

Steviol glucosides production in micropropagated seedlings of *Stevia rebaudiana* elicited with methyl jasmonate

Producción de glucosidos de esteviol en plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* elicidadas con metil jasmonato

Mauro Montes-Palmeros^{1,2}, Itzel Vianney Alvarado-Orea^{1,2}, Patricia Pavón-Orozco², Edgar García-López^{1,3}, *Ariana Arlene Huerta-Heredia^{1,3}

¹Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales Instituto de Biotecnología, ²División de posgrado Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca, Mexico. ³Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, campus Coatzacoalcos, Ver., ³Catedrática CONACyT-UNPA, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca, México.

*aahuerta@conacyt.mx

ABSTRACT

Stevia rebaudiana is an herbaceous plant that produces steviol glycosides (SG), mainly stevioside and rebaudioside A, as secondary metabolites. These metabolites have become attractive due to their attributed sweetening and medicinal properties. A strategy to increase the secondary metabolites production *in vitro* culture is the use of elicitors. Elicitors may be classified as biotic, or abiotic. In this paper was evaluated three concentrations of methyl jasmonate (25, 50 and 100 μ), and two exposure times (1 and 5 days) on SG production and growth of micropropagated *Stevia rebaudiana* seedlings. Elicitor exposure during 1 day, increased SG production by 1.72-, 1.85- and 1.51-fold respectively, relative to untreated seedlings (11.98 mg / g), while the fifth day exposure increased 2.17-fold SG production with 25 μ as compared to (11.40 mg / g). Physical damage was more visible at 50 and 100 μ of MeJa, at the two exposure times evaluated respect to seedlings without elicitation.

Keywords: Methyl jasmonate, Rebaudioside A, Seedlings, *Stevia rebaudiana*.

RESUMEN

Stevia rebaudiana es una planta herbácea que produce glucósidos de esteviol (GE), principalmente esteviosido y rebaudiosido A, como metabolitos secundarios. Estos metabolitos han tomado un gran auge por las propiedades edulcorantes y medicinales que se le atribuyen. Una estrategia para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* es el uso de elicitores, estos pueden ser de dos tipos: bióticos o abióticos. En este trabajó se evaluaron tres concentraciones de metil jasmonato 25, 50 y 100 μ , en dos tiempos de exposición (1 y 5 días), sobre la producción de GE y el crecimiento de plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*. Al primer día de exposición al elicitor,

todas las concentraciones utilizadas incrementaron la producción GE (1.72, 1.85 y 1.51 veces) con respecto al control 11.98 mg/g, mientras que al quinto día solo se observó el incremento a una concentración de 25 μ (2.17 veces) con respecto al control (11.40 mg/g). A concentraciones de 50 y 100 μ de MeJa el daño físico fue más notable en los dos tiempos de exposición, a diferencia de 25 μ donde se observó el menor daño físico al tejido de las plántulas de *Stevia rebaudiana* comparadas con las plántulas sin elicitar.

Palabras clave: Metil jasmonato, Plántulas, Rebaudiosido A, *Stevia rebaudiana*.

1. INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana o comúnmente conocida como hoja miel es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia de las *Asteraceas*, ha sido utilizada por los indígenas Guaraníes del sur de Brasil y Paraguay como planta medicinal y endulzante. Las hojas acumulan hasta un 20% de glucósidos de esteviol (GE) en base a su peso seco, principalmente esteviosido (Est) y rebaudiosido A (Reb A), y en menor concentración esteviolbiosido, rebaudiosido B, C, D, F y dulcosido A (Ceuens y Geuns, 2013). Los GE son responsables de un sabor hasta 300 veces más dulce que la sacarosa (Geuns, 2003), además son capaces de reducir los niveles de glucosa en sangre (Shivanna *et al.*, 2013). Por otra parte el esteviol y sus derivados poseen capacidad citotóxica contra leucemia (línea celular HL60), cancer de pulmón (A549), estómago (AZ521) y mama en dos líneas celulares (SK-BR-3 y MCF-7) (Ukiya *et al.*, 2013; Paul *et al.*, 2012).

La elicitación es una técnica utilizada para inducir la expresión de genes asociados con enzimas responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios (MetS) de interés comercial o, para inducir resistencia en las plantas contra el ataque de patógenos y condiciones ambientales (Davis y Verpoorte, 2005; Namdeo, 2007; Baldi *et al.*, 2007). La aplicación exógena de jasmonatos (MeJa y ácido jasmónico) han demostrado la capacidad de estimular la biosíntesis de compuestos derivados del metabolismo secundario (alcaloides, terpenoides, fenoles, fitoalexinas, cumarinas y taxanos) en muchas especies de plantas. Además, dichas moléculas, están implicadas en la regulación celular de procesos de desarrollo como la germinación de semillas, el crecimiento de raíces, fertilidad, maduración de frutos y la senescencia (Wasternack y Parthier, 1997). Estas moléculas han sido ampliamente utilizadas como elicitors por su eficacia activando las rutas del metabolismo secundario (Van der Fits y Memelink, 2000). Algunos estudios relacionados con el efecto de MeJa en el metabolismo secundario se encuentran: la adición de 20 μ de MeJa aumentó la producción de diterpenos en brotes de *Salvia officinalis* L. (Grzegorkczyk y Wisokinska, 2009); en brotes jóvenes de abeto rojo, la adición de 1×10^3 , 1×10^4 y 1×10^5 μ de MeJa incrementó la acumulación de diterpenos (Martin *et al.*, 2002); de igual forma, en células de *Ocinum santum* expuestas a 25 y 50 μ M de MeJa se observó aumento en la producción de terpenos (Mathew y Sankar, 2014). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la adición de MeJa sobre la producción de GE en plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Establecimiento del cultivo

El cultivo de plántulas de *Stevia rebaudiana* se estableció en el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales del Área de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Tuxtepec Oaxaca. Las plántulas se mantuvieron en medios MS suplementado con 2% p/v de sacarosa y 0.5mg/L de ácido indolbutírico, utilizando un fotoperiodo de 16-8 h a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2 Tratamiento de elicitación

2.2.1 Preparación de MeJa

El MeJa (Sigma Aldrich) fue disuelto en etanol y esterilizado con microfiltros de nylon de $0.45 \mu\text{m}$ previo a su uso.

2.2.2 Condiciones de elicitación

La elicitación se realizó a los 45 días después del enraizamiento de las plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*. El diseño experimental establecido fue un factorial general con 2 factores: la concentración de MeJa (4 niveles, 0, 25, 50 y $100 \mu\text{M}$) y el tiempo de exposición (dos niveles, 1 y 5 d). El experimento se realizó por triplicado.

2.3 Extracción y cuantificación de GE

Las plántulas de *Stevia rebaudiana* (hoja y tallo) se secaron en una estufa a 70°C , posteriormente se realizó una extracción hidroalcohólica al 80% Etanol (v/v). Durante la extracción se conservó una proporción de 10% (p/v) biomasa/solvente (Bondarev, 2001). El extracto obtenido se centrifugó a 10 000 rpm por 5min y se concentró en una estufa a 70°C . La muestra se resuspendió en acetonitrilo:agua (70:30) previo a cuantificarse por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Perkin Elmer), utilizando una columna C-18 fase reversa (Dey *et al.*, 2013). La identificación de GE se efectuó comparando el espectro de absorción UV y tiempo de retención con los estándares de Reb A (1432-Sigma Aldrich) y Est (S3572-Sigma Aldrich). La concentración de GE se calcularon en base a la curva de calibración de los estándares mencionados previamente.

3. RESULTADOS

La adición de 25, 50 y $100 \mu\text{M}$ de MeJa al primer día de exposición incrementó la producción de GE en 1.72, 1.85 y 1.51 veces respectivamente, comparadas con el control 11.98 mg/g (**Fig. 1a**). Se observó que al quinto día de exposición del elicitor, la concentración de $25 \mu\text{M}$ incrementó 2.17 veces la producción de GE, con respecto al control 11.40 mg/g; mientras que la adición de 50 y $100 \mu\text{M}$ de MeJa no tuvo efecto en la producción de estos compuestos (**Fig. 1a**). Las plantas elicidadas no presentaron diferencia significativa en la biomasa (**Fig. 1b**). Al primer día de elicitación con MeJa las plántulas expuestas a las tres concentraciones no presentaron daños físicos visibles (**Fig. 2b, c y d**), mientras que al quinto día de exposición, se observó que con $25 \mu\text{M}$ de MeJa se presentó el

menor daño físico (**Fig. 2e**) a diferencia de 50 y 100 μ de MeJa (**Fig. 2f y g**), que presentaron daño físico.

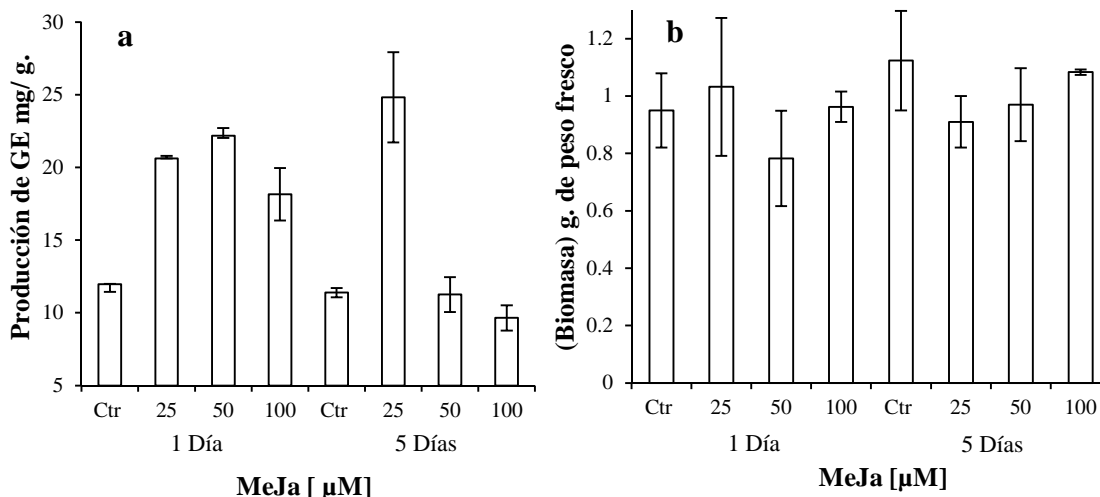


Fig. 1. Efecto de la adición de 25, 50 y 100 μ de MeJa. a) Producción de GE y b) Crecimiento (producción de biomasa).

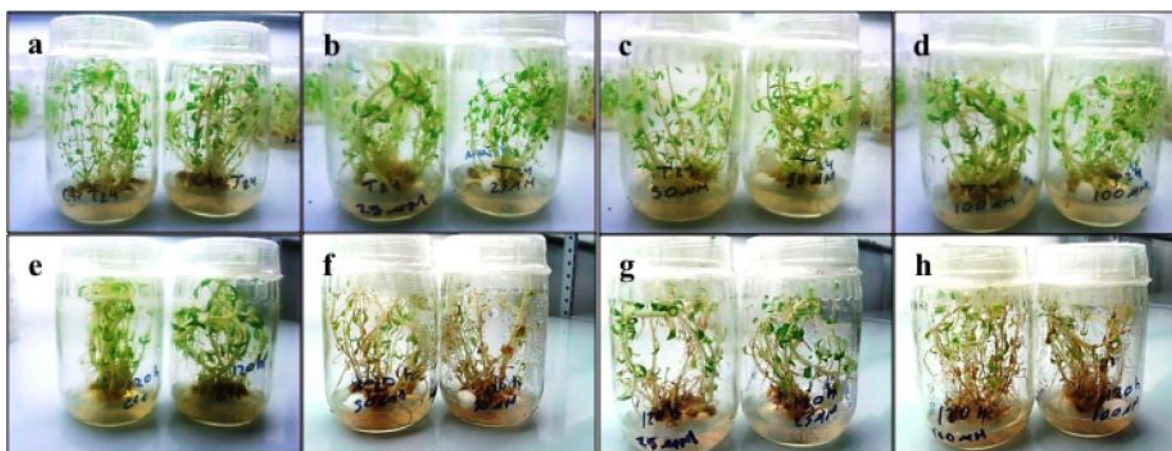


Fig. 2. Respuesta fisiológica de plántulas elicidadas de *Stevia rebaudiana*. Primer día: a) control, b) 25 μ M, c) 50 μ M y d) 100 μ M. Quinto día: e) control, f) 25 μ M, g) 50 μ M y h) 100 μ M.

4. DISCUSIONES

En diferentes estudios se ha evaluado al MeJa como un elicitor para incrementar la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas (Zhao *et al.*, 2005). Kumar *et al.*, en 2012, evaluaron la concentración de 100 μ M de MeJa a un tiempo de exposición de 2, 4, 6 h en hojas del meristemo apical de plantas de *Stevia rebaudiana* con 6 meses de edad. Ellos observaron que la adición de MeJa disminuyó la expresión de los 15 genes relacionados con la biosíntesis de GE, concluyendo que por tanto no incrementaría la producción de GE. Mientras que Grzegorkczyk y Wisokinska (2009), evaluaron tres concentraciones de MeJa (20, 50 y 100 μ) y 4 tiempos de exposición (1, 3, 5 y 7 días) en brotes de *Salvia*

officinalis L de 14 días de edad, obtuvieron la máxima producción de diterpenos (carnosol y ácido carnósico) a los tres días de exposición a 20 μ de MeJa. Por otro lado Kang *et al.*, (2004) obtuvieron resultados similares en cultivos de raíces de *Scolopia perviflora* de dos semanas, donde observaron la máxima producción de escopolamina con 1000 μ M de MeJa a las 12 horas de exposición, mientras que 100 y 1000 μ M incrementaron la producción de hiosciamina después de 24 horas de exposición al elicitor. Sin embargo, la viabilidad del cultivo depende de la concentración y el tiempo de exposición del elicitor, la adición de 1000 y 2000 μ M de MeJa inhibió el crecimiento de raíces de *Scolopia perviflora* (Kang *et al.*, 2004), y en brotes de *Salvia perviflora* la adición de 50 y 100 μ M después de 5 días de exposición disminuyó significativamente la producción de diterpenos. En este trabajo, se evaluaron 3 concentraciones de MeJa (25, 50 y 100 μ), todas las concentraciones incrementaron el contenido total de GE en el primer día de estrés, sin embargo 25 μ mantuvo dicho efecto al quinto día de estrés (**Fig. 1a**). Se puede concluir que la mejor concentración para incrementar la producción de GE en plántulas micropropagas de *S. rebaudiana* es 25 μ , debido a que además de incrementar la producción de GE, se observó que a esta concentración se presenta el menor daño físico a las plántulas.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada 571244 y a los proyectos 3212 Cátedra 183958, CB 183958 e INFRA 255514. A Estefania del Carmen Urdiana Arteaga por su apoyo técnico en el análisis y cuantificación de muestras en el HPLC.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Baldi, A., Bisaria, V. S., & Srivastava, A. K. (2007). Biotechnological approaches for the production of some promising plant-based chemotherapeutics. *In: Medicinal Plant Biotechnology. From Basic Research to Industrial Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 117-156.
- Bondarev, N., Reshetnyak, O., & Nosov, A. (2001). Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Science*, 161(1), 155-163.
- Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.

- Dey, A., Kundu, S., Bandyopadhyay, A., & Bhattacharjee, A. (2013). Efficient micropropagation and chlorocholine chloride induced stevioside production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Comptes Rendus Biologies*, 336(1), 17-28.
- Geuns, (2003). Cloning and heterologous expression of early genes in gibberellins and steviol biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Can. J. Bot.* 81(5), 517-522.
- Grzegorzcyk, I. & Wysoki ska, H. (2009). The effect of methyl jasmonate on production of antioxidant compounds in shoot cultures of *Salvia officinalis* L. *Herba Pol*, 55, 238-243.
- Kang, S. M., Jung, H. Y., Kang, Y. M., Yun, D. J., Bahk, J. D., Yang, J. K., & Choi, M. S. (2004). Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science*, 166(3), 745-751.
- Kumar, H., Kaul, K., Bajpai-Gupta, S., Kaul, V. K., & Kumar, S. (2012). A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene*, 492(1), 276-284.
- Martin, D., Tholl, D., Gershenzon, J., & Bohlmann, J. (2002). Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant physiology*, 129 (3), 1003-1018.
- Mathew, R. & Sankar, P. D. (2014). Comparison of major secondary metabolites quantified in elicited cell cultures, non-elicited cell cultures, callus cultures and field grown plants of *Ocimum*. *Int J Pharmacy and Pharmaceu Sci*, 6, 102-106.
- Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 69-79.
- Paul, S., Sengupta, S., Bandyopadhyay, T. K., & Bhattacharyya, A. (2012). Stevioside induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Nutrition and Cancer*, 64(7), 1087-1094.
- Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F., & Kaul, V. K. (2013). Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Complications*, 27(2), 103-113.
- Ukiya, M., Sawada, S., Kikuchi, T., Kushi, Y., Fukatsu, M., & Akihisa, T. (2013). Cytotoxic and Apoptosis-Inducing Activities of Steviol and Isosteviol Derivatives against Human Cancer Cell Lines. *Chemistry & biodiversity*, 10(2), 177-188.
- Van der Fits, L., & Memelink, J. (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*, 289(5477), 295-297.

Wasternack, C., & Parthier, B. (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in plant Science*, 2(8), 302-307.

Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23(4), 283-333.