima significativa. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes entre sí (Tukey, 0.05).

## **1.5 CONCLUSIONES**

El tipo de callo estuvo en función del explante utilizado y la combinación y concentración de reguladores de crecimiento (medio de cultivo). Los explantes de hoja formaron callo friable mientras los segmentos nodales, callo compacto. El número mayor de explantes de hoja que formó callo, con oxidación mínima, se obtuvo en el medio MS suplementado con  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP y 2,4-D. Las características de los callos obtenidos en estas condiciones de cultivo hacen factible su uso en el establecimiento de cultivos celulares en suspensión.

## 1.6 LITERATURA CITADA

- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 153-175.
- Bespalhok F. J. C. and Hattori K. 1997. Embryogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni floret explants. *Revista Brasileira de Fisiología Vegetal*. 9(3): 185 - 188.
- Bhojwani S. S. and Dantu P. K. 2013. *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer. India. 309 pp.
- Costa F. H. S, Loureiro T. S. and Pereira J. E. S. 2008. Influence of auxins and explants types in the induction of friable callus in *Piper hispidinervum* C. DC. *Revista Ciencia Agronómica*. 39(2): 269-274.
- Davies K. M. and Deroles S. C. 2014. Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 26: 133-140.
- Delgado-Paredes G. E., Kato M. J. y Rojas-Idrogo C. 2013. Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de *Piper sp.* *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 12(3): 269-282.
- Godoy-Hernández G. and Vázquez-Flota F. A. 2006. Growth measurements: Estimation of cell division and cell expansion. In: *Plant cell culture protocols*.

Loyola-Vargas V. M. and Vázquez-Flota F. (Eds.). Second edition. Humana Press, New Jersey USA. Part II: 51-58.

Kryvenki M., Kosky R. G., Guerrero D., Dominguez M. y Reyes M. 2008. Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. en medios de cultivo semisólidos. *Biotecnología Vegetal*. 8(2): 91 – 98.

López-Gómez P., Iracheta-Donjuan L., Castellanos-Juárez M., Méndez-López I., Sandoval-Esquivez A., Aguirre-Medina J. F., Ojeda-Zacarías Ma. C. y Gutiérrez-Díez A. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 33(3): 205 – 213.

Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.

Roca, W. y Ramírez, H. 2000. Introducción a la Biotecnología Vegetal. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. CEDAF, Universidad Nacional de Colombia. Vicente Zapata S., Serie Proyecto ÁGORA. Ed D., Cali Colombia. 156 p.

Terzi M. and Loschiavo F. 1990. Somatyc embryogenesis. In: *Plan Tissue Culture*, Bhojwani S. S. (Ed.). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. Vol. 19. Pags. 54-66.

## **CAPÍTULO II. TEMPERATURA DE INCUBACIÓN PARA EL CRECIMIENTO DE CALLOS FRIABLES DE *Stevia rebaudiana* BERTONI**

### **2.1 RESUMEN**

El efecto de la temperatura de incubación se evaluó con callos friables generados en explantes de hoja de *S. rebaudiana* Bertoni. Por otro lado, se cuantificó la concentración de esteviósido, por HPLC, en el medio de los cultivos en suspensión. Para evaluar el efecto de la temperatura, los callos se mantuvieron en medio semi-sólido Murashigue y Skoog (MS) suplementado con 1.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 2,4-D dentro de una cámara de incubación a 25, 28 o 30 °C durante 49 días y oscuridad total. El diseño fue completamente al azar con 10 repeticiones en cada tratamiento. Para los cultivos en suspensión se utilizó la misma composición del medio MS pero en forma líquida incubados a 25 °C, durante 49 días y fotoperiodo de 16 h luz con un diseño experimental completamente al azar y cuatro repeticiones. La temperatura de incubación de los callos a 28 °C produjo el mayor peso fresco celular; mientras que 25 y 30 °C influyeron de forma menor en el incremento de la biomasa celular. En cuanto a la producción de esteviósido, la concentración de este metabolito secundario, cuantificado en el medio, disminuyó con el paso del tiempo.

**Palabras clave:** estevia, temperatura, callo friable, esteviósido.

## 2.2 INTRODUCCIÓN

La evaluación del crecimiento celular *in vitro* es esencial para determinar parámetros como el tipo de contenedor, viscosidad de medio de cultivo, tiempo de subcultivo, tiempo de cosecha de las células y fase de crecimiento en la que ocurre la máxima producción de un metabolito, cuando ese es el objetivo (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota, 2006).

La velocidad de crecimiento puede variar dependiendo de la naturaleza del callo que se cultiva, si es friable, compacto o embriogénico (González *et al.*, 2011). Los callos de tipo friable se multiplican a mayor velocidad que los compactos (Szabados *et al.*, 1993). El cultivo de células en suspensión regularmente se establece a partir de callos friables considerando su mayor capacidad para disgregarse y mayor tasa de multiplicación (Bhojwani y Dantu, 2013); no obstante, estas cualidades dependen de factores como el medio de cultivo, condiciones ambientales, tipo de recipiente, velocidad de agitación, densidad celular, entre otros (Arias *et al.*, 2009; Schmidt-Durán *et al.*, 2016).

El objetivo del estudio fue evaluar la temperatura de incubación de callos friables de *S. rebaudiana* Bertoni, ya que, conocer la dinámica del crecimiento de estos callos permite determinar su potencial para producir biomasa. Así como también, establecer cultivos en suspensión para determinar la etapa en la que la producción de esteviósidos es máxima.

## **2.3 MATERIALES Y METODOS**

### **2.3.1 Material vegetal y medio de cultivo**

Los callos empleados en esta investigación se obtuvieron de explantes de hoja cultivados en el medio de cultivo que promovió el mayor porcentaje de explantes con callo y bajo índice de oxidación durante la fase de inducción (Capítulo I de este manuscrito). Dicho medio de cultivo contenía las sales basales MS al 100 % suplementado con 2 % de sacarosa, 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico y 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico como antioxidantes, 1.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 2,4-D y 0.23 % de "phytagel".

### **2.3.2 Cinética de crecimiento celular**

#### **Efecto de la temperatura en el crecimiento de callo friable**

En cajas Petri de 9 x 15 mm, con 30 mL de medio de cultivo de inducción, se colocaron 83 mg de callo friable, después de seis semanas de su iniciación (edad), y se incubaron a 25, 28 y 30 °C en oscuridad completa; el peso fresco de los callos fue registrado cada semana durante siete semanas.

#### **Producción de esteviósido de células en suspensión**

Dos gramos de callo friable se depositaron en matraces de 50 mL que contenían 20 mL del medio de cultivo descrito para el mantenimiento de callo friable, pero sin "phytagel", y se colocaron en un agitador orbital a 110 rpm dentro de una cámara

de incubación a  $25 \pm 2$  °C y fotoperiodo de 16 h de luz blanca fluorescente ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Las células de cada matraz se separaron del medio de cultivo líquido mediante papel filtro Whatman número 1, con la finalidad de conocer el peso seco de las células; se pesaron en una balanza analítica y luego se mantuvieron durante 72 h en una estufa a 80 °C, transcurrido este tiempo, se obtuvo su peso seco por diferencia de peso. Además, se cuantificó la concentración de esteviósido en el medio de cultivo por HPLC. Muestras de 2.5 mL de medio de cultivo se pasaron por una membrana con apertura de poro de  $0.45 \mu\text{m}$  (Thermo Scientific Titan 3 Nylon membrane, Germany), se inyectaron  $2 \mu\text{L}$  de muestra filtrada al equipo de HPLC (Hewlett Packard modelo 1100 e inyector automático modelo 1200 marca Agilent) y se utilizó una columna Eclipse XDB-C18 con  $4.6 \text{ mm}$  en diámetro interno x  $150 \text{ mm}$  de longitud y tamaño de partícula de  $5 \mu\text{m}$  (Agilent Technologies Nuclosil, E.U.A). La separación se realizó con la mezcla acetonitrilo/agua grado HPLC (80:20, v/v) con caudal de elución de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  durante 20 min.

La estimación para concentración de esteviósido se tomó basándose en el área del pico de la muestra comparada con el área de la curva de calibración del estándar comercial de esteviósido (Sigma Aldrich, USA).

### **2.3.3 Variables de respuesta**

La variable de respuesta evaluada para temperatura de incubación fue la biomasa celular. En los cultivos en suspensión, se evaluó el peso seco de las células y la

concentración de esteviósido en el medio nutritivo líquido. Las evaluaciones se realizaron cada semana durante siete semanas, para temperatura de incubación de los callos, y ocho semanas, para los cultivos celulares.

#### **2.3.4 Análisis de las variables de respuesta**

El diseño experimental para temperatura de incubación fue completamente al azar con tres tratamientos y 10 repeticiones, una repetición consistió de una caja Petri con 83 mg de callo.

Para el peso seco de las células en suspensión y la concentración de esteviósido en el medio de cultivo, el arreglo fue completamente al azar con cuatro repeticiones, una repetición estuvo representada por un matraz con 2 g de callo friable en 20 mL de medio de cultivo líquido.

### **2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **2.4.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento de los callos cultivados en medio semisólido.**

Los callos incubados a 28 °C mostraron incremento en su biomasa fresca después de la primera semana de cultivo, alcanzado la máxima en la séptima semana (95.8 mg) (Figura 1). En contraste, los callos cultivados a 25 °C comenzaron la fase exponencial en la primera semana, pero la biomasa acumulada fue menor en la séptima semana, respecto a 28 °C (91.8 mg). Los callos cultivados a 30 °C crecieron rápidamente durante la primera semana, pero después de ese tiempo su crecimiento

se desaceleró y acumularon el peso fresco menor al final del periodo evaluado (88.6 mg) (Figura 1); al mismo tiempo, el tejido del callo se volvió ligeramente necrótico. Los resultados obtenidos permiten inferir que la temperatura óptima de crecimiento de los callos es cercana a 28 °C.

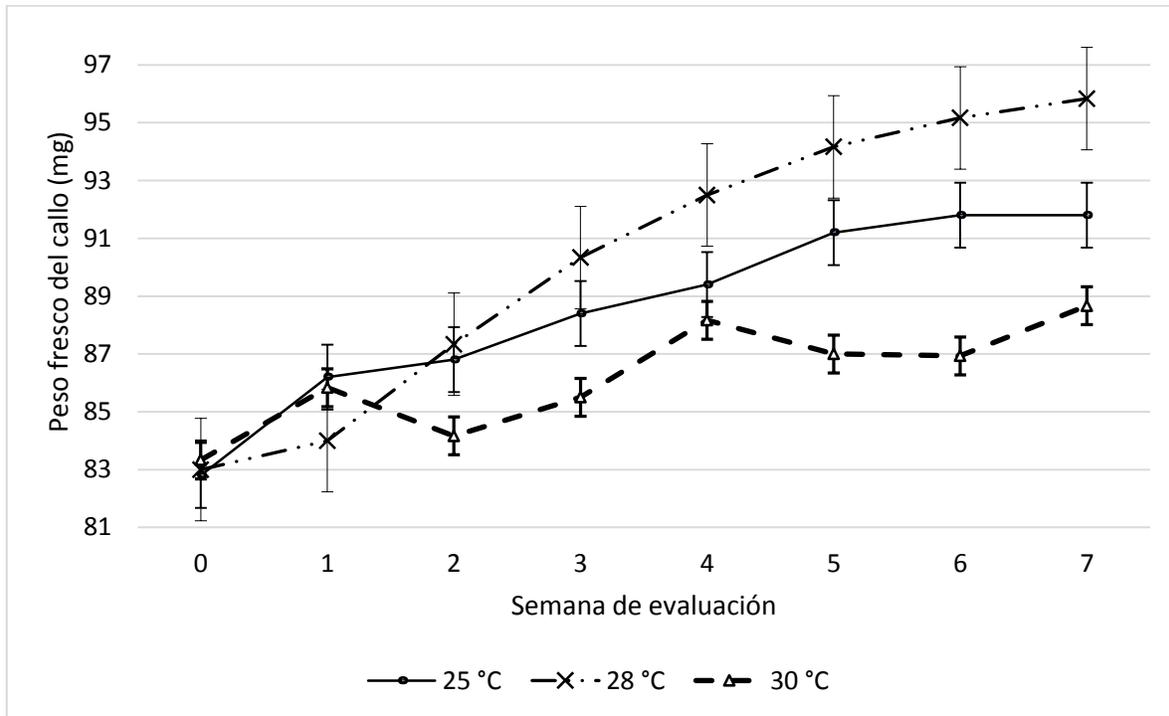


Figura 1. Cinética de crecimiento de callos friables de *S. rebaudiana* cultivados en medio semisólido. Los datos son la media  $\pm$  DS (n=10).

De acuerdo a Kokotkiewicz *et al.* (2014) la temperatura de incubación elevada (30 °C) inhibió significativamente el crecimiento en callos de *Cyclopia subternata* Vogel, dejando ver la sensibilidad a cambios ambientales en dicha especie, lo cual coincide con lo observado en los callos de estevia cultivados a 30 °C.

Por otro lado, la temperatura puede ser un factor determinante para el crecimiento de las células, ya que la composición y concentración de ciertos compuestos gaseosos del medio de cultivo, como oxígeno, dióxido de carbono, etileno y otros, dependen de esta variable (Lee-Parsons y Shuler, 2005; Trung *et al.*, 2006; Arias *et al.*, 2009). Posiblemente la composición gaseosa de los cultivos en suspensión establecidos en la presente investigación también pudo afectarse con la temperatura e influir en el comportamiento de la biomasa celular.

#### **2.4.2 Peso seco de células en suspensión y producción de esteviósido**

El peso seco de las células se mantuvo constante durante las primeras semanas de cultivo aumentando exponencialmente a partir de la segunda semana. Cabe señalar que el crecimiento celular no mostró fase estacionaria, sino que después de la quinta semana su peso seco se redujo 37 % en la sexta semana de cultivo y de forma paulatina en las dos semanas finales (Figura 2).

La muerte rápida de las células a partir de la quinta semana, podría deberse al tamaño del recipiente utilizado y a la cantidad de medio de cultivo e inóculo (células), la velocidad de agitación y el intercambio de gases, entre otros factores, los cuales afectaron negativamente procesos metabólicos esenciales en las células (Stachel *et al.*, 1986; Zhang y Zhong, 1997).

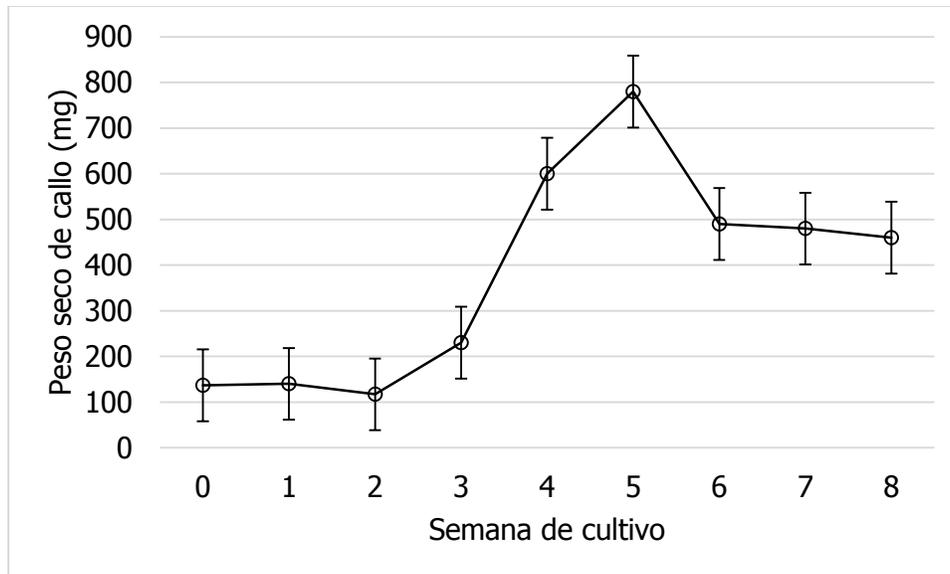


Figura 2. Crecimiento de células de *S. rebaudiana* cultivadas en medio líquido a 25 °C y 16 h de luz.

La concentración de estevósido en el medio de cultivo descendió a partir de la primera semana de evaluación y hasta la cuarta semana; en las dos semanas siguientes se presentó una fase estable y descendente después de este tiempo (Figura 3). Con lo que, se redujo 17 % la concentración de estevósido cuantificado en el medio desde el establecimiento del cultivo y hasta la última semana de cultivo.

Durante la cuarta y quinta semana de cultivo se observó el máximo peso seco celular (Figura 2); sin embargo, la concentración de estevósido no aumentó en estas semanas (Figura 3). Este comportamiento pudo deberse a que una parte de estevósidos se mantuvo en las células.

Pocos estudios han determinado el efecto de factores ambientales en la síntesis de esteviósidos. Jarma *et al.* (2012) indicaron que las enzimas involucradas en la formación de estas moléculas podrían ser estimuladas por la temperatura alta (32.5 °C), al intervenir en la actividad de las enzimas que catalizan las glucosilaciones que ocurren en la ruta de la síntesis de glucósidos. Además, factores como temperatura, presión o flujo de aireación (Arias *et al.*, 2009) influyen en la concentración y composición de compuestos gaseosos en el medio de cultivo que afectan la síntesis de metabolitos secundarios (Lee-Parsons y Shuler, 2005; Trung *et al.*, 2006).

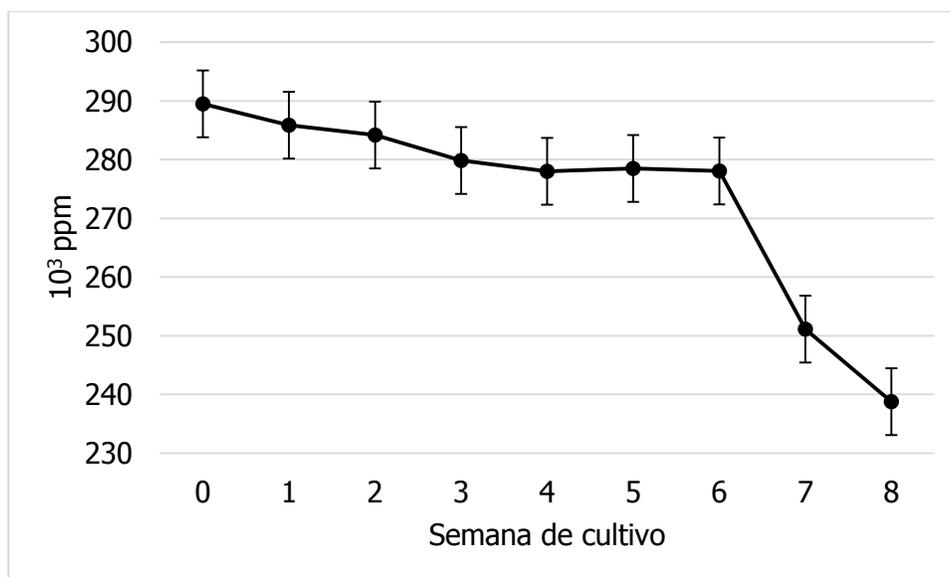


Figura 4. Concentración de esteviósido en el medio de cultivo de células en suspensión de *S. rebaudiana* cultivadas a 25 °C y 16 h de luz

## **2.5 CONCLUSIONES**

Los callos friables de explantes de hojas de *S. rebaudiana* muestran tasa mayor de crecimiento cuando se cultivan en medio semisólido a 28 °C y oscuridad completa.

Las condiciones para establecer cultivos en suspensión no fueron las adecuadas para mantener el crecimiento celular por más de cinco semanas. La concentración de esteviósido en los cultivos en suspensión fue constante durante tres semanas.

## 2.6 LITERATURA CITADA

- Arias M., Aguirre A., Angarita M., Montoya C. y Restrepo J. 2009. Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna*. 76(157): 109-121.
- Bhojwani S. S. and Dantu P. K. 2013. *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer. India. 309 pp.
- González P., O. S.; Hernández E., M.; Silva P., J. J.; Espinosa R., A. 2011. Evaluación de la dinámica del crecimiento *in vitro* en callos de *Ipomoea batatas*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 13 (1): 148-155.
- Godoy-Hernández, G. and Vázquez-Flota, F. A. 2006. Growth measurements. *In: Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*. Loyola-Vargas V. M. and Vázquez-Flota F. (Eds.). Second edition. Humana Press Inc. New Jersey, USA. 318. pp: 51-58.
- Jarma A., Rengifo T. y Araméndiz-Tatis H. 2006. Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana*) en función de la radiación en el Caribe colombiano. II. Análisis de crecimiento. *Agronomía Colombiana*. 24(1): 38-47.
- Jarma O. A., Cardona A. C. y Fernández H. C. 2012. Efecto de la temperatura y radiación en la producción de glucósidos de esteviol en *Stevia rebaudiana* en

el caribe húmedo colombiano. Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica. 15(2): 339 – 347.

Kokotkiewicz A., Bucinski A. and Luczkiewicz M. 2014. Light and temperature conditions affect bioflavonoid accumulation in callus cultures of *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 118(3): 589–593.

Lee-Parsons C. and Shuler M. 2005. Sparge gas composition affects biomass and ajmalicine production from immobilized cell cultures of *Catharanthus roseus*. Enzyme and Microbial Technology. 37(4): 424-434.

Schmidt-Durán A., Alvarado-Ulloa C., Chacón-Cerdas R., Alvarado-Marchena L. F. and Flores-Mora D. 2016. Callogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) and its microscopic analysis. SpringerPlus. 5:1717.

Stachel S. E., Nester E. W. and Zambryski P. C. 1986. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America. 83(2): 379-383.

Szabados L., Mroginski L. A. y Roca W. M. 1993. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones, En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Roca W. M y Mroginski L. A. (Eds.), Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. Capítulo 8: 173-210.

Trung N., Murthy H. N., YU K., Jeong C. S., Hahn E. J. and Paek K. Y. 2006. Effect of oxygen supply on cell growth and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*. *Journal of Plant Physiology*. 163(12): 1337-1341.

Zhang Y. H. and Zhong J. J. 1997. Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation of *Panax notoginseng* cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 21(1): 59-63.

**CHAPTER III. ELICITORS ON STEVIOSIDES PRODUCTION IN *Stevia rebaudiana* Bertoni CALLI**

**Lizbeth Mejia-Espejel, Alejandrina Robledo-Paz, Edmundo Lozoya-Gloria, Cecilia Beatriz Peña-Valdivia, José Alfredo Carrillo-Salazar and Gregorio Arellano-Ostoa**

**3.1 ABSTRACT**

*Stevia rebaudiana* Bertoni produces glycosides known as steviosides and they have increased their demand. Biotechnological techniques are used as an alternative to increase the production of these compounds. The aim of this study was to determine the effect of elicitors on the synthesis of steviosides in the calli of *S. rebaudiana*. To meet this goal, a completely randomized experimental design with four replicates was used for each elicitor. Calli obtained from leaf segments were cultured on medium containing salicylic acid (10 and 100 mM), methyl jasmonate (10 and 100 mM), citric acid (200 mg L<sup>-1</sup>), ascorbic acid (100 mg L<sup>-1</sup>), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (1.5 mg L<sup>-1</sup>), and benzylaminopurine (1.5 mg L<sup>-1</sup>), under red, blue or white light for 24-h, at 25 or 28 °C. The calli cultivated at 28 °C or with 100 mM of salicylic acid increased their stevioside production by 9.8 times compared to that of the leaves of plants grown under greenhouse conditions. The concentration of rebaudioside A exhibited the highest values (34.6 times higher than in leaves) by applying 10 mM of salicylic acid. The accumulation of steviol was given in the presence of

antioxidants and growth regulators and combining 100 mM of salicylic acid with 28 ° C. Salicylic acid, certain types of exogenous antioxidants, growth regulators and temperature may promote the accumulation of steviosides.

**Keywords:** Stevia, callus, stevioside, rebaudiose A, steviol, elicitors, *in vitro*.

### 3.2 INTRODUCTION

*Stevia rebaudiana* Bertoni is a perennial shrub of the Asteraceae family that is native to Paraguay. It is commonly known as the "sweet leaf" because it mainly accumulates secondary metabolites called steviosides (stevioside, rebaudioside A, B, C, D, and F, dulcoside, steviolbioside, and steviol) (1, 2, 3) in its leaves. These metabolites are natural non-caloric sweeteners that do not contain metal residues in the form of a sweet extract and are not carcinogenic; thus, they differ from artificial sweeteners (4). Further steviosides can be 300 times sweeter than sucrose (5). The beneficial effects of steviosides in terms of human health have led to increased consumption; thus, greater production is required. The quantity and quality of steviosides produced by a stevia plant can be altered by factors such as growing season, planting density, solar radiation, soil moisture, temperature (6), and plant nutrition (7). The production of steviosides from cells (calli) cultivated *in vitro* decreases the variability of the levels of these metabolites, because the chemical and physical conditions in which the cells are grown are controllable; also the space and labor required for production is less than that of the conventional

method (8). Likewise, tissue culture allows for the use of compounds and environmental conditions that activate the production and accumulation of steviosides.

Secondary metabolites of commercial interest have been produced by *in vitro* tissue culture, in species such as *Taxus globosa* (9), *Artemisia annua* (10), *Ambrosia tenuifolia* (11), and *Nothapodytes foetida* (12). Although there are protocols for *in vitro* tissue culture of stevia (13, 14, 15, 16, 17), studies on the activation of steviosides synthesis in the calli or suspension cells are scarce. Among these protocols, activators such as NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, proline, polyethylene glycol, *Aspergillus niger*, *Septoria steviae*, and *Alternaria steviae* have been used (1, 18, 19).

The aim of the present study was to determine the effect of salicylic acid, methyl jasmonate, light exposure, incubation temperature, antioxidants and growth regulators on the production of steviosides from stevia calli. Our hypothesis was that at least one of the activators would significantly increase steviosides production, and that a portion of the steviosides produced would be excreted into the culture medium.

### **3.3 MATERIALS AND METHODS**

#### **3.3.1 Plant material**

Leaves 5 to 6 cm long from the center of stevia plants grown in the greenhouse were collected, rinsed with tap water and immersed in sodium hypochlorite solution

(1.2 % active chlorine) and 120  $\mu\text{L L}^{-1}$  of silver nanoparticles solution at 20 % (Agrovit <sup>®</sup>), for 15 minutes. Excess disinfectant was removed from the leaves with sterile absorbent paper.

### **3.3.2 Callus-inducing medium**

Murashige and Skoog (MS) medium (20) supplemented with 1.5  $\text{mg L}^{-1}$  6-benzylaminopurine (BAP); 1.5  $\text{mg L}^{-1}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); 200  $\text{mg L}^{-1}$  citric acid, 100  $\text{mg L}^{-1}$  ascorbic acid as the antioxidant, 2 % sucrose, and 0.23 % phytigel was used for callus induction. The pH was adjusted to  $5.75 \pm 0.05$  before adding phytigel and was sterilized for 20 minutes, at 121 °C.

### **3.3.3 Callus induction and multiplication**

Segments (1  $\text{cm}^2$ ) of the disinfested leaves were placed in Petri dishes with 30 mL of the induction medium and kept in a growth chamber in the dark, at  $25 \pm 2$  °C. The formed calli were transferred every four weeks (for 12 weeks) to fresh culture medium to increase their biomass.

### **3.3.4 Effect of activators on stevioside production in the calli**

Three grams of calli were placed in 125 mL Erlenmeyer flasks with 30 mL of liquid induction medium. The calli were exposed to different light wavelengths and temperatures, as well as salicylic acid, methyl jasmonate, antioxidants and growth

regulator concentrations as described below and were kept under agitation (digital orbital shaker, Model 3500, Thomas Scientific) at 110 rpm for 24 h.

### **3.3.5 Evaluation of the effects of light**

White fluorescent light (WL) (400-750 nm), blue light (BL) (450-500 nm), red light (RL) (625-740 nm), and the combination of RL/BL were the different types of light evaluated in this study. In the WL, BL, and RL treatments, the cells were exposed to the different types of light, for 24 h; in the RL/BL condition, the cultures were maintained with RL for 12 h and with BL for another 12 h. The temperature of the four treatments was maintained at  $25 \pm 2$  °C.

### **3.3.6 Evaluation of the effects of temperature**

The calli were incubated in a growth chamber at 25 or 28 °C with a 16 h photoperiod under white fluorescent light ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### **3.3.7 Evaluation of the effects of salicylic acid (SA)**

SA 10 mM or 100 mM was applied to the medium containing the calli in suspension; the SA was previously solubilized in ethanol (96 %) and filtered through a cellulose membrane (0.45  $\mu\text{m}$  in diameter). The cultures were incubated at  $25 \text{ °C} \pm 2$  with a 16 h photoperiod under white fluorescent light. Control cells were cultured in a medium with 96 % ethanol.

### **3.3.8 Evaluation of the effects of salicylic acid and growth temperature**

The calli were maintained for 24 h in the liquid induction medium with 100 mM of SA at 28 °C and under fluorescent white light for 16 h.

### **3.3.9 Evaluation of the effect of methyl jasmonate (MeJA)**

The calli were maintained in a culture medium with 10 or 100 mM of MeJA (Sigma Aldrich, USA) for 24-h. The MeJA was previously filtered with a cellulose membrane (0.45 µm in diameter). Calli cultured without exogenous MeJA were used as the control. Calli were maintained under white fluorescent light for 16 h at 25 ± 2 °C.

### **3.3.10 Evaluation of the effect of antioxidants and growth regulators**

The effect of antioxidants (ATX) and growth regulators (GR) on the production of steviosides was evaluated in two liquid culture media as follows: 1) callus induction medium without citric and ascorbic acid, and 2) callus induction medium without BAP and 2,4-D. These cultures were incubated at 25 ± 2 °C under white fluorescent light for 16-h. Cells growing in the liquid induction medium containing both growth regulators and antioxidants were used as the control.

### **3.3.11 Extraction and analysis of steviosides**

The calli in suspension were separated from the liquid medium by filtration through Whatman filter paper # 1. After filtration, the liquid medium was frozen, and the calli and the leaves collected in the greenhouse were lyophilized. Then, 2.5 mL of

ethanol absolute grade HPLC (Merck, Darmstadt, Germany) was added to 200 mg of leaf tissue or cells, lyophilized and crushed; the mixtures were then shaken on an orbital shaker (Heidolph Multi Reax, Germany) for 3-h, and centrifuged at 4500 rpm for 10 min.

The supernatant (2.5 mL) and the culture medium (2.5 mL) were filtered through a cellulose membrane (0.45  $\mu\text{m}$  in diameter) (21), and the filtered samples were analyzed isocratically by HPLC to determine the concentration of stevioside, rebaudioside-A, and steviol. Each sample (2  $\mu\text{L}$ ) was injected into an HPLC (Hewlett Packard model: 1100, with an Automatic Agilent injector model: 1200) and Eclipse column XDB-C18, with a 4.6 mm internal diameter, 150 mm length, and 5  $\mu\text{m}$  particle size (Agilent Technologies Nuclosil, USA). The separation mixture was acetonitrile:water (80:20, v/v), both HPLC grade, with an elution flow rate of 1 mL  $\text{min}^{-1}$  for 20 min. Calibration curves of commercial stevioside, rebaudioside A and steviol (Sigma Aldrich, USA) were used to estimate the steviosides concentration.

### **3.3.12 Experimental design and statistical analysis**

A completely randomized experimental design with four replicates for each treatment was used. One repetition was a flask with suspended calli. Independent experiments were established to evaluate the effect of each activator (factor). Four treatments were used for the light experiment, two for temperature, two for SA and a control with ethanol and without SA, one combining SA and temperature, two for

MeJA and its control without MeJA, one for antioxidants, one for growth regulators, and an absolute control (calli grown in liquid induction culture medium without any of the activators). Analysis of variance was performed for each experiment. The differences between treatments for each activator were evaluated by Tukey's test ( $P < 0.05$ ). The means of the best treatments for each activator were also compared. Statistical analysis was performed using the statistical package SAS version 9.0 (SAS Institute Inc.).

### **3.4 RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.4.1 Effects of the light**

Significant differences were shown in the content of stevioside produced by calli cells exposed to BL, WL, RL, and RL/BL, compared to the leaves of greenhouse plants; the concentration of this metabolite in the calli of these four treatments was between 3.9 - 4.2 times greater than that of the leaves (Table 1).

Significant differences were found among the BL, WL, RL and RL/BL treatments in terms of the content of stevioside in culture medium as compared to the leaves of the greenhouse plants. WL was found to have the largest effect, resulting in 1.8 times more stevioside in the medium than was observed in the treatments with BL and RL or its combination (RL/BL), and 3.6 times more than in the leaves. The total concentration of stevioside (callus plus culture medium) showed a similar tendency

to that observed in the culture medium, but this value was close to eight times higher than that in the leaves (Table 1).

Rebaudioside A was not detected in the cells; it was only present in the culture medium of the RL, RL/ BL, and BL treatments, and the concentration was three times greater than that in the leaves, indicating that practically all this metabolite was excreted into the culture medium, and that wavelengths between 400 and 750 seem to inhibit retention of rebaudioside A in the calli (Table 1). Conversely, steviol was detected in low concentration only in the calli of the BL treatment, whereas this metabolite was not found in the culture medium or in the leaves (Table 1).

In a previous report, the authors indicated that the full light spectrum stimulates synthesis of isopentenyl pyrophosphate (IPP) ( $\delta$ ), which is a substrate used in the synthesis of gibberellic acid and steviosides. Likewise, prolonged exposure of the cellular culture to white light, stimulates photoreceptors that can control the expression of specific genes responsible for growth, development and secondary metabolism in plants, because light produces photooxidative stress causing the cells to activate their signaling mechanisms (22).

It has been observed that white light increases the synthesis of steviosides and their content in the calli of stevia ( $100 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) compared to those grown in darkness, which only showed traces of the same compounds, suggesting that the

synthesis of steviosides is related to the development of chloroplast membranes, which is favored by light (23).

### **3.4.2 Effects of temperature**

No significant differences were observed for stevioside content in the calli grown at 25 and 28 °C, but both cases showed approximately four times greater concentrations than that in the leaves (Table 1). In contrast, in the culture medium, the amount of stevioside produced at 28 °C was 1.6 times greater than that at 25 °C and six times greater than that in the leaves. The total content of stevioside showed the same tendency as the content found in the medium, but the calli cultured at 28 °C accumulated approximately 10 times more stevioside than the leaves (Table 1). Rebaudioside A and steviol were not detected in calli or culture media at 25 and 28 °C (Table 1).

The growth rate, accumulation of intracellular reserve compounds, oxygen uptake rate, and production of secondary metabolites depends on temperature (24). Temperatures other than those optimal for cell growth can divert precursors from primary to secondary metabolism (25); for stevia, the optimal temperature is between 24 and 28 °C (26). In this respect, the effects of temperature on ajmalicine production in cell suspensions of *Catharanthus roseus* (27) were evaluated, with the highest concentration obtained at 27.5 °C compared to 15, 20, 25, 30 and 35 °C.

### 3.4.3 Effects of salicylic acid

The content of stevioside in the calli was significantly different among the treatments. Calli treated with 100 mM of SA accumulated approximately 51 times more stevioside compared to those cultured with 10 mM of SA, and 2.2 times more than that in the leaves. In addition, the absolute control (T1) and the control treatment with ethanol and without SA (T2) showed a significantly higher concentration of stevioside than that exposed to SA in the calli and in the leaves. In contrast, the concentration of stevioside that was detected in the total content was significantly higher with 100 mM of SA (24 %) compared to that of the other treatments and that in the leaves (9.7 times greater) (Table 2).

Rebaudioside A was detected only in calli that were cultured with 10 mM of SA but in lower concentration than in the leaves. In contrast, in medium with 10 mM of SA, the concentration of rebaudioside A was 34.5 times greater than that in the leaves. The tendency of the total concentration of rebaudioside A was similar to that observed in the medium (Table 2). Steviol was only detected in the calli of the treatment with 100 mM of SA (Table 2).

A previous study (28) evaluated the effect of SA (0, 0.36, 0.72, 1.1, and 1.5 mM) on the calli of *Calendula officinalis* L, finding that the highest concentration of SA used on the calli increased the concentration of  $\beta$ -pinin (an essential oil) by 86.7 times compared to that obtained from the mother plant. Likewise, it was possible to

increase the production of salvianolic B acid and caffeic acid in cellular cultures of *Salvia miltiorrhiza* exposed to 0.45 mM of SA (29). The effect of SA on the increase of stevioside, rebaudioside A and steviol confirms the reaction of the plant tissue to this compound (30); likewise, exogenous application of SA can protect cells from stress-generating factors, by causing oxidative stress (31); for this reason, some protective mechanisms are activated, such as the synthesis of secondary metabolites (30).

#### **3.4.4 Effects of methyl jasmonate**

Stevioside concentration in the calli exposed to 10 mM of MeJA was significantly higher compared to that of the control without MeJA and that in the leaves. This metabolite was not detected in calli grown in 100 mM of MeJA. In contrast, the highest concentration of stevioside was observed in the culture medium with 100 mM of MeJA. This result indicates that the highest concentration of MeJA promoted the excretion of stevioside to the medium. Irrespective of this effect, the total stevioside concentration was recorded in the treatments grown in 10 mM of MeJA and in the control; this concentration was 6.3 times greater than that in the leaves (Table 2). The above result indicates that to increase the synthesis of stevioside, the concentrations of exogenous MeJA should be less than 10 mM. This finding coincides with the results of another study done with *Saussurea medusa* cells, where an increase of jaceosidin and hispidulin was observed when 0.005 mM of MeJA was added to the culture medium, while the levels of these metabolites decreased with

MeJA at 0.5 mM (32). Likewise, *Melastoma malabathricum* cell cultures exposed to 0.009, 0.0225, 0.056, 0.09, and 0.225 mM of MeJA presented higher contents of anthocyanins with the lower concentrations of MeJA (33).

The highest concentration of rebaudioside A in calli and in total was obtained by applying 100 mM of MeJA (Table 2); the concentrations were twice as high as that in the leaves. On the other hand, it was not possible to detect this metabolite in the culture medium, indicating that MeJA did not promote the excretion of rebaudioside A into the culture medium (Table 2). Steviol was not detected in any of the treatments, nor in the control or the leaves (Table 2). Jasmonates have been found to act as regulators of the reactions toward infection processes and wound damage in plants by activating the synthesis of secondary metabolites (34, 35, 36).

#### **3.4.5 Effect of antioxidants and growth regulators**

The presence of citric and ascorbic acid or BAP and 2,4-D in the culture medium increased the stevioside concentrations by 2.4 and 1.7 times, in calli and the culture medium, respectively compared to leaves (Table 3). Nevertheless, these culture conditions produced a lower content of stevioside than that of the absolute control (Table 3), indicating that the combination of antioxidants and hormones generally performs better than if they were used separately. The total concentration of stevioside showed a similar behavior to that described above (Table 3).

Both exogenous antioxidants and growth regulators increased the concentration of rebaudioside A in calli (1.9 and 1.8 times, respectively) as compared to that in the leaves (Table 3); however, this metabolite was not detected in the culture medium for any of these treatments (Table 3), while for the total amount of rebaudioside A, the same tendency was observed as in calli (Table 3).

In the presence of antioxidants or growth regulators, the amount of steviol in calli and the total concentration was greater than that in the leaves and with the combination of both (absolute control) (Table 3). These results indicate that growth regulators and antioxidants may act as secondary metabolite activators. Phytohormones are used for various functions in the regulation of growth and metabolism, such as promoting the production of secondary metabolites (36). In this respect, (37) found that the total phenol content of the calli of *Artemisia absinthium* L., cultivated in presence thidiazuron (0.5 mg L<sup>-1</sup>) was higher than that grown in the absence of this regulator. In addition, by combining indoleacetic acid (0.1 mg L<sup>-1</sup>) and BAP (1 mg L<sup>-1</sup>), an eightfold increase in flavonoid synthesis was found in *Digitalis lanata* cell cultures in comparison to that in cells grown in 2,4-D (1 mg L<sup>-1</sup>) and BAP (2 mg L<sup>-1</sup>) (38).

On the other hand, antioxidants (particularly ascorbic acid) may be precursors to the synthesis of molecules of primary and secondary metabolism and affect the activity of peroxidases and enzymes that are involved in physiological defense functions;

similarly, citric acid can redirect carbohydrates towards secondary metabolism (39, 40, 41).

#### **3.4.6 Effects of salicylic acid at 28 °C**

Calli grown by combining 100 mM of salicylic acid (SA) at 28 °C did not show significant differences in stevioside production with respect to the calli of the absolute control, but the amount of stevioside exceeded the leaf content by 3.6 times, with a similar tendency observed for the total concentration of this metabolite (Table 3). However, the concentration of stevioside in the medium was significantly higher in the SA at 28 °C treatment than that in the control and in the leaves. On the other hand, rebaudioside A was not detected in the calli exposed to SA at 28 °C, nor in the control, but it was found in the culture medium with a 12.7 times greater concentration than that in the leaves (Table 3). Meanwhile, steviol was only found in the calli after applying SA at 28 °C, and the concentration was significantly higher than that in the control and in the leaves (Table 3). SA is a signal that induces plant defense mechanisms to extreme environmental conditions and activities affected by temperature. If we compare the results obtained with 100 mM of SA at 25 °C (Table 2) to those observed in calli exposed to 100 mM of SA at 28 °C (Table 3), it can be seen that stevioside production decreased with increasing temperature, while the steviol concentration increased. In this regard, endogenous levels of SA were found to be inhibited when incubating tobacco plants with tobacco mosaic virus at 32 °C, but the SA concentration increased from 10 to 20 times upon incubation of the plants

at 22 °C (42). The authors do mention that genes related to pathogenesis were not induced at 32 °C.

### **3.4.7 Best treatment for increasing the production of steviosides *in vitro***

Comparison of means of the total concentration of stevioside, rebaudioside A and steviol obtained in the best treatments for each activator, showed that the most effective activators for the stevioside were the incubation of calli at 28 °C or exposing them to 100 mM of SA, which increased the concentration of stevioside by 9.8 times in comparison to the leaves (Table 4). Growing calli in 10 mM of SA induced 34.6 times more rebaudioside A than that in the leaves, whereas steviol production was promoted by growing the calli in a medium with antioxidants, 100 mM of SA at 28 °C or growth regulators (BAP and 2,4-D) (Table 4). The above finding indicates that the synthesis of stevioside, rebaudioside A and steviol is affected by different environmental stimuli.

Thus, if the goal is to increase the production of stevioside, it is recommended to expose the calli to 100 mM of salicylic acid at 25 °C or only cultivate the calli at 28 °C. If the metabolite of interest is rebaudioside A, cultivating calli in the presence of 10 mM of salicylic acid may promote a significant increase in production, whereas if steviol is the metabolite of interest, the best strategy is to cultivate the calli in 100 mM of SA at 28 °C or with growth regulators (2,4-D and BAP) or antioxidants (citric and ascorbic acid) with the cells incubated at 25 °C.

The present investigation showed that stevia cells (calli) grown *in vitro* have a high capacity to synthesize steviosides, and that this capacity increases with their exposure to factors such as light, temperature or chemical agents (methyl jasmonate, salicylic acid, antioxidants, and growth regulators). Additionally, this is the first report that shows that cells can excrete steviosides into the culture medium, a finding that allows for calculation of the real concentration of the synthesized steviosides, which is not possible when only the cells are analyzed. The fact that the steviosides are excreted into the medium could facilitate their extraction by reducing the time and materials required to obtain them from the cells.

Table 1. Steviosides concentration in suspended calli of *Stevia rebaudiana* B. exposed to activator agents (light and temperature).

Activator	Callus			Culture medium			Total amount		
	10 <sup>3</sup> ppm			10 <sup>3</sup> ppm			10 <sup>3</sup> ppm		
	Stevioside	Reb-A	Steviol	Stevioside	Reb-A	Steviol	Stevioside	Reb-A	Steviol
<b>Light</b>									
RL	419.28 a	0.00 b	0.00 a	202.94 b	301.30 a	0.00	622.21 b	301.30 a	0.00 a
RL/BL	404.24 a	0.00 b	0.00 a	192.44 b	309.31 a	0.00	596.68 b	309.31 a	0.00 a
WL	394.05 a	0.00 b	0.00 a	355.33 a	0.00 c	0.00	749.38 a	0.00 c	0.00 a
BL	391.26 a	0.00 b	2.34 a	182.52 b	310.98 a	0.00	573.78 b	310.98 a	2.34 a
Leaf	97.95 b	91.47 a	0.00 a	97.95 c	91.47 b	0.00	97.95 c	91.47 b	0.00 a
SMD	29.044	2.23	3.33	63.998	37.92	ND	62.061	37.92	3.33
<b>Temperature</b>									
25 °C	394.62 a	0.00 b	0.00	355.09 b	0.00 b	0.00	749.71 b	0.00 b	0.00
28 °C	381.14 a	0.00 b	0.00	587.33 a	0.00 b	0.00	968.47 a	0.00 b	0.00
Leaf	97.95 b	91.47 a	0.00	97.95 c	91.47 a	0.00	97.95 c	91.47 a	0.00
SMD	52.197	2.61	ND	39.789	2.61	ND	82.255	2.61	ND

RL: red light; BL: blue light; WL: white light; Total concentration: callus plus culture medium; ND: not determined; Reb-A: rebaudioside A; SMD: significant minimum difference. Means sharing the same letter in the columns of the same activator (factor) are not significantly different (Tukey's  $\alpha \leq 0.05$ ).

Table 2. Steviosides concentration in suspended calli of *Stevia rebaudiana* B. exposed to salicylic acid and methyl jasmonate.

Activator	Callus			Culture medium			Total amount		
	10 <sup>3</sup> ppm			10 <sup>3</sup> ppm			10 <sup>3</sup> ppm		
	Stevioside	Reb-A	Steviol	Stevioside	Reb-A	Steviol	Stevioside	Reb-A	Steviol
<b>SA</b>									
10 mM	4.33 d	17.95 b	0.00 a	0.00 e	3155.1 a	0.00	4.33 d	3173.1 a	0.00 a
100 mM	219.59 b	0.00 c	1.44 a	731.81 a	0.00 c	0.00	951.39 a	0.00 b	1.44 a
T2	390.87 a	0.00 c	0.00 a	331.68 c	0.00 c	0.00	722.56 b	0.00 b	0.00 a
T1	382.47 a	0.00 c	0.00 a	355.02 b	0.00 c	0.00	737.48 b	0.00 b	0.00 a
Leaf	97.95 c	91.47 a	0.00 a	97.95 d	91.47 b	0.00	97.95 c	91.47 b	0.00 a
SMD	82.93	2.46	2.81	14.43	90.97	ND	87.29	91.90	2.81
<b>MeJA</b>									
10 mM	358.06 a	0.00 c	0.00	263.25 b	0.00 b	0.00	621.31 a	0.00 c	0.00
100 mM	0.00 d	197.74 a	0.00	376.70 a	0.00 b	0.00	376.70 b	197.74 a	0.00
T3	304.33 b	0.00 c	0.00	316.05 ab	0.78 b	0.00	620.38 a	0.78 c	0.00
Leaf	97.95 c	91.47 b	0.00	97.95 c	91.47 a	0.00	97.95 c	91.47 b	0.00
SMD	21.148	16.72	ND	112.3	2.58	ND	108.27	16.75	ND

Total concentration: callus plus culture medium; SA: salicylic acid; MeJA: methyl jasmonate; ND: not determined; Reb-A: rebaudioside A; T1: absolute control, induction culture medium; T2: control with ethanol and without SA; T3: control without MeJA; SMD: significant minimum difference. Means sharing the same letter in the columns of the same activator (factor) are not significantly different (Tukey's  $\alpha \leq 0.05$ ).

Table 3. Steviosides concentration in suspended calli of *Stevia rebaudiana* B. exposed to different activator agents.

Activator	Callus			Culture medium			Total amount		
	10 <sup>3</sup> ppm			10 <sup>3</sup> ppm			10 <sup>3</sup> ppm		
	Stevioside	Reb-A	Steviol	Stevioside	Reb-A	Steviol	Stevioside	Reb-A	Steviol
<b>Medium</b>									
ATX	230.43 b	180.36 a	25.18 a	254.63 b	0.00 b	0.00	485.05 b	180.36 a	25.18 a
GR	170.93 c	168.68 b	21.92 a	164.53 c	0.57 b	0.00	335.45 c	169.25 a	21.92 a
T1	382.47 a	0.00 d	0.00 b	355.01 a	0.00 b	0.00	737.48 a	0.00 c	0.00 b
Leaf	97.95 d	91.47 c	0.00 b	97.95 d	91.47 a	0.00	97.95 d	91.47 b	0.00 b
SMD	19.836	10.63	13.37	19.06	2.68	ND	18.822	11.16	13.37
<b>SA y T°</b>									
SA/28 °C	335.07 a	0.00 b	22.55 a	439.77 a	1162.9 a	0.00	774.84 a	1162.9 a	22.55 a
T1	382.47 a	0.00 b	0.00 b	355.01 b	0.00 b	0.00	737.48 a	0.00 b	0.00 b
Leaf	97.95 b	91.47 a	0.00 b	97.95 c	91.47 b	0.00	97.95 b	91.47 b	0.00 b
SMD	52.159	2.61	3.51	37.035	861.10	ND	74.552	861.10	3.51

Total concentration: callus plus culture medium; ATX: antioxidants; GR: growth regulators; SA: salicylic acid 100 mM; ND: not determined; Reb-A: rebaudioside A; T1: absolute control, induction culture medium; SMD: significant minimum difference. Means sharing the same letter in the columns of the same activator (factor) are not significantly different (Tukey's  $\alpha \leq 0.05$ ).

Table 4. Comparison the means of the best treatments for each activator to induction of steviosides from suspension calli cultures of *Stevia rebaudiana*.

<b>Stevioside</b>		<b>Rebaudioside A</b>		<b>Steviol</b>	
Treatment	10 <sup>3</sup> ppm	Treatment	10 <sup>3</sup> ppm	Treatment	10 <sup>3</sup> ppm
<b>28 °C</b>	968.47 a	<b>SA 10</b>	3173.13 a	<b>ATX</b>	25.178 a
<b>SA 100</b>	951.40 a	<b>SA 100, 28 °C</b>	1162.94 b	<b>SA 100, 28 °C</b>	22.550 a
<b>SA 100, 28 °C</b>	774.84 b	<b>BL</b>	311.00 c	<b>GR</b>	21.920 a
<b>WL</b>	749.38 bc	<b>RL/BL</b>	309.31 c	<b>BL</b>	2.340 b
<b>T1</b>	737.48 bc	<b>RL</b>	301.31 c	<b>SA 100</b>	1.440 b
<b>MeJA 10</b>	621.31 cd	<b>MeJA 100</b>	197.75 c	<b>Leaf</b>	0.000 b
<b>ATX</b>	485.05 d	<b>ATX</b>	180.38 c		
<b>Leaf</b>	97.95 e	<b>GR</b>	169.25 c		
		<b>Leaf</b>	91.47 c		
<b>SMD</b>	137.42	<b>SMD</b>	604.73	<b>SMD</b>	12.702

SA 10: salicylic acid 10 mM; SA 100: salicylic acid 100 mM; MeJA 10: methyl jasmonate 10 mM; MeJA 100: methyl jasmonate 100 mM; ATX: antioxidants; GR: growth regulators; RL: red light; BL: blue light; WL: white light; T1: absolute control, induction culture medium; SMD: significant minimum difference. Means sharing the same letter in the columns of the same activator (factor) are not significantly different (Tukey's  $\alpha \leq 0.05$ ).

### **3.5 CONCLUSIONS**

The presence of stevioside, rebaudioside A and steviol in the calli of *S. rebaudiana* as well as the excretion of this compound into the culture medium are modified depending on the composition of the culture medium and certain environmental factors such as light and temperature. It was found that 100 mM of salicylic acid in the medium or being cultured at 28 °C promotes higher concentrations of stevioside in the calli. The greatest amount of rebaudioside A was found with 10 mM of salicylic acid in the medium. Antioxidants and growth regulators or the combination of 100 mM of salicylic acid and 28 °C stimulated the accumulation of steviol. Compounds such as salicylic acid, methyl jasmonate, antioxidants, growth regulators or the modulation of light and temperature conditions can be used to increase the production of stevioside, rebaudioside A, and steviol in *S. rebaudiana* calli.

### 3.6 REFERENCES

1. Gupta, P., Sharma, S. and Saxena, S. (2015) Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline and polyethylene glycol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 176, 863-874.
2. Ramírez-Mosqueda, M. A. and Iglesias-Andreu, L. G. (2016) Direct organogenesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni using thin cell layer (TCL) method. *Sugar Technology*. 8, 424-428.
3. Yücesan, B., Mohammed, A., Büyükgöçmen, R., Altug, C., Kavas, Ö., Gürel, S. and Gürel, E. (2016) *In vitro* and *ex vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni with high rebaudioside-A content - a commercial scale application. *Scientia Horticulturae*. 203, 20-28.
4. Durán, A. S., Rodríguez, N. M. P., Córdón, A. K. y Record, C. J. (2012) Estevia (*Stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico. *Revista Chilena de Nutrición*. 39, 203-206.
5. Jarma, O. A. (2008) Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe Colombiano. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 2, 109-120.
6. Jarma, O. A., Araméndiz, T. H. y Cleves, L. A. (2011) Estabilidad fenotípica y densidades de planta de genotipos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) en la región Caribe de Colombia. *Acta Agronómica*. 60, 165-175.

7. Jarma, O. A., Espitia, C. M. y Fischer, G. (2010) Síntesis de esteviósidos en estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Acta Biológica Colombiana. 15, 289-294.
8. Attaya, A. S. (2017) An efficient protocol of *Stevia rebaudiana* regeneration for large-scale production. Egyptian Journal of Agronomy. 39, 117-125.
9. Barrales-Cureño, H. J., Soto-Hernández, R. M., Ramos-Valdivia, A.C., Trejo-Téllez, L. I., Martínez-Vázquez, M., Ramírez-Guzmán, M. E., San-Miguel-Chávez, R., Luna-Palencia G.R. y López-Uptón, J. (2011) Extracción y cuantificación de taxoides por HPLC en hojas *in situ* y en callos inducidos *in vitro* de *Taxus globosa* Schltld. Spanish Journal of Rural Development. 2, 103-114.
10. Baldi, A. and Dixit, V. K. (2008) Enhanced artemisinin production by cell cultures of *Artemisia annua*. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy. 2, 341-348.
11. Goleniowski, M. and Trippi, V. S. (1999) Effect of growth medium composition on psilostachyionolides and altamisine production. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 56, 215-218.
12. Thengane, S. R., Kulkarni, D. K., Shrikhande, V. A., Joshi, S. P., Sonawane, K. B. and Krishnamurthy, K.V. (2003) Influence of medium composition on callus induction and camptothecin(s) accumulation in *Nothapodytes foetida*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 72, 247-251.
13. Striedner, J., Czygan, F. and Braunegg, G. (1991) Contributions to the biotechnological production of sweeteners from *Stevia rebaudiana* Bertoni: A method for the serial analysis of diterpene glycosides by HPLC. Acta Biotechnologica. 11, 495-499.

14. Bondarev, N. I., Nosov, A. M. and Kornienko, A. V. (1998) Effects of exogenous growth regulators on callusogenesis and growth of cultured cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Russian Journal of Plant Physiology. 45, 770-774.
15. Bondarev, N., Reshentnyak, O. and Nosov, A. (2001) Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Science. 161, 155-163.
16. Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M. and Sekar, T. (2010) Secondary metabolite production in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research. 45, 243-248.
17. Mathur, S. and Shekhawat, G. S. (2013) Establishment and characterization of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cell suspension culture: an *in vitro* approach for production of stevioside. Acta Physiologiae Plantarum. 35, 931-939.
18. Striedner, J., Gutjahr, E., Czygan, F. C. and Braunegg, G. (1991) Contributions to the biotechnological production of sweeteners from *Stevia rebaudiana* Bertoni. Accumulation of secondary metabolites by means of a precursor and by elicitation of cell cultures. Acta Biotechnologica. 5, 505:509.
19. Gupta, P., Sharma, S. and Saxena, S. (2014) Effect of salts (NaCl and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) on callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* for steviol glycoside production. Applied Biochemistry and Biotechnology. 172, 2894–2906.
20. Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15, 473-497.

21. Bondarev, N. I., Reshentnyak, O. V. and Nosov, A. M. (2002) Features of development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycoside. *Planta Medica*. 68, 759-762.
22. Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M. and Franco, C. (2002) Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*. 162, 459-468.
23. Ladygin, V. G., Bondarev, N. I., Semenova, G. A., Smolov, A. A., Reshetnyak, O. V. and Nosov, A. M. (2008) Chloroplast ultrastructure, photosynthetic apparatus activities and production of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* *in vivo* and *in vitro*. *Biologia Plantarum*. 52, 9-16.
24. Arias, Z. M., Angarita-Velásquez, M. J., Aguirre-Cardona, A. M., Restrepo-Flores, J. M. y Montoya-Vallejo, C. (2009) Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 62, 4881-4895.
25. Georgiev, M., Pavlov, A. and Ilieva, M. (2004) Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension: the effect of temperature. *Biotechnology Letters*. 26, 855-856.
26. Ramírez, J. G. (2011) Manual del programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región sur-sureste de México: trópico húmedo. Paquete tecnológico estevia (*Stevia rebaudiana*) establecimiento y mantenimiento. INIFAP. SAGARPA. México.

27. Hoopen, H. J. G., Vinke, J. L., Moreno, P. R. H., Verpoorte, R. and Heijnen, J. J. (2002) Influence of temperature on growth and ajmalicine production by *Catharanthus roseus* suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 30, 56-65.
28. Al-oubaidi, H. K. M. and Ameen, A. S. M. (2014) Increasing secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. using salicylic acid *in vitro*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 13, 1146-1155.
29. Dong, J., Wan, G. and Liang, Z. (2010) Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of Biotechnology*. 148, 99-104.
30. Loake, G. and Grant, M. (2007) Salicylic acid in plant defense - the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*. 10, 466-472.
31. Horváth, E., Szalai, G. and Janda, T. (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*. 26, 290-300.
32. Fu, C. X., Cheng, L. Q., Lv, X. F., Zhao, D. X. and Ma, F. (2006) Methyl jasmonate stimulates jaceosidin and hispidulin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 134, 89-96.
33. Suan, S. K., Bhatt, A. and Lai, K. C. (2011) Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of *Melastoma malabathricum* (Melastomaceae). *Revista de Biología Tropical*. 59, 597-606.

34. Eng, S. F. (2009) Jasmonatos: compuestos de alto valor para la agricultura. Parte 2. Vías de producción. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. 43, 3-9.
35. Davies, P. J. (2010) Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action. Third ed. Springer. Ithaca, NY, U.S.A. 830 p.
36. Röck-Okuyucu, B. (2016) Plant growth regulator effects on *in vitro* propagation and stevioside production in *Stevia rebaudiana* Bertoni. HortScience. 51, 1573-1580.
37. Ali, M. and Abbasi, B. H. (2014) Thidiazuron-induced changes in biomass parameters, total phenolic content, and antioxidant activity in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. Applied Biochemistry and Biotechnology. 172, 2363-2376.
38. Bota, C. and Deliu, C. (2015) Effect of plant growth regulators on the production of flavonoids by cell suspension cultures of *Digitalis lanata*. Farmacia. 63, 716-719.
39. Jaafari, N. and Hadavi, E. (2012) Growth and essential oil yield of Basil (*Ocimum basilicum* L.) as affected by foliar spray of citric acid and salicylic acid. Zeitschrift für Arznei- Gewürzpflanzen. 17, 80-83.
40. Martínez, M. S. J., Gómez, K. R., Posada, P. L., Barbón, R. R., Acosta, S. M., Reyes, V. M., Pérez, B. M., Torres, R. D., Pons, C. M., La O, C. M., Aguilera, C. A. y Tejeda, G. M. (2012) Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas in vitro de *Sorghum bicolor* para la formación de callos. Revista Colombiana de Biotecnología. 14, 101-110.
41. Herrera-Martínez, S. L., Mora-Herrera, M. E., García-Velasco, R., Gomora-Rasso, J. y Rogel-Millán, G. (2013) Efecto del ácido ascórbico sobre crecimiento, pigmentos

fotosintéticos y actividad peroxidasa de plantas de rosal. Terra Latinoamericana. 31, 193-199.

42. Malamy, J., Hennig, J. and Klessig, D. F. (1992) Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *The Plant Cell*. 4, 359-366.

43. Sedghi, M. and Gholi-Toluie, S. (2013) Influence of salicylic acid on the antimicrobial potential of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni, Asteraceae) leaf extracts against soybean seed-borne pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 12, 1035-1038.

## **CAPÍTULO IV. ÁCIDO SALICÍLICO EN LA PRODUCCIÓN DE ESTEVIÓSIDOS EN PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni CRECIDAS EN INVERNADERO**

### **4.1 RESUMEN**

Para elucidar si existe diferencia en la producción de esteviósido, rebaudiósido A y esteviol obtenidos en células cultivadas *in vitro* con lo obtenido de hojas de *S. rebaudiana*, se evaluó el efecto de ácido salicílico asperjado sobre hojas de plantas crecidas en invernadero y se comparó con la concentración obtenida de los cultivos de células en suspensión en presencia de AS como activador. Para esta evaluación se consideraron cuatro tratamientos, hojas intactas, hojas asperjadas con AS 10 mM, hojas asperjadas con etanol y células en suspensión con AS 10 mM. La cuantificación de los metabolitos secundarios se realizó con HPLC. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones. El AS asperjado en hojas disuadió la producción de los tres esteviósidos evaluados; el etanol inhibió la producción de esteviol y rebaudiósido A; y en hojas intactas y células cultivadas *in vitro* con AS la presencia de esteviol no se detectó. Asperjar las plantas de estevia con AS 10 mM impidió la producción de esteviósidos.

**Palabras clave:** hojas de estevia, ácido salicílico, esteviósidos.

## 4.2 INTRODUCCIÓN

El ácido salicílico es un regulador de crecimiento vegetal que actúa como mensajero ante situaciones de estrés, induce reacciones de hipersensibilidad y permite a las plantas resistir la presencia de organismos invasores. Este regulador puede inducir la actividad de la oxidasa alternativa en las mitocondrias, la cual está involucrada en el mecanismo de alivio al estrés, lo que resulta en incremento o reducción de la producción de metabolitos secundarios específicos de las plantas (Jaafari y Hadavi, 2012). También, participa en otros procesos fisiológicos y bioquímicos, que incrementan el rendimiento en algunas especies (Tucuch-Haas et al., 2017). Asimismo, afecta el funcionamiento estomático, la biosíntesis de etileno e invierte los efectos del ácido abscísico (abscisión) en las hojas. Además, mejora el contenido de clorofila y carotenoides, incrementa la tasa de fotosíntesis y modifica la actividad de algunas enzimas importantes (Hayat *et al.*, 2007).

En experimentos realizados con plantas ornamentales u hortícolas, de importante valor comercial, al aire libre o en invernadero se ha podido demostrar que el ácido salicílico, en concentraciones bajas, está relacionado con el incremento de la bioproductividad en plantas, como aumento de tamaño, número de flores, área foliar o del rendimiento sin perturbar la calidad de los frutos (Larqué-Saavedra y Martín-Mex, 2007).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del ácido salicílico sobre la concentración de esteviósidos producidos en las hojas de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni crecidas en invernadero.

### **4.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

Para analizar el efecto del AS sobre la concentración de esteviósido, rebaudiósido A y esteviol, producidos en las hojas de estevia, se realizó un experimento en los invernaderos del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados en enero de 2017. Se utilizaron plantas de *S. rebaudiana* Bertoni de aproximadamente un año de edad propagadas a partir de esquejes de una planta madre crecida en invernadero. Las plantas se colocaron en contenedores de 5 L de capacidad que contenían una mezcla de "peat moss" con tezontle (1:2). Las plantas fueron asperjadas con una solución etanólica de 10 mM de AS, y otras con etanol al 96 % (testigo 1); se realizó una aplicación al dosel de las plantas hasta punto de rocío, transcurridas 24 horas, las hojas se cosecharon y se liofilizaron.

#### **4.3.1 Extracción y cuantificación de esteviósidos**

Dos cientos miligramos de hojas liofilizadas y trituradas se depositaron en tubos de 15 mL, se les agregó etanol (2.5 mL) grado HPLC (Merck, Alemania) y se agitaron en agitador orbital (Heidolph Multi Reax, Alemania) durante tres horas; posteriormente, se centrifugaron a 4500 rpm y 10 min. Del sobrenadante, se tomaron 2.5 mL y se pasaron a través de una membrana de celulosa (apertura de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ) para cuantificar esteviósidos por HPLC siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo II de este manuscrito.

Las concentraciones de esteviósidos de los cultivos en suspensión con AS 10 mM fueron tomados del Capítulo III de este manuscrito.

### 4.3.2 Diseño experimental

Los cuatro tratamientos evaluados fueron, hojas asperjadas con AS 10 mM, hojas asperjadas con etanol al 96 %, hojas intactas y cultivos de células en suspensión con AS 10 mM. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones, una planta o un matraz representó una repetición. Los datos se analizaron estadísticamente realizando el análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas con la prueba Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ) en el paquete de Análisis Estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc.).

### 4.4 RESULTADOS

En las hojas asperjadas con 10 mM de AS no se detectó alguno de los tres esteviósidos cuantificados. La concentración de esteviósido fue significativamente menor en las hojas tratadas con etanol y los cultivos celulares (callo y medio de cultivo), 89 y 95.5 % menos respectivamente, que en las hojas intactas (Cuadro 1).

Las plantas expuestas a AS 10 mM y etanol no produjeron rebaudiósido A, en tanto que los cultivos celulares produjeron 34.6 veces más de este metabolito que las hojas no tratadas. Asimismo, ninguno de los tratamientos evaluados presentó esteviol en concentraciones detectables (Cuadro 1).

Bayraktar *et al.* (2016) utilizaron AS (6.9, 13.8 y 27.6 mM) como activador de esteviósidos *in vitro* de plantas de estevia; ellos observaron que las concentraciones menores indujeron mayor producción de esteviósidos. Por otra parte, Sedghi y Gholi-Tolue (2013) observaron incrementos de 8 a 18 % en la concentración de  $\alpha$ -cadinol, espatulenol, óxido

de cariofileno, salicilato de metilo y safranal en hojas de estevia asperjadas con 0.72 mM AS.

Cuadro 1. Contenido de esteviósidos en plantas de *S. rebaudiana* crecidas en invernadero, tratadas con ácido salicílico

Tratamiento	Contenido total (10 <sup>3</sup> ppm)		
	Esteviósido	Reb-A	Esteviol
Hojas intactas	15.67 a	14.64 b	0
Hojas con AS 10 mM	0.00 c	0.00 b	0
Hojas con etanol	1.72 b	0.00 b	0
Callo y medio de cultivo con AS 10 mM	0.69 bc	507.70 a	0
DMS	1.69	15.81	-

Reb-A: rebaudiósido A; AS: ácido salicílico; DMS: diferencia mínima significativa. Medias con la misma letra en una misma columna del metabolito secundario no son significativamente diferentes (Tukey  $\alpha \leq 0.05$ ).

Los resultados de este estudio pudieron deberse a varios factores, como la concentración de AS utilizada para asperjar las plantas de estevia, debido a que pudo ser superior a la dosis requerida, afectando procesos como el cierre de estomas y a su vez ocasionando la inhibición de la síntesis de esteviósidos (Malabadi *et al.*, 2008). Hayat *et al.* (2010) mencionan que la cutícula de las hojas puede actuar como barrera física del AS cuando se aplica superficialmente en las plantas, además el AS puede pasar más fácilmente a través de cutícula en su forma metilada (salicilato de metilo). Por otro lado, se ha

reportado también que altas concentraciones de AS causa estrés oxidativo, que la planta es incapaz de restaurar, llegando en ocasiones a causarle la muerte (Yalpani *et al.*, 1992).

#### **4.5 CONCLUSIÓN**

Asperjar las plantas de estevia con AS 10 mM y colectarlas 24 h después, inhibió la producción de esteviósidos. Por lo que se recomienda, realizar la colecta de las hojas asperjadas en periodos diferentes y probar con diferentes concentraciones de AS.

#### 4.6 LITERATURA CITADA

- Bayraktar M.; Naziri E.; Akgun I. H.; Karabey F.; Ilhan E.; Akyol B.; Bedir E. and Gurel A. 2016. Elicitor induced stevioside production, in vitro shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 127:289-300.
- Hayat S., Ali B. and Ahmad A. 2007. Salicylic acid: Biosynthesis, metabolism and physiological role in plants. In: Hayat S. and Ahmad A. (Eds). Salicylic Acid: A Plant Hormone. Springer, Dordrecht.
- Hayat Q., Hayat S., Irfan M. and Ahmad A. 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. Environmental and Experimental Botany. 68(1): 14-25.
- Jaafari N. and Hadavi E. 2012. Growth and essential oil yield of Basil (*Ocimum basilicum* L.) as affected by foliar spray of citric acid and salicylic acid. Journal of medicinal and spice plants. 17(2): 80-83.
- Malabadi R. B., Teixeira da Silva J. A. and Nataraja K. 2008. Salicylic acid induces somatic embryogenesis from mature trees of *Pinus roxburghii* (Chir pine) using TCL technology. Tree and forestry science and biotechnology. 2(1):34-39.

Larqué-Saavedra A. and Martin-Mex R. 2007. Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants. In: Hayat S. and Ahmad A. (Eds). Salicylic Acid: A Plant Hormone. Springer, Dordrecht.

Sedghi M. and Gholi-Toluie S. 2013. Influence of Salicylic Acid on the Antimicrobial Potential of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni, Asteraceae) Leaf Extracts against Soybean Seed-Borne Pathogens. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 12(6): 1035-1038.

Tucuch-Haas C., Alcántar-González G., Trejo-Téllez L. I., Volke-Haller H., Salinas-Moreno Y. y Larqué-Saavedra A. 2017. Efecto del ácido salicílico en el crecimiento, estatus nutrimental y rendimiento en maíz (*Zea mays*). Agrociencia. 51(7): 771-781.

Yalpani N., Balke N. O. and Schulz M. 1992. Induction of UDP-glucose-salicylic-acid glucosyltransferase in oat roots. Plant Physiology. 100: 1114-1119.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

Los explantes de hoja cultivados en medio con auxinas y citocininas en proporción 1:1 generaron callos friables.

La temperatura de incubación apropiada para incrementar en forma más homogénea y constante la biomasa celular, en medio de cultivo semisólido, es 28 °C.

La presencia de esteviósidos en los callos y su excreción al medio depende de la composición del medio de cultivo y factores ambientales, como luz y temperatura.

La concentración de rebaudiósido A es mayor cuando se incluye ácido salicílico 10 mM en el medio o cuando los callos se incuban a 28 °C.

Antioxidantes y reguladores de crecimiento, o la combinación de ácido salicílico 100 mM, y 28 °C estimulan la acumulación de esteviol.

Ácido salicílico, metil jasmonato, antioxidantes, reguladores de crecimiento o modulación de luz y temperatura puede usarse para incrementar la producción de esteviósido, rebaudiósido A y esteviol en callos de estevia.

La aplicación de ácido salicílico 10 mM a las plantas crecidas en invernadero inhibe la producción de esteviósido, rebaudiósido A y esteviol.