

Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* y análisis preliminar de esteviósidos

Daniel Aguilar-Jiménez^{1§}
José Luis Rodríguez-De la O²
Jesús Piña-Guillén¹
Virginia Silva Díaz¹

¹Programa Educativo de Agrobiotecnología-Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros. Prolongación Reforma núm. 164, Barrio de Santiago Mihucán, Izúcar de Matamoros, Puebla, México. CP. 74420. (fejepigu@hotmail.com; vsilva@utim.edu.mx). ²Departamento de Fitotecnia-Área de Genética-Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. (jlro8@msn.com).

§Autor para correspondencia: yolot777@hotmail.com.

Resumen

La planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni no ha sido evaluada con el enfoque científico sobre su posible propagación *in vitro* en el estado de Puebla. Por ello, en junio de 2016 se evaluaron diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (0.0, 0.3, 0.5, 0.7 y 1 mg L⁻¹) y tres condiciones de medio de cultivo para su micropropagación. Se realizó un análisis preliminar sobre la presencia de esteviósidos en el medio de cultivo después de obtener y multiplicar brotes de *Stevia rebaudiana* a partir de segmentos nodales sumergidos en el mismo por ocho semanas. Para el análisis de los datos sobre número y longitud de brotes *in vitro* se realizó un análisis de varianza completamente al azar y se empleó la prueba de Tukey ($p= 0.05$) para determinar diferencias entre las medias de cada tratamiento mediante Minitab 16, donde la concentración de 0.5 mg L⁻¹ de 6-Bencilaminopurina fue el tratamiento que originó mayor número de brotes *in vitro* (3.6 ± 1.4) y en cuanto al tipo de soporte, el medio de cultivo sin soporte (líquido) fue el mejor originando hasta 21.45 nuevos brotes. El análisis preliminar de esteviósidos se realizó mediante cromatografía en capa delgada observando la posible presencia de dichos metabolitos en el medio de cultivo.

Palabras clave: cromatografía, explante, micropropagación.

Recibido: enero de 2019

Aceptado: marzo de 2019

La planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta herbácea perteneciente a la familia Compositae cuya importancia es el contenido de edulcorante natural que produce (estevisido) y el cual es 300 veces más dulce que el azúcar que se obtiene a partir de la caña de azúcar (Espinal *et al.*, 2006). Por ello, se ha buscado su propagación masiva, una forma es mediante semillas, sin embargo, tiene baja germinación al perder rápidamente su viabilidad además de presentar mucha variabilidad genética y fenotípica ya que es una planta alógama (Tamura *et al.*, 1984). Una alternativa de propagación masiva es mediante el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para conservar las características genéticas y fenotípicas de una planta seleccionada (Pierik, 1990).

Para dicho fin se han realizado varios trabajos *in vitro* con resultados diferentes como los de Taware *et al.* (2010); Arpita *et al.* (2011); Suárez y Quintero (2014); Vázquez *et al.* (2014); Martínez *et al.* (2016); Rock-Okuyuku *et al.* (2016) e incluso sometida a sistemas de inmersión temporal (Rosales *et al.*, 2018), sistema que brinda ventaja de no prescindir de agar como agente gelificante ya que el empleo incrementa costos de producción bajo el sistema convencional de cultivo de tejidos vegetales.

También se ha identificado la presencia de estevisidos en plantas obtenidas *in vitro* (Bondarev *et al.*, 2003; Bravo, 2009; Bondarev *et al.*, 2001; Vázquez *et al.*, 2014; Magangana *et al.*, 2018) que aseguren la calidad del material micropropagado. Sin embargo, no se ha investigado que el material vegetal de *Stevia rebaudiana* pueda biosintetizar los metabolitos edulcorantes *in vitro* y estos puedan ser liberados al medio de cultivo líquido como consecuencia de estar en contacto con el material vegetal (maceración), esto abriría una oportunidad de biosintetizarlos *in vitro* a mayor escala directamente en sistemas de biorreactores para micropropagación.

Con base a ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración de 6-Bencilaminopurina y tipo de soporte en el medio de cultivo que favorezcan la formación de brotes a partir de segmentos nodales de *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro* para la detección preliminar de estevisidos en el medio de cultivo.

Material vegetal

La presente investigación se realizó con segmentos nodales de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de plantas proporcionadas por productores de Izúcar de Matamoros, Puebla. El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biotecnología Área de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales *in vitro* del programa educativo de Agrobiotecnología de la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros. Los explantes se desinfectaron mediante una secuencia con etanol 70% más una solución de hipoclorito de sodio 15% (Cloralex[®]) por 15 min y enjuagando tres veces con agua destilada estéril.

Efecto de 6-Bencilaminopurina en la formación y longitud de brotes

Para evaluar dicha respuesta se empleó el medio de cultivo que preparado con las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) 100%, suplementado con mio-inositol 100 mg L⁻¹, tiamina-HCl 0.4 mg L⁻¹, 30 g L⁻¹ de sacarosa, adicionando diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (0, 0.3, 0.5, 0.7 y 1 mg L⁻¹), más 7 g L⁻¹ de agar y ajustando la solución final de los tratamientos a un pH de 5.7 ± 0.01. Los segmentos de tallo con dos yemas axilares se cortaron a 2 cm aproximadamente para establecer un segmento en cada tubo de ensaye. Los cultivos *in vitro* se colocaron en incubación durante ocho semanas en condiciones de 24 h con luz artificial mediante lámparas de luz blanca y a una temperatura de 26 ± 2 °C en el área de incubación.

Soporte del medio de cultivo

Con base al tratamiento que originó mejor respuesta para la formación de brotes *in vitro* con ayuda de regulador de crecimiento (0.5 mg L^{-1} de 6-Bencilaminopurina), se optó por comparar el efecto de dicho tratamiento mediante tres condiciones: uno gelificado con agar 7 g L^{-1} , otro en forma líquida incorporando algodón y finalmente en forma líquida sin ningún soporte para determinar si el tipo de soporte en el medio de cultivo tenía algún efecto sobre la formación y longitud de brotes *in vitro*. Los cultivos se incubaron durante ocho semanas en condiciones similares que en el experimento anterior.

Análisis preliminar de esteviósidos

Para ello se realizó una cromatografía en capa delgada (CCD) mediante placas de silicagel (TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 25 Aluminium sheets 20 x 20 cm) de 5 x 3 cm, donde se colocó una muestra de esteviósidos a partir de un endulzante de *Stevia* 100% natural (ebiem®). Otra muestra fue medio de cultivo líquido concentrado mediante vapor de agua en donde se micropropagó *Stevia rebaudiana* Bertoni, estando ahí por ocho semanas simulando una maceración, finalmente una muestra a partir de azúcar de caña para evitar confusiones si las bandas reveladas corresponden a steviósidos o a éste compuesto ya que fue incorporado al medio de cultivo. Después de eluir la placa cromatográfica con metanol:acetato de etilo (7:3), ésta se reveló químicamente utilizando ácido fosfomolibdico (Lenis *et al.*, 2007) con ayuda de una parrilla de calentamiento para la visualización de los compuestos.

Análisis de datos

Para la obtención de datos de respuesta *in vitro* se consideraron 10 repeticiones por tratamiento tomando un tubo de ensaye como unidad experimental con un explante cada uno y registrando las observaciones cada semana durante 8 semanas. Los datos se sometieron a análisis de varianza y se aplicó la prueba de Tukey ($p= 0.05$) para definir la diferencia entre los efectos medios de los tratamientos. El paquete estadístico empleado fue Minitab 16.

Efecto de 6-Bencilaminopurina en la formación y longitud de brotes

La mejor activación de brotes *in vitro* a partir de segmentos nodales en *Stevia rebaudiana* Bertoni estuvo determinada por la concentración de 0.5 mg L^{-1} de 6-Bencilaminopurina (BAP) como regulador de crecimiento vegetal de manera estadísticamente significativa (Tukey, $p= 0.05$) (Figura 1A) a los 30 días de cultivo *in vitro*; no obstante, ocurrió el desarrollo de brotes en los explantes en todos los tratamientos desde la primera semana de cultivo. Además, se pudo apreciar que las respuestas para las variables: formación y longitud de brotes están fuertemente correlacionadas (-0.856) inversamente de acuerdo a la concentración de BAP y donde a partir de una concentración de 0.3 mg L^{-1} de BAP la longitud de los brotes disminuye posiblemente a consecuencia de su efecto en la neoformación de brotes (Cuadro 1). Sin embargo, a partir de la concentración 0.7 mg L^{-1} de BAP se vio afectada tanto la longitud como el número de brotes formados llegando a causar daños severos con aspecto quemado con 1 mg L^{-1} de BAP e incluso la muerte de la mayoría de brotes después de 45 días de cultivo *in vitro* (Figura 1).

Cuadro 1. Respuestas organogénicas *in vitro* a partir de segmentos nodales en *Stevia rebaudiana* Bertoni en medio MS 100% y en diferentes concentraciones de BAP.

Tratamientos	Variables	
	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)
0 mg L ⁻¹	1 ±0 b	7.8 ±1.2 a
0.3 mg L ⁻¹	1 ±0.15 b	6.59 ±1.41 ab
0.5 mg L ⁻¹	3.6 ±1.4 a	4.52 ±1.08 b
0.7 mg L ⁻¹	3.2 ±0.8 a	5.12 ±0.88 b
1 mg L ⁻¹	2.4 ±0.46 a	4.42 ±2.18 ab

Respuestas de segmentos nodales de *Stevia rebaudiana* Bertoni por tratamiento. Los tratamientos que tienen la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p=0.05$).



Figura 1. Respuestas organogénicas *in vitro* a partir de segmentos de tallo de *Stevia rebaudiana* Bertoni. A) brotes obtenidos con 0.3 mg L⁻¹ de BAP; B) brotes obtenidos con 0.5 mg L⁻¹ de BAP y C) apariencia de brotes obtenidos con 1 mg L⁻¹ de PAB después de 45 días de cultivo *in vitro*.

Resultados ligeramente inferiores a lo publicado por Suarez y Quintero (2014), pues ellos reportan 5.5 nuevos brotes a partir de segmentos nodales con 2 mg L⁻¹ y en esta investigación se obtuvieron 3.6 ±1.4 brotes nuevos por explante con 0.5 mg L⁻¹ y conforme aumentó la concentración de BAP, el número de brotes disminuyó a 2.4 ±0.46. Sin embargo, son resultados superiores a lo publicado por Vázquez *et al.* (2014) quienes reportan 2.68 brotes por explante empleando cinetina (1.3 mg L⁻¹) como la mejor fitohormona en comparación a 6-Benciladenina (BA) 4 mg L⁻¹ más AIA 0.3 mg L⁻¹ obteniendo 2.08 brotes por explante, respuesta similar a la obtenida en el presente trabajo de investigación (2.4 brotes por explante) con 1 mg L⁻¹ de BAP, indicando que los resultados pueden variar de acuerdo al genotipo de la especie o al tipo y combinación de reguladores de crecimiento (Vázquez *et al.*, 2014; Rock-Okuyuku *et al.*, 2016).

También, Vázquez *et al.* (2014) reportan el empleo de BAP en 0.5 y 0.8 mg L⁻¹ obteniendo 1.4 y 1.92 brotes por explante respectivamente, respuestas inferiores a las logradas en *Stevia rebaudiana* Bertoni con 0.5 y 0.7 mg L⁻¹ (Figura 1A). Por otra parte, es importante comentar que Suarez y Quintero (2014) emplearon un medio de cultivo MS al 50% de su concentración, lo cual pudo haber sido un punto a favor para expresar dicha respuesta. Sin embargo, para la variable longitud de brotes los resultados son similares a lo que mencionan Suárez y Quintero (2014) ya que también reportan al tratamiento control o sin fitohormonas como el tratamiento superior estadísticamente a los tratamientos con BAP para dicha variable. De igual forma, los mismos autores mencionan que

a mayor concentración de BAP el número de hojas disminuyó, pero el tratamiento con 1 mg L⁻¹ no redujo el número de hojas, sino que causó un aspecto quemado posiblemente por la concentración del medio MS al 100% que se empleó para esta investigación.

En otro caso, los resultados obtenidos en el presente trabajo son superiores con 0.5 mg L⁻¹ de BAP (Cuadro 1) a los resultados por Martínez *et al.* (2016), quienes mencionan hasta 3 brotes con 0.5 mg L⁻¹ de BAP +0.2 mg L⁻¹ de AIB a partir de ápices, pero cuando emplearon segmentos nodales hubo una disminución del número de brotes en los tratamientos con reguladores de crecimiento respecto al control, el cual formó 1.93 brotes por segmento nodal siendo estadísticamente superior (LSD $p < 0.05$) a los demás tratamientos, contrario a lo obtenido en el presente trabajo, donde la formación de nuevos brotes fue de 1 ±0 en el tratamiento control (Cuadro 1), lo que sugiere, que para cada trabajo de cultivo de tejidos vegetales, así sea la misma especie, debe de estudiarse su comportamiento morfogénico *in vitro* antes de iniciar un escalamiento comercial.

Soprote del medio de cultivo

El mejor tratamiento para obtener mayor número de brotes fue el medio líquido sin algún soporte con 21.45 brotes por explante nodal siendo estadísticamente significativa dicha respuesta (Tukey, $p = 0.05$) en comparación con los otros dos tratamientos (Cuadro 2). Los brotes en el medio de cultivo gelificado mostraron la misma respuesta de daño en hojas y brotes después de 45 días de cultivo *in vitro*. En el medio de cultivo líquido con algodón, como medio de soporte, el daño fue específicamente en hojas y no en tallo, siendo el medio líquido sin soporte el mejor tratamiento para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de segmentos nodales sin causar daño en hojas ni en tallo; al contrario, los brotes mostraron un color verde intenso.

Cuadro 2. Respuestas organogénicas *in vitro* a partir de segmentos nodales en *Stevia rebaudiana* Bertoni en medio MS 100% y en diferentes soportes inertes.

Tratamientos	Variables	
	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)
Medio líquido	21.45 ±1.55 a	3.88 ±0.62 a
Agar-agar	4.15 ±1.15 c	4.25 ±1.75 a
Algodón	10.68 ±2.32 b	5.58 ±1.42 a

Respuestas de segmentos nodales de *Stevia rebaudiana* Bertoni por tratamiento. Los tratamientos que tienen la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p = 0.05$).

Al emplear un medio de cultivo líquido y sin ningún soporte, el número de brotes obtenidos es superior ya que los explantes están en contacto directo con el medio de cultivo y esto permite mayor efectividad en la toma de nutrientes por los tejidos (Watt, 2012). A pesar de, el número de brotes obtenidos (21.45 ± 1.55) por segmento nodal aún es inferior a lo publicado por Parvatam *et al.* (2010) quienes obtuvieron 28 ±1 brotes por explante; sin embargo, emplearon 1 mg L⁻¹ (4.44 μM) de BA +0.15 mg L⁻¹ (0.8 μM) de ANA en un medio de cultivo B5. No obstante, Parvatam *et al.* (2010), obtuvieron 6.66 ±0.57 brotes al emplear las mismas fitohormonas y sus concentraciones en un medio de cultivo MS. Esto indica que el número de brotes (21.45 ±1.55) por segmento nodal de *Stevia rebaudiana* Bertoni puede incrementarse al combinar BAP con otras fitohormonas (auxinas) y para ello deben estudiarse diferentes concentraciones y combinaciones para aumentar el número de brotes en medio MS (Martínez *et al.*, 2016; Rock-Okuyuku *et al.*, 2016).

Análisis preliminar de esteviósidos

La revelación de la placa cromatográfica muestra que es posible obtener esteviósidos mediante el cultivo de segmentos de tallo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* como herramienta biotecnológica. Además, parece que estos metabolitos pueden ser liberados al medio de cultivo líquido según lo observado en la placa cromatográfica en la que coinciden bandas entre la muestra obtenida del medio de cultivo donde se micropropagó *Stevia rebaudiana* Bertoni con la muestra comercial (ebiem®) (Figura 2: $R_f= 0.52$, $R_f= 0.51$). Asimismo, se pueden apreciar las bandas en color más oscuro que son las que corresponden a azúcar de caña incluida en el medio de cultivo líquido, como fuente de carbono y energía, pero con un R_f menor ($R_f= 0.42$) al R_f (0.52) de la muestra comercial de esteviósidos (ebiem®) (Figura 2). Lo que confirma que la marca encerrada en círculo de color rojo (Figura 2: $R_f= 0.51$), posiblemente puede tratarse de esteviósidos liberados en el medio de cultivo.

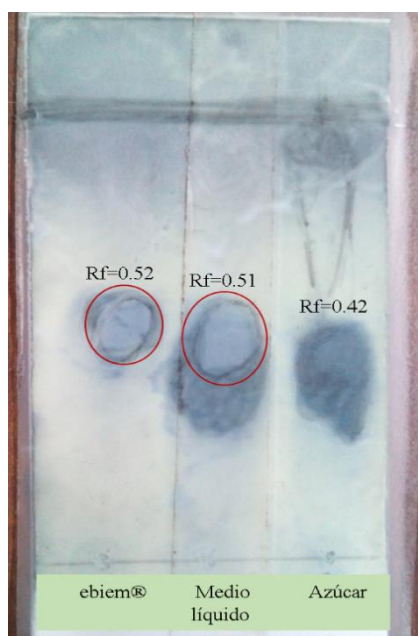


Figura 2. Placa cromatográfica (CCD) eluida con metanol:acetato de etilo (7:3).

Por lo tanto, los esteviósidos pueden ser biosintetizados *in vitro* y liberarse al medio de cultivo líquido como respuesta a algún tipo de estrés, ya que la síntesis de esteviósidos suele iniciarse en etapas muy tempranas de desarrollo de las plantas y variar su concentración por las condiciones ambientales (Bondarev *et al.*, 2003). Resultados parecidos son mencionados por Parvatam *et al.* (2010); sin embargo, ellos analizaron hojas de plantas obtenidas *in vitro* y no el medio de cultivo. De la misma forma, Vázquez *et al.* (2014) reportan la síntesis de esteviósidos en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni propagadas *in vitro*, tanto en plantas micropropagadas y aclimatadas en invernadero como en plantas directamente extraídas bajo condiciones *in vitro*. Con base a ello, puede ser que este tipo de proyectos puedan escalarse a nivel de biorreactores para la obtención de esteviósidos de forma comercial una vez estudiadas y ajustadas las variables que intervengan directamente en el proceso, como lo demostró Magangana *et al.* (2018).

Conclusiones

Se logró el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de brotes de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de segmentos nodales. Asimismo, se identificó la mejor concentración y medio de cultivo que incrementan la formación de brotes. Por otra parte, se consiguió realizar un análisis preliminar sobre la presencia de esteviósidos mediante cromatografía en capa delgada a partir del medio de cultivo líquido donde se micropropagaron brotes de *Stevia rebaudiana* Bertoni dando resultados aparentemente positivos sobre la presencia de esteviósidos en dichas condiciones.

Literatura citada

- Arpita, D.; Gantait, S. and Mandal N. 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. Int. J. Agri. Res. 6(1):40-48.
- Bondarev, N.; Reshetnyak, O. and Nosov, A. 2001. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Sci. 161(1):155-163.
- Bondarev, N.; Reshetnyak, O. and Nosov, A. 2003. Effect of nutrient media composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. Plant Sci. 165(4):845-850.
- Bravo, M.; Ale, N.; Rivera, D.; Huamán, J.; Delmás, D.; Rodríguez, M.; Polo, M. y Bautista, M. 2009. Caracterización química de la *Stevia rebaudiana*. Rev. Per. Quim. Ing. Quim. 12(2):5-8.
- Espinal, D. R. D.; Valle D. W.; Cifuentes E. y Ramia, N. E. 2006. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. Ceiba. 47(1-2):11-18.
- Lenis, V. L.; Benítez, B. R.; Peña, S. E. y Chito, T. D. 2007. Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Bostrychia calliptera*. Scientia Et Technica. 13(33):97-102.
- Magangana, T. P.; Stander, M. A. and Makunga, N. P. 2018. Effect of nitrogen and phosphate on *in vitro* growth and metabolite profiles of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae). Plant Cell Tissue Organ Culture. 134(1):141-151.
- Martínez, R. D.; Urrea, A.; Jiménez E. y Atehortua, L. 2016. Estrategia para la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Biotecnol. Veg. 16(3):131-142.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15(3):473-497.
- Parvatam, G.; Kryshnaswamy, S. S.; Akula, R. and Gokare, A. R. 2010. Rapid clonal propagation and stevioside profiles of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Inter. J. Plant Develop. Biol. 4(1):47-52.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Trad. Ayerbe, M. Sagasta. 3 (Ed.). Madrid, España, Mundi-Prensa. 325 p.
- Rock, O. B.; Bayraktar, M.; Akgun, I. and Gurel, A. 2016. Plant growth regulator effects on *in vitro* propagation and stevioside production in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Hort Sci. 51(12):1573-1580.
- Rosales, C.; Brenes, J.; Salas, K.; Arce-Solano, S. and Abdelnour-Esquivel, A. 2018. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* in temporary immersion systems as an alternative horticultural production method. Rev. Chapingo Ser. Hortic. 24(1):69-84.

- Suarez, I. E. y Quintero, I. R. 2014. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural a través de explantes con meristemas pre-existentes. Rev. Colomb. Biotecnol. 16(1):29-33.
- Tamura, Y.; Nakamura, S.; Fukui, H. and Tabata, M. 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by Stem-tips culture. Plant Cell Reports Japon. 3(5):183-185.
- Taware, A. S.; Mukadam, D. S.; Chavan A. M. and Taware, S. D. 2010. Comparative studies of *in vitro* and *in vivo* grown plants and callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Int. J. Integr. Biol. 9(1):10-15.
- Vázquez, B. L.; Robledo, P. A.; Muratalla, L. A. and Conde, M. V. 2014. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y detección de steviósidos. Bioagro. 26(1):49-56.
- Watt, P. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant propagation. African Journal of Biotechnology. 11(76):14025-14035.