



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

**“Respuesta antioxidante enzimática y no enzimática en
cultivo de raíces de *Stevia rebaudiana*”**

TESIS

P R E S E N T A:

I.I.A. Itzel Vianney Alvarado Orea

Para obtener el título de:

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia

CO-DIRECTOR

Dr. David Paniagua Vega

San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca

Esta tesis fue realizada en la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec. En el laboratorio de Cultivo de Células Vegetales, bajo la asesoría de la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia y el Dr. David Paniagua Vega.

Proyecto de Cátedra CONACyT 3212 “Estudio integral de plantas medicinales para la producción y estandarización de fitoextractos” (No. 235307) y el proyecto “INFR201501” No. 255514: Equipamiento para fortalecer la investigación de cultivo de tejido y producción de metabolitos secundarios vegetales de la Universidad del Papaloapan.



“No se pongan límites y no permitan que otras personas los convenzan de que lo que ustedes pueden hacer tiene un límite. Crean en ustedes mismos y luego vivan de tal modo que puedan lograr aquello de lo que son capaces. Tengan la determinación para realizar el esfuerzo, la resolución para trabajar a fin de alcanzar una meta digna y el valor no sólo para enfrentar las dificultades, sino también para realizar un segundo esfuerzo, en caso de ser necesario. A veces el valor es esa vocecita que, al final del día, dice: 'Mañana volveré a intentarlo.’” Pte. Thomas S. Monson.

PRODUCTOS

Alvarado-Orea I. V., Montes-Palmeros M., Vera-Reyes I., Lira-Saldívar R. H., Pavón-Orozco P. y Huerta-Heredia A. A. 2016. Steviol glucosides production in *Stevia rebaudiana* bertonii root culture. *Mex. J. Biotechnol.* 1(1):12-20.

Montes-Palmeros M., **Alvarado-Orea I. V.**, Pavón-Orozco P., García-López E. y Huerta-Heredia A. A. 2016. Steviol glucosides production in micropropagated seedlings of *Stevia rebaudiana* elicited with methyl jasmonate. *Mex. J. Biotechnol.* 1(1):113-119.

CONGRESOS

Producción de glucósidos de esteviol a partir de raíces *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni, Nacional, II Encuentro Nacional Sobre Biotecnología UATx. Alvarado-Orea I. V., Montes-Palmeros M., Vera-Reyes I., Lira-Saldívar R. H., Pavón-Orozco P. y Huerta-Heredia A. A. 2015.

Efecto de la adición de NPs ZnO en la respuesta antioxidante enzimática y la producción de metabolitos secundarios en cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*., Nacional, 4a Reunión de nanomateriales, nanotecnología y ciencias aplicadas. Alvarado-Orea I. V., Capataz-Tafur J., Paniagua-Vega D., Sanchez-Ocampo P. M. y Huerta-Heredia A. A. 2016.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero agradecer a mi familia por su apoyo en los momentos de alegría, así como en los de frustración, además por animarme para poder cumplir mis metas.

Tu ayuda ha sido incondicional, has estado conmigo incluso en los momentos más difíciles y en los desvelos. Sabes que hacer ciencia no es fácil, pero estuviste motivándome, aconsejándome y apoyándome todo este tiempo de trabajo. Agradecida estoy contigo Ángel, por no dejarme sola y hacer más ameno la escritura de la tesis. Te amo.

A mis directores de tesis Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia y Dr. David Paniagua por su tiempo y dirección para llevar a cabo este trabajo.

A mi comité tutorial Dra. Ileana Vera Reyes, Dr. Paul Sánchez Ocampo y Dra. Jacqueline Capataz Tafur por sus revisiones y aportaciones en la realización de esta tesis.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo recibido en la realización de la estancia de investigación.

Al Laboratorio de Bioprospecção de Produtos Naturais do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (unesp), São Vicente, Brasil. con el Dr. Wagner Vilegas, Brasil, por el análisis de muestras por espectrometría de masas.

A CONACyT por la beca otorgada durante el periodo octubre 2014-septiembre 2016, número de becario 571516, al “Programa de Fortalecimiento Académico Para Indígenas Apoyos Complementarios Para Mujeres Indígenas Becarias CONACYT 2015-2” y a las Becas Mixtas 2016-marzo 2017 Para la Movilidad Nacional.

Contenido

Índice de figuras	VIII
Índice de tablas	IX
Abreviaturas	X
Resumen.....	11
Abstract.....	13
1. Introducción	14
2. Antecedentes.....	15
2.1 <i>Stevia rebaudiana</i>	15
2.1.1 Propiedades medicinales.....	15
2.1.2 Metabolitos secundarios de <i>Stevia rebaudiana</i>	16
2.2 Biosíntesis de los Glucósidos de Esteviol	18
2.3 Cultivo <i>in vitro</i>	21
2.3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>Stevia rebaudiana</i>	22
2.4 Estrés biótico y abiótico en plantas	23
2.5 Elicitación como estrategia para la producción MetS	24
2.5.1 Nanopartículas (NPs)	24
2.5.2 Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂).....	25
2.5.3 Metil Jasmonato (MeJa).....	26
2.6 Especies reactivas de oxígeno.....	28
2.7 Estrés oxidativo en cultivo <i>in vitro</i>	34
3. Justificación	36
4. Hipótesis.....	37
5. Objetivo General.....	37
6. Objetivos Específicos	37
7. Metodología.....	38
7.1 Material vegetal	38
7.2 Establecimiento de raíces en medio líquido	38

7.3	Extracción e identificación de Glucósidos de Esteviol (GE)	38
7.3.1	Extracción de Glucósidos de Esteviol (GE)	38
7.3.2	Extracción en fase solida (SPE)	39
7.3.3	Cromatografía en capa fina TLC.....	39
7.3.4	Espectrofotometría de masas	40
7.4	Cinética de crecimiento	41
7.4.1	Índice de crecimiento.....	41
7.5	Cuantificación de Fenoles totales.....	41
7.6	Cuantificación de Flavonoides.....	42
7.7	Experimentos de elicitación.....	42
7.7.1	Nanopartículas de óxido de Zn (NPs ZnO).....	42
7.7.2	Peróxido de Hidrogeno (H ₂ O ₂).....	43
7.7.3	Metil Jasmonato (MeJa).....	43
7.8	Actividad enzimática.....	43
7.8.1	Extracción y cuantificación de la actividad enzimática.....	43
8.	Resultados y Discusión	46
8.1	Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>Stevia rebaudiana</i>	46
8.2	Análisis químico de los metabolitos secundarios presentes en las raíces <i>in vitro</i> de <i>S. rebaudiana</i>	48
8.2.1	Cromatografía en capa fina (TLC)	48
8.2.2	Identificación de GE por espectrometría de masas	50
8.3	Cinética de crecimiento	52
8.4	Elicitación abiótica en cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>Stevia rebaudiana</i>	54
8.4.1	Efecto de la adición de NPs ZnO en la actividad antioxidante no enzimática.....	54
8.4.2	Efecto de H ₂ O ₂ en cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i>	59
8.4.3	Efecto de MeJa en cultivo <i>in vitro</i> raíces de <i>S. rebaudiana</i>	65
9.	Conclusión.....	75

10. Recomendaciones	76
11. Anexos.....	77
12. Referencias.....	81

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de los Glucósidos de Esteviol (GE).	17
Figura 2. Biosíntesis de Glucósidos de Esteviol. Ruta del MVA.....	19
Figura 3. Generación de ERO por transferencia de electrones o reacción Fenton.	29
Figura 4. Esquema de activación del metabolismo secundario vía estrés oxidativo.	30
Figura 5. Ruta de Biosíntesis de los Fenilpropanoides.....	33
Figura 6. Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>Stevia rebaudiana</i>	46
Figura 7. Raíces <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> A) Oscuridad y B) Fotoperiodo.....	47
Figura 8. Identificación de GE en extractos de raíces <i>in vitro</i> de <i>S. rebaudiana</i> . ..	49
Figura 9. Identificación de compuestos fenólicos en extractos de raíces <i>in vitro</i> de <i>S. rebaudiana</i>	49
Figura 10. Espectros de GE producidos en cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i> obtenidos por la técnica de infusión directa en metanol.	51
Figura 11. Espectro del Est obtenido por la técnica de infusión directa a 5 ppm en metanol.....	51
Figura 12. Cinética de crecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>Stevia rebaudiana</i>	53
Figura 13. Efecto de la adición de NPs ZnO en la acumulación de Fenoles totales intracelular en cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i>	55
Figura 14. Efecto de las NPs ZnO en cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i> . 57	

Figura 15. Efecto en el crecimiento por la adición de H ₂ O ₂ en cultivos <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i>	59
Figura 16. Efecto de la adición de H ₂ O ₂ en cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i>	61
Figura 17. Efecto del H ₂ O ₂ en cultivos <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i>	63
Figura 18. Efecto en el crecimiento por la adición de MeJa en cultivos <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i>	66
Figura 19. Efecto de la adición de MeJa en cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i>	68
Figura 20. Efecto del MeJa en cultivos <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i>	70
Figura 21. Posible mecanismo antioxidante en cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>Stevia rebaudiana</i> bajo estrés.	74
Figura 22. Curva de calibración de catequina para la cuantificación de Fenoles totales.	77
Figura 23. Curva de calibración de rutina para la cuantificación de Flavonoides totales.	77

Índice de tablas

Tabla 1. Efecto de las NPs en la acumulación de MetS.	25
Tabla 2. Solución amortiguadora para la extracción de enzimas.	44
Tabla 3. Rf de los extractos metanólicos del cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i> utilizando las fases: S ₁ , S ₁ , S ₂ , S ₃ y S ₄	50
Tabla 4. Identificación de GE en cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i>	52
Tabla 5. Evaluación de geles de actividad de cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>Stevia rebaudiana</i>	79

Abreviaturas

GE	Glucósidos de Esteviol
Est	Esteviósido
Reb A	Rebaudiósido A
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
O ₂ ⁻¹	Superóxido
SOD	Superóxido dismutasa
POD	Peroxidasa
CAT	Catalasa
APX	Ascorbato peroxidasa
GPOX	Guayacol peroxidasa
ASH-GSH	Ciclo ascorbato peroxidasa
MS	Murashige y Skoog
MetS	Metabolitos secundarios
IBA	Ácido indolbutírico
BAP	Bencilaminopurina
NAA	Ácido naftalenacético
NPs ZnO	Nanopartículas de Óxido de Zinc
MeJa	Metil Jasmonato

Resumen

Se evaluó la capacidad antioxidante enzimática y no enzimática de raíces de *S. rebaudiana* bajo condiciones de estrés abiótico. Las raíces fueron crecidas bajo fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad, tomaron una coloración verde, suponiendo una mayor actividad metabólica. Estas raíces se utilizaron en los experimentos subsecuentes ya que presentaban la capacidad de acumular glucósidos de esteviol (GE). Los GE (esteviósido, esteviol y isoesteviol) fueron identificados por espectrometría de masas. Las raíces crecieron en matraces en agitación, alcanzando una biomasa máxima después de 25 días (10 g_{p.s.}/L) y una $\mu=0.090$ d⁻¹. Los mecanismos antioxidante enzimático y no enzimático, fueron evaluados bajo las siguientes condiciones: nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y metil jasmonato (MeJa). La activación del mecanismo antioxidante no enzimático fue considerada con la acumulación de metabolitos antioxidantes como fenoles y flavonoides. La adición de NPs ZnO disminuyó hasta un 90% la acumulación de fenoles totales y en un 63% la actividad de PAL. Por otro lado, la adición de H₂O₂ y MeJa incrementaron la producción de fenoles un 42% y 63% comparados con el control (421.93 $\mu\text{g}_{\text{ECq}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$) respectivamente, la acumulación de flavonoides totales aumentó 10.4 y 6.8 veces con respecto al control (34.63 $\mu\text{g}_{\text{ER}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$). Respecto a la capacidad antioxidante enzimática, la adición de NPs ZnO, H₂O₂ y MeJa incrementaron la actividad de GPOX 11, 1.02 y 0.84 veces respectivamente en contraste con los controles (49 $\mu\text{M}/\text{g}_{\text{prot}}*\text{min}$, 11.49 mM/mg_{prot}*min respectivamente). En el caso de la actividad de CAT, la adición de NPs ZnO, H₂O₂ y MeJa aumentó 2.5, 1.44 y 0.70 veces en comparación con los controles (2.09 mM/mg_{prot}*min, 10.08 $\mu\text{M}/\text{mg}_{\text{prot}}*\text{min}$ y 9.90 $\mu\text{M}/\text{mg}_{\text{prot}}*\text{min}$, respectivamente). La actividad APX disminuyó en un 56% con respecto al control debido a la acción de NPS ZnO y un 78% bajo la presencia de H₂O₂ y MeJa. Sin embargo, la actividad de APX se restauró después de 5 días de condiciones de estrés. Tomando en cuenta las respuestas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, se propuso un posible mecanismo antioxidante del cultivo de raíces de

S. rebaudiana bajo condiciones de estrés abiótico, concluyendo que las raíces tienen la capacidad de responder ante un estrés abiótico.

Abstract

The enzymatic and non-enzymatic antioxidant capacities of *S. rebaudiana* roots were assessed under abiotic stress conditions. Roots were grown under 16/8-h light-dark cycles which conferred them a green coloration and therefore greater metabolic activity. These roots were used in subsequent experiments as they had the capacity of accumulate Steviol Glycosides (SGs). SGs (stevioside, steviol and isosteviol) were identified by mass spectrometry. Root cultures grew in shaken flasks, their maximum biomass reached after 25 days (10 g_{p.s.}/L) with a $\mu=0.090\text{ d}^{-1}$. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant mechanisms were assessed under the following conditions: zinc oxide nanoparticles (NPs ZnO), H₂O₂, and methyl jasmonate (MeJa). The accumulation of antioxidant metabolites, such as phenols and flavonoids, were considered during the activation phase of the non-enzymatic antioxidant mechanism. The addition of NPs ZnO reduced by up to 90% the accumulation of total phenols and by 63% the PAL activity. On the other hand, the addition of H₂O₂ and MeJa increased the phenols production by 42% and 63% in comparison to control (421.93 $\mu\text{g}_{\text{ECq}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$), respectively, and also increased the accumulation of total flavonoids by 10.4 and 6.8-fold compared to control (34.63 $\mu\text{g}_{\text{ECq}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$). Regarding the enzymatic anti-oxidant capacity, the addition of NPS ZnO, H₂O₂, and MeJa increased GPOX activity respectively by 11, 1.02, and 0.84-fold in contrast to controls (49 $\mu\text{M}/\text{g}_{\text{prot}}\cdot\text{min}$, 11.49 $\text{mM}/\text{mg}_{\text{prot}}\cdot\text{min}$, respectively). In the case of CAT activity, the addition of NPS ZnO, H₂O₂, and MeJa increased it respectively by 2.5, 1.44, and 0.70-fold compared to controls (2.09 $\text{mM}/\text{mg}_{\text{prot}}\cdot\text{min}$, 10.08 $\mu\text{M}/\text{mg}_{\text{prot}}\cdot\text{min}$ and 9.90 $\mu\text{M}/\text{mg}_{\text{prot}}\cdot\text{min}$, respectively). APX activity decreased by 56% relative to control due to the action of NPS ZnO and by 78% under the presence of H₂O₂ and MeJa. However, APX activity was restored after 5 days of stress conditions. Considering the enzymatic and non-enzymatic responses, a possible anti-oxidant mechanism for *S. rebaudiana* roots under abiotic stress conditions was proposed, concluding that the roots have the ability to respond to abiotic stress.

1. Introducción

Stevia rebaudiana es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Asteráceas, originaria de América del Sur. La importancia comercial de *S. rebaudiana* radica en que los glucosidos de esteviol (GE) presentes en la planta, llegan a ser hasta 300 veces más dulces que la sacarosa (Lemus-Mondaca *et al.* 2012). Entre los principales GE presentes en las hojas de *S. rebaudiana* se encuentra el esteviósido (Est) y rebaudiósido A (Reb A), a los cuales se les han atribuido diferentes propiedades medicinales como: regular los niveles de glucosa en sangre y en su estado puro han llegado a presentar capacidad citotóxica contra distintos tipos de cánceres (Ukiya *et al.* 2013).

Hasta ahora se han realizado diversos estudios para describir los pasos que sintetizan los GE teniendo en cuenta las enzimas y genes que se encuentran implicados, así mismo la producción de compuestos antioxidantes presentes en la planta, además de la adición de diversos agentes estimulantes denominados elicitores, que alteran el metabolismo celular de las plantas, provocando a su vez un desequilibrio entre las especies oxidantes y antioxidantes, favoreciendo la activación del metabolismo secundario (Mittler, 2002). Sin embargo, poco se sabe de la participación del mecanismo antioxidante enzimático y no enzimático en *S. rebaudiana* bajo condiciones de estrés. El cultivo *in vitro* es una herramienta biotecnológica que permite estudiar los procesos bioquímicos provocados por factores de estrés, siendo el cultivo *in vitro* de raíces el más utilizado para este tipo de estudios. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática bajo el régimen de elicitación abiótica en cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*.

2. Antecedentes

2.1 *Stevia rebaudiana*

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta herbácea perenne, perteneciente a la familia de las Asteráceas, es nativa de la región de Amambay, al noreste de Paraguay, también se produce en las zonas limítrofes de Brasil y Argentina (Soejarto, 2002). Hoy en día, su cultivo se lleva a cabo en otras regiones del mundo como Canadá, algunas partes de Asia y Europa (Hossain, 2010; Gardana, 2003). En Japón y Corea ha sido catalogada oficialmente como un edulcorante bajo en calorías (Mizutani y Tanaka, 2002; Kim *et al.* 2002), por lo que en Japón el 41% de los endulzantes consumidos provienen de *S. rebaudiana* (Landázuri y Tigrero, 2009).

La importancia comercial de *S. rebaudiana* se resume en que los GE que la caracterizan, aparte de resultar hasta 300 veces más dulces que la sacarosa (Geuns, 2003; Brandle y Telmer, 2007; Gardana *et al.* 2010), no son degradados y utilizados como fuente de energía por el cuerpo ya que no se descompone químicamente durante el proceso digestivo. Por ello son aptos para consumo en personas diabéticas, ya que no incrementan los niveles de azúcar en la sangre, ayudando también a las personas con problemas de obesidad (Das *et al.* 2011).

2.1.1 Propiedades medicinales

Los extractos de *S. rebaudiana* poseen gran cantidad de compuestos con propiedades antiinflamatorias (Jayaraman *et al.* 2008), diuréticas (Kochikyan *et al.* 2006), antihipertensas (Chan *et al.* 2000), antidiarreica (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009) y antitumoral (Chen *et al.* 2006). Incluyendo compuestos como los labdanos, flavonoides, esteroides, triterpenos, clorofilas, ácidos grasos, monosacáridos y sales orgánicas (Gardana *et al.* 2010). La presencia de compuestos con poder antioxidante resulta

especialmente interesante puesto que intervienen en el proceso de oxidación al reaccionar con los radicales libres y previniendo la oxidación causada por estos radicales.

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA), la diabetes se define como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglicemias, productos de la secreción de insulina, acción de la insulina, o ambas (ADA, 2010b). Clínicamente la diabetes se divide en 2 tipos: Tipo I; se desarrolla por la destrucción de las células β que posteriormente llevan a la deficiencia absoluta de la insulina. Tipo II; resulta de un defecto progresivo de la secreción de insulina y una resistencia a la insulina (ADA, 2010b). Diversos estudios han demostrado que los extractos además presentan propiedades antihiper glucémica (Chen *et al.* 2006). Los GE estimulan la liberación de insulina en la sangre manteniendo los niveles de glucosa bajos, por tanto, se puede plantear como alternativa de origen natural para la población afectada por la Diabetes (Shivanna *et al.* 2012).

Por otro lado, el esteviol y sus derivados han demostrado tener capacidad citotóxica contra varias líneas cancerígenas como: leucemia (línea celular HL60), pulmón (A549), estomago (AZ521) y cáncer de mama en dos líneas celulares (SK-BR-3 y MCF-7) (Paul *et al.* 2012; Ukiya *et al.* 2013).

2.1.2 Metabolitos secundarios de *Stevia rebaudiana*

Los metabolitos secundarios (MetS) de las plantas son aquellos compuestos que no son esenciales tanto para el crecimiento, como el desarrollo de los organismos, pero desempeñan un papel crucial en la interacción de las especies con su entorno, lo cual garantiza su supervivencia en el ecosistema (Verpoorte, 2000).

Las hojas de *S. rebaudiana* poseen MetS principalmente GE. El porcentaje GE en hoja (en peso seco) son: esteviósido (Est: 5-10%), rebaudiósido A (Reb A: 2-4%), rebaudiósido

C (1-2%) y dulcósido A (0.4-0.7%) (Fig. 1). Est y Reb A son los que dominan el mercado (Hearn y Subedi, 2006; Chatsudthipong y Muanprasat, 2009).

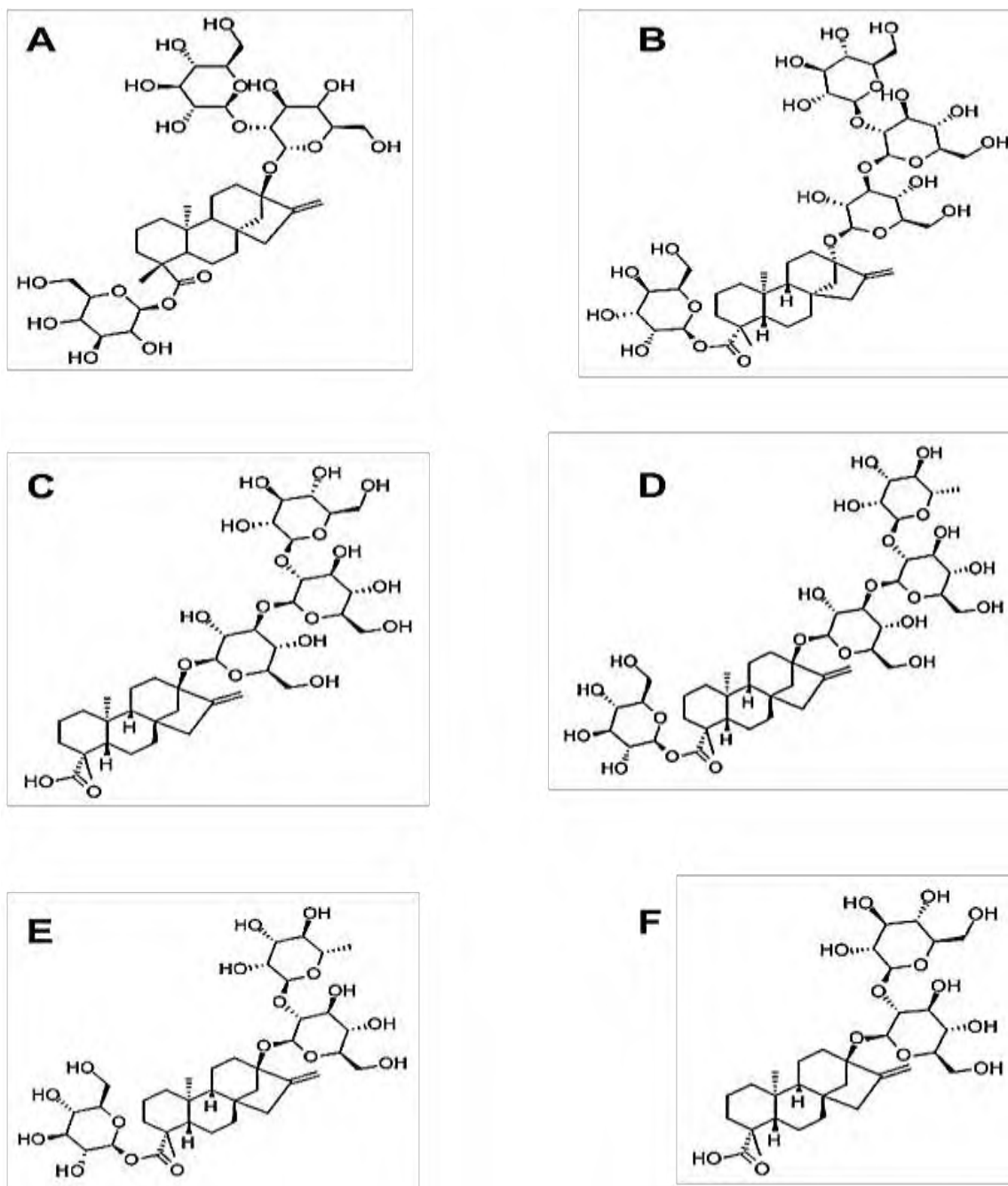


Figura 1. Estructura química de los Glucósidos de Esteviol (GE). **A)** Estevióside, **B)** Rebaudiósido A, **C)** Rebaudiósido B, **E)** Rebaudiósido C, **D)** Dulcósido A y **F)** Esteviolbiósido.

Uno de los criterios importantes para determinar la calidad de la hoja, es la relación Reb A/Est (De Oliveira *et al.* 2007). En la medida en que esta relación sea igual o mayor de 1, se obtiene un producto de mejor calidad (mayor potencial edulcorante y menor sabor amargo), ya que RebA es más dulce y no tiene sabor amargo (Dacome *et al.* 2005; Carakostas *et al.* 2008), en comparación con el Est. El contenido de fenoles y flavonoides totales en hojas de *S. rebaudiana* se encuentra entre 55.64-58 mg_{EAG}/g_{p.s.} y 48.29–60.33 mg_{ER}/g_{p.s.}, respectivamente (Zeng *et al.* 2013).

2.2 Biosíntesis de los Glucósidos de Esteviol

Los GE se sintetizan a partir de unidades de acetato del acetil-CoA en la ruta del ácido mevalónico (MVA) (Guevara-García *et al.* 2005) (Fig. 2). El acetil-CoA ingresa al cloroplasto y se convierte en isopentenil pirofosfato (IPP) una molécula de cinco carbonos denominada como isopreno activo, ya que comienza el alargamiento de la cadena terpénica, para luego formarse en pirofosfato de geranilgeranilo (un compuesto de 20 carbonos, que sirve como donador de todos los átomos de carbono de las giberelinas), convirtiéndose después en pirofosfato de copalillo (con dos sistemas de anillos) y por último en kaureno, un compuesto que tiene 4 sistemas de anillos.

El kaureno es el compuesto donde divergen los GE y las giberelinas; en *Stevia*, el kaureno es convertido en esteviol (espina dorsal de los glucósidos de diterpeno) en el retículo endoplásmico; dicho esteviol puede ser glucosilado en el aparato de Golgi, para formar los principales edulcorantes como el esteviósido (triglicosilado esteviol) y Rebaudiósido A y C (tetraglicosilado esteviol) y Duclósido A, los cuales van finalmente a las vacuolas (Brandle y Telmer, 2007).

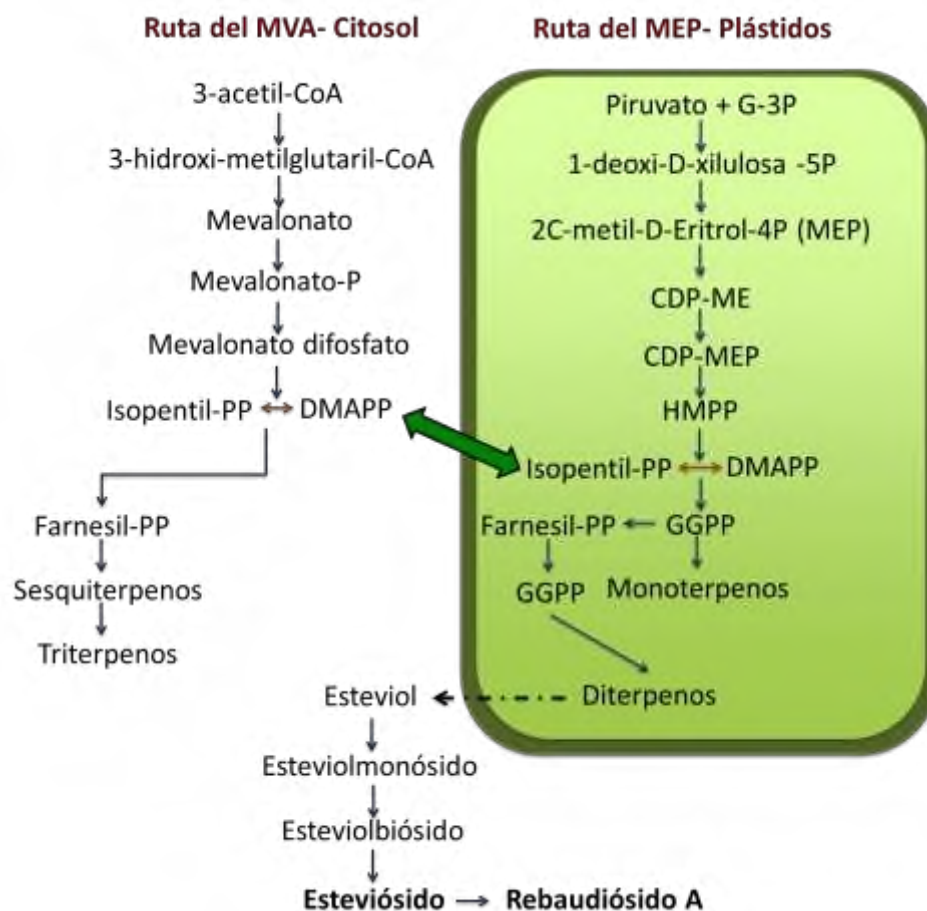


Figura 2. Biosíntesis de Glucósidos de Esteviol. **Ruta del MVA.** **Mevalonato-P:** mevalonato-fosfato, **Isopentil-PP:** isopentil pirofosfato, **DMAPP:** dimetilalil difosfato, **Farnesil-PP:** farnesil difosfato, **CDP:** copalil difosfato, **HMPP:** 4-Hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato, **GGPP:** Geranil geranil difosfato (Tomado de Wölwer-Rieck *et al.* 2014).

Las enzimas que catalizan el alargamiento de la cadena terpénica son las prenil transferasas, de las cuales se han aislado, hasta ahora, el geranil pirofosfato sintasa, enzima identificada en plastos que requieren Mg^{+} o Mn^{+} como cofactores (Suga y Endo, 1991; Kim *et al.* 1996); la farnesil pirofosfato sintasa, que requiere Mg^{+} como cofactor, se localiza en el citoplasma y cataliza la formación del farnesil difosfato (FPP) en dos etapas. Por último, la geranil geranil difosfato sintasa (GGPP sintasa), que requiere Mn^{+} para su máxima actividad, se localiza en plastos y forma el geranil geranil difosfato (GGPP) en tres etapas.

Brandle *et al.* (2002), clonaron y secuenciaron el gen de *Stevia* que codifica para la enzima copalil difosfato sintasa (CPS), responsable de la conversión de GGPP a copalil difosfato (CPP), y afirman que la hidroxilación del ácido kaurenóico en la posición C13, es el punto donde diverge la síntesis de GE y las giribelininas. Esta hidroxilación requiere de NADPH y oxígeno molecular proveniente de la estoma, y es catalizada por la enzima ácida ent-kaurenóico 13-hidroxilasa (Orozco y de Jesús, 2010).

Richman *et al.* (1999), proponen que los cambios en la regulación de la expresión de la copalilfosfato sintasa (CPS) y el kaureno sintasa (KS) en las hojas de *Stevia* está relacionado con la síntesis y acumulación de altas concentraciones de GE. El hecho de que los niveles de expresión sean más altos en tejidos maduros, comparados con los tejidos jóvenes de rápido crecimiento, es debido a que el CPS y el KS están altamente expresados. Algunos investigadores afirman que los esteviósidos ayudan a rechazar ciertos insectos y otros especulan que es un mecanismo detallado para controlar los niveles de ácido giberélico.

Wölwer-Rieck *et al.* (2014), estudiaron la ruta de biosíntesis de los GE en esquejes de *S. rebaudiana* utilizando precursores marcados [5,5- $^2\text{H}_2$]-1-desoxi-D xilulosa (d_2 -DOX) y [5,5- $^2\text{H}_2$]-ácido mevalónico lactona (d_2 - MVL), demostrando que ambas vías MEP y MVA contribuyen a la biosíntesis de los sesquiterpenos, mientras que los mono- y diterpenos, en particular los GE, se forman casi exclusivamente por la vía MEP. Por otro lado, diferentes autores han validado que la vía MEP es la ruta que se activa bajo condiciones de estrés. Mandal *et al.* (2015), inocularon plantas de *S. rebaudiana* con hongos micorrízicos arbusculares (AMF) interacciona regulando positivamente once genes claves que codifican a enzimas de la vía MEP, mejorando la proporción de Est y Reb A.

Yang *et al.* (2015), estudiaron la influencia de altas y bajas temperaturas, deshidratación, fotoperiodos y diferentes etapas de crecimiento con los niveles de transcripción de quince genes implicados en la biosíntesis y el contenido GE, demostrando que los cambios ambientales tienen un efecto significativo sobre la producción de GE y los niveles de

transcripción. Modi *et al.* (2014), estudiaron los niveles transcripcionales de los genes implicados en la biosíntesis de GE durante el endurecimiento, durante 3 intervalos de tiempo (10, 20 y 30 día), de plántulas de *S. rebaudiana*, observando que los quince genes implicados en la formación de los GE de la vía MEP se expresaron a niveles más altos en plántulas de 10 días de endurecimiento (estado vegetativo) comparadas con plántulas control. El mayor contenido de Est se presentó después de 30 días de endurecimiento, sugiriendo que mecanismos reguladores transcripcionales y post-traduccionales están implicados en la producción de GE. Además, Kumar *et al.* (2012), estudiaron la expresión del gen HDR responsable de la conversión del IPP y DMAPP precursores de la formación de GE. Observaron que durante el día la expresión del gen HDR es mayor, incrementando la acumulación de los GE, que durante la noche.

2.3 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una de las aplicaciones de la biotecnología moderna que consiste en un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células o protoplastos de diversas plantas empleando medios nutritivos artificiales (Villalobos y Thorpe, 1991).

El cultivo *in vitro* tiene diversas ventajas sobre el cultivo convencional de plantas como son: obtener sustancias de gran utilidad (como MetS) bajo condiciones controladas, independientemente de factores ambientales ya sean bióticos (interacción con patógenos) o abióticos (sequía, luz ultravioleta y temperaturas extremas), así como, obtener un incremento considerable en el rendimiento de los metabolitos específicos (Vanisree y Tsay, 2007). Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal, hasta la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva, la conservación de germoplasma, el mejoramiento genético y la producción de metabolitos primarios y secundarios (Villalobos y Thorpe, 1991; Ramachandra y Ravishankar, 2002).

Las plantas tienen potencial bioquímico para producir una enorme variedad de metabolitos de interés industrial (Misawa, 1994; Alfermann y Petersen, 1995; Fu *et al.* 1999; Vanisree y Tsay, 2004). Los compuestos bioactivos de las plantas medicinales son la fuente principal para la producción fármacos, agroquímicos, pesticidas, insecticidas, saborizantes, colorantes, perfumes y aditivos alimentarios, etc. (Balandrin y Klocke, 1988; Zhao *et al.* 2005). Comúnmente, estos compuestos se obtienen de plantas silvestres, lo que involucra una serie de desventajas, su baja y lenta acumulación, ya que está regulada espacial y temporalmente; es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, durante el ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés (Verpoorte *et al.* 2002).

2.3.1 Cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*

Ahmed *et al.* (2007), proponen que el cultivo tradicional de *S. rebaudiana* se dificulta porque las semillas de esta especie generan porcentajes de germinación tan bajos que su reproducción sexual se convierte en un trabajo poco viable, además de la heterogeneidad de las poblaciones en cuanto a características de importancia como los niveles de producción de esteviósidos. Su reproducción asexual, lograda a través de brotes o estacas, limita las producciones a un número bajo de individuos regenerados. La necesidad de obtener poblaciones de *S. rebaudiana*, morfológica y genéticamente uniformes, es un tema que se plantea desde varias décadas atrás, y seguirá discutiéndose mientras se encuentre en juego la cantidad y calidad de los compuestos (Suárez y Salgado, 2008). Comparado con el cultivo de plantas convencionales, las cuales sufren por la limitación de tierra y clima, el cultivo de células y tejidos *in vitro* es una estrategia para la producción de altos niveles de MetS de plantas.

Los cultivos de raíces *in vitro* son genética y biológicamente más estable, comparado con cultivos de células en suspensión, a demás, de mostrar un crecimiento vigoroso en medios de cultivo libre de fitoreguladores (Washida *et al.* 2004; Srivastava *et al.* 2013). Por su grado de especialización y organización celular llegan acumular cantidades de los

compuestos de interés comparables al de las plantas (Brandle *et al.* 1998). Cabe destacar que muchas plantas son utilizadas en la medicina tradicional y que las raíces son la materia prima de donde se obtienen los compuestos de interés.

Son varios los reportes de cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana*. Por ejemplo, Reis *et al.* (2017), compararon la morfología de raíces crecidas *in vivo* con *in vitro*. Calderón *et al.* (2016), obtuvieron raíces transformadas de *S. rebaudiana* utilizando 3 cepas de *Agrobacterium rizógenes* (AR-4, LB-9402 y K-599) siendo la cepa LB-9402 la que presentó mayor virulencia. Fu *et al.* (2014), en raíces transformadas de *S. rebaudiana*, identificaron y cuantificaron derivados de ácidos cloragénicos. Reis *et al.* (2011), establecieron cultivos de raíces adventicias de *S. rebaudiana* en sistema de frasco-rotatorio en fotoperiodo 16/8 h. Yamasaki y Flores, (1991), reportaron el primer establecimiento de cultivo de raíces transformadas en suspensión con *Agrobacterium rizógenes*.

La baja producción o ausencia de biocompuestos en la planta es una de las principales limitaciones del cultivo, debido a que los MetS son producidos para proteger la planta de insectos, herbívoros y patógenos, o para sobrevivir a otros tipos de estrés biótico o abiótico (Zhao *et al.* 2005). Basados en este principio se han creado estrategias para la producción de MetS *in vitro*; estas incluyen tratamientos con diversos elicitores, factores de señalización y estrés biótico/abiótico (Yukimune *et al.* 1996; Zhao *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2004).

2.4 Estrés biótico y abiótico en plantas

El estrés es el estado en el que las condiciones normales de las plantas varían provocando una desestabilización de sus funciones fisiológicas, después existe una restauración de las mismas y/o resistencia a las condiciones que provocaron el cambio. En algunos casos, cuando el estrés excede el límite de tolerancia y la capacidad de adaptarse a él, puede ocurrir daño celular permanente o incluso la muerte de la planta

(Lichtenthaler, 1998). Según el origen del estímulo se presenta el estrés biótico, provocado por organismos vivos, bacterias o compuestos derivados por su metabolismo, o bien el estrés abiótico, que se genera por las condiciones ambientales como la sequía, frío, calor, radiación UV, presencia de metales pesados y carencia de nutrientes.

2.5 Elicitación como estrategia para la producción MetS

Un elicitor es cualquier tipo de estimulador, sea este de naturaleza biótico o abiótico, de origen exógeno y endógeno, que incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno y la síntesis de MetS (Mittler, 2002; Edreva *et al.* 2008).

2.5.1 Nanopartículas (NPs)

Los metales estimulan la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas, aunque los mecanismos por los cuales estos metales promueven la acumulación de metabolitos secundarios no son claros, la inducción del estrés oxidativo o la generación de ERO por estos metales se observa a menudo. Es bien sabido que el efecto en la inducción de la síntesis y acumulación de los metabolitos secundarios relacionados con la defensa puede generarse tanto en respuesta a los elicitores bióticos como el ataque de herbívoros o de patógenos y los elicitores abióticos tales como metales pesados y compuestos inorgánicos, así como tensiones osmóticas y salinas.

La nanotecnología (NT) tiene diversas aplicaciones en la agricultura y la biotecnología, en las que ya se incorporan a las disciplinas de agronotecnología y nanobiotecnología; estas combinan el procesamiento químico, ciencia de los materiales, ingeniería de sistemas y disciplinas ambientales. Las NPs tienen el potencial de ser utilizadas como nuevos elicitores eficaces en la biotecnología vegetal para la obtención de la producción de metabolitos secundarios (Tabla 1) (Fakruddin *et al.* 2012).

Muchos investigadores han estudiado el rol de las NPs como inductores donde han apoyado que las NPs mejoran el nivel de expresión de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios (Ghasemi *et al.* 2015; Yarizade y Hosseini, 2015). Sin embargo, realizar investigaciones para dilucidar los efectos de las NPs en los mecanismos de producción de metabolitos secundarios en las plantas medicinales.

Tabla 1. Efecto de las NPs en la acumulación de MetS (Tomado de Pragati *et al.* 2016).

NPs	Cultivo	MetS	Referencia
Ag	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Tanshinona	Zhao <i>et al.</i> 2010
	<i>Bacop amonniari</i>	Fenoles	Krishnaraj <i>et al.</i> 2012
	<i>Artemisia annua</i>	Artemisina	Zhang <i>et al.</i> 2013
	<i>Datura metel</i>	Alcaloides tropano	Shakeran <i>et al.</i> 2015
Co	<i>Artemisia annua</i>	Artemisina	Ghasemi <i>et al.</i> 2015
	<i>Calendula officinalis</i>	Saponinas	Ghanati y Bakhtiaran, 2014
TiO₂	<i>Aloe vera</i>	Aloína	Raei <i>et al.</i> 2014
	<i>Cicer arietinum</i>	Contenido de fenoles y flavonoides	AL-Oubaidi y Kasind, 2015
ZnO	<i>Hypericum perforatum</i>	Hiperician y hiperforina	Shafari <i>et al.</i> 2013

2.5.2 Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se produce predominantemente en células vegetales durante la fotosíntesis y la fotorespiración, y en menor medida, en los procesos respiratorios interactuando con proteínas y activando diferentes vías de señalización, así como factores de transcripción, que a su vez regulan la expresión génica y los procesos del ciclo celular. Además del metabolismo fotosintético y respiratorio, la matriz extracelular (MEC) juega un papel importante en la generación de H₂O₂, que regula el crecimiento de las plantas, el desarrollo, la aclimatación y las respuestas de defensa (Slesak *et al.* 2007).

El H_2O_2 se produce en la célula como resultado del metabolismo primario o en respuesta a condiciones de estrés biótico o abiótico. Esta molécula es reconocida principalmente como tóxica, ya que, logra afectar estructuras celulares. En la última década se ha podido demostrar que también logra actuar como una importante molécula de señalización involucrada en una cantidad de funciones biológicas entre las que se encuentran resistencia a patógenos, reforzamiento de la pared celular, senescencia, fotosíntesis, apertura de estomas, elongación, el desarrollo y la muerte celular programada (Kim *et al.* 2007), y ser un modulador importante de respuesta al estrés en plantas, debido a que sus niveles se incrementan durante varias condiciones medioambientales adversas (Mittler *et al.* 2004).

La respuesta de adaptación al estrés se puede explicar por la activación de mecanismos de defensa que involucran enzimas antioxidantes, factores de transcripción específicos al estrés, proteínas específicas, ya sea por calor o por patogénesis, así como el incremento en la producción de MetS (Moon *et al.* 2003).

2.5.3 Metil Jasmonato (MeJa)

Por otro lado, la respuesta de una planta a cualquier estímulo exógeno o endógeno nunca es el resultado de la activación de una única ruta de señalización hormonal, sino que es la consecuencia de una compleja red de interacciones entre distintas rutas de señalización. Una de las rutas que la planta activa es la del ácido octadecanoico, donde se sintetizan los jasmonatos, derivados del metabolismo de los ácidos grasos.

La síntesis de los jasmonatos se lleva a cabo principalmente en las hojas, donde son liberados los ácidos grasos de la membrana plasmática por acción de las fosfolipasas y desaturasas. La lipoxigenasa (LOX) oxigena, oxida y cicla el ácido graso, formado así el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), principal precursor de los jasmonatos. Posteriormente es sometido a 3 ciclos de oxidación para producir el ácido jasmónico (AJ). El AJ es exportado al citosol por un mecanismo desconocido donde ocurren las diferentes

reacciones metabólicas que darán origen a los distintos jasmonatos (Wasternack, 2007). Entre las principales transformaciones del AJ se encuentra la metilación en el carbono 1 (C1), para producir el compuesto volátil metil-jasmonato (MeJa), el cual está involucrado en la señalización entre plantas.

La aplicación de estos elicitores ha demostrado tener un efecto en la síntesis de compuestos derivados del metabolismo secundario como lo estudiado por Ali *et al.* (2006), en raíces de *Panax ginseng* cultivadas en biorreactor, estimularon la producción de gingenósidos con la adición de cobre a 5, 10, 25 y 50 μM , observándose que la síntesis de saponinas fue estimulada en concentraciones de 5-25 μM de Cu^{+2} , decreciendo a partir de los 20 días a 50 μM de Cu^{+2} . Concluyeron que la tolerancia de las raíces de *P. ginseng* al Cu^{+2} es debido a su capacidad de absorber hasta cierto punto iones metálicos. En cultivo de raíces de *Podophyllum peltatum*, se evaluó la adición de 10, 20 y 30 μM de MeJa; la mejor concentración utilizada para el incremento en la producción de podofilotoxina fue 20 μM de MeJa, con un incremento en la producción de 2 veces (0.588 mg/g). Anbazhagan *et al.* (2008), concluyeron que la adición de MeJa mejora notablemente la producción de podofilotoxina. Vera-Reyes *et al.* (2013), reportaron que en raíces de *Uncaria tomentosa*, la producción de alcaloides oxindol monoterpénicos, 3 α -dihidrocadambina y dolicantósido incrementaron debido al estrés oxidativo provocado por la adición de H_2O_2 la producción reportada fue de 1.7, 2.1 y 2.3 veces más con respecto al control, después de 8 días de tratamiento. Además, la adición de BSO-AJ incrementó la producción de alcaloides 2 veces más que los cultivos tratados con H_2O_2 . Por otro lado, Zaker *et al.* (2015), compararon el efecto de diferentes elicitores como: extracto de levadura, MeJa, nitrato de plata y sorbitol; a distintas concentraciones, sobre la producción de criptotanshinona y tanshinona IIA, en cultivos de raíces adventicias de *Perovskia abrotanoides*, obteniendo la mayor producción de criptotanshinona con extracto de levadura (200 mg/L) y el nitrato de plata (25 μM) a los 7 días de exposición de los elicitores.

En el caso de *S. rebaudiana* ya existen antecedentes de adición de elicitores como lo reportado por Gupta *et al.* (2014), donde evaluaron el estrés inducido por la adición de 0.10% NaCl y 0.025% Na₂CO₃ en callos y cultivos celulares de *S. rebaudiana*, incrementaron de 0.27 a 1.43 y 1.57% la producción de GE en callos, después de 15 días de la adición y para el caso de las suspensiones celulares incrementó de 1.36 a 2.51 y 5.14%. Rathore *et al.* (2014), evaluaron la influencia de diferentes concentraciones (25, 50, 75, 100 y 125 mM) de NaCl en dos cultivares de *S. rebaudiana* observando a 75 mM el mayor contenido de azúcar soluble 93.54 mg/g y 22.42 mg/g_{p.f.} Álvarez-Robles *et al.* (2016), adicionaron concentraciones de 0.1%, 0.5%, 1.5% y 2.5% de metanol, para observar su efecto sobre los compuestos activos de brotes apicales en medio líquido de *S. rebaudiana*, a 0.1% de metanol se obtuvo la producción máxima de Est de 55 µmol eq. RebA/g_{p.s.} y de RebA de 10.5 µmol eq. RebA/g_{p.s.} Javed *et al.* en 2016, observaron en plántulas micropropagadas de *S. rebaudiana* el efecto del crecimiento, producción de GE por la adición de NPs ZnO de 0 a 1000 ppm, donde a 1 ppm obtuvieron la mayor producción de Reb A y Est de 3.7% y 1.2% comparado con el control (2.1% y 0.58%) respectivamente. Montes-Palmeros *et al.* (2016), evaluaron 3 concentraciones (25, 50 y 100 µM) de MeJa en plántulas micropropagadas de *S. rebaudiana* a dos tiempos de exposición (1 y 5 días) sobre la producción de GE, encontrando que la mejor concentración fue 25 µM de MeJa, ya que incrementó la acumulación de GE y sin presentar daño físico a las plántulas.

Un mecanismo de regulación de las plantas para su adaptación ante el estrés abiótico y biótico es la alteración del equilibrio celular con un aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO).

2.6 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son formas reducidas del oxígeno (O₂). Son moléculas ubicuas que se producen como consecuencia del metabolismo celular (Fujita

respuesta común a estreses abióticos y bióticos (Desikan *et al.* 2003). La acumulación de ERO inducida por estrés ya sea biótico o abiótico es contrarrestado por los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Fig. 4). Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones comparadas con las del sustrato oxidable, inhibe o disminuye significativamente la oxidación de este sustrato.

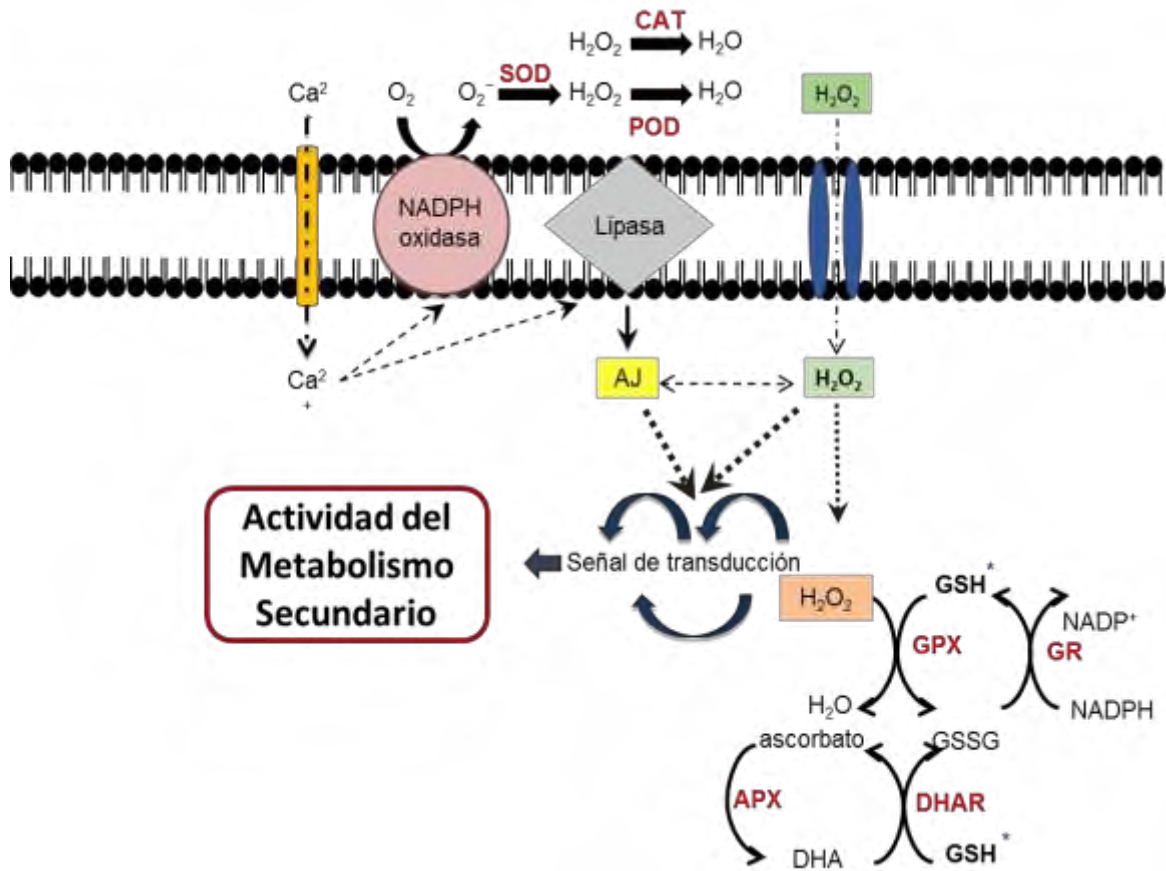


Figura 4. Esquema de activación del metabolismo secundario vía estrés oxidativo (Tomado de Vera-Reyes *et al.* 2013).

Los antioxidantes enzimáticos están formados por Catalasa (CAT) que elimina H₂O₂ en los peroxisomas, superóxido dismutasa (SOD) que elimina el anión-radical superóxido, ascorbato peroxidasa (APX) que elimina H₂O₂ en diversos compartimentos, el guayacol peroxidasa (GPOX) (Moller *et al.* 2007), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión s-

transferasa (GST), y metabolitos de bajo peso molecular no enzimáticos, tales como ascorbato (ASH), glutatión (GSH), α -tocoferol, carotenoides y flavonoides (Mittler *et al.* 2004).

2.6.1.1 Antioxidantes enzimáticos

2.6.1.1.1 Superóxido dismutasa (SOD)

La SOD es la enzima antioxidante intracelular más efectiva que se encuentra presente en todos los organismos aeróbicos y en todos los compartimentos subcelulares propensos a la acumulación de ERO mediante estrés oxidativo. Es conocido que existen varios estreses provocados por el medio ambiente que a menudo conducen al incremento en la generación de ERO, donde, SOD es de suma importancia en la tolerancia al estrés en plantas y siendo la primera línea de defensa entre los efectos tóxicos de niveles elevados de ERO. SOD es la enzima que encabeza el ataque a las ERO debido a que remueve rápidamente una de las primeras ERO en ser producidas: el superóxido. La SOD dismuta el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), vía oxidación, en oxígeno (O_2) y por reducción en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Sin embargo, esta reacción solo convierte una ERO en otra y el H_2O_2 también debe ser destruido (Kliebenstein *et al.* 1999).

2.6.1.1.2 Catalasa (CAT)

CAT son enzimas indispensables para la desintoxicación de ERO durante condiciones de estrés (Garg y Manchanda, 2009). CAT es importante en la remoción de H_2O_2 generado en peroxisomas por oxidasas involucradas en la β -oxidación de ácidos grasos, fotorespiración y catabolismo de las purinas (Polidoros y Scandalinos, 1999). La CAT es una enzima que contiene hierro en su estructura y cataliza la dismutación del H_2O_2 en agua y oxígeno molecular (Arora *et al.* 2002), fue una de las primeras enzimas en ser aislada y obtenida con un alto grado de pureza. Se ha reportado que aparte de reaccionar con H_2O_2 , CAT también reacciona con algunos hidroperóxidos tales como peróxido de hidrógeno de metilo (MeOH) (Balestrasse *et al.* 2001).

2.6.1.1.3 Ascorbato peroxidasa (APX)

APX se cree que juega el papel más esencial en la eliminación ERO y protegiendo a la célula en plantas superiores, algas y otros organismos. El ascorbato peroxidasa (APX) está involucrada en la compactación de H_2O_2 en ciclos de agua-agua y ciclo ascorbato-glutación (ASH-GSH) y utiliza ascorbato reducido (ASH) como el donador de electrones. Glutación reductasa (GR) es una enzima potencial del ciclo ascorbato-glutación (ASH-GSH) y desempeña un papel esencial en el sistema de defensa contra ERO (Gill y Tuteja, 2010; Ahmad *et al.* 2010). La familia de APX consiste en al menos cinco diferentes isoformas (Kariola *et al.* 2005). APX tiene alta afinidad por H_2O_2 teniendo así un papel importante en la reducción de ERO durante el estrés.

2.6.1.1.4 Guayacol peroxidasa (GPOX)

GPOX descompone el ácido indol-3-acético (AIA) y tiene un papel en la biosíntesis de lignina y actúa como mecanismo de defensa contra el estrés abiótico en el consumo de H_2O_2 . GPOX prefiere los donadores de electrones aromáticos tales como el guayacol generalmente oxidan el ascorbato en una tasa del alrededor 1% de guayacol (Asada, 1999). La actividad de GPOX varía considerablemente dependiendo de la especie de planta y las condiciones de estrés.

2.6.1.2 Antioxidantes no enzimáticos

2.6.1.2.1 Ascorbato-Glutación

El glutación se caracteriza por ser el compuesto no protéico más abundante, distribuido principalmente en células eucarióticas. Se encuentra en concentraciones milimolares, y presenta una alta capacidad de donar electrones. El 90% del glutación se encuentra normalmente en su estado reducido. El glutación oxidado puede de nuevo ser reducido a GSH por acción del glutación reductasa que utiliza NADPH como poder reductor (Li *et al.* 2004). El ciclo del ascorbato-glutación lo conforman cuatro enzimas, siendo la APX la más

abundante dado que esta requiere ascorbato para poder reducir el H_2O_2 a H_2O . El monodehidroascorbato (MDHA) requiere nicotina adenina dinucleótido reducido (NADH), o bien puede reducirse a ascorbato y dehidroascorbato (DHA) utilizando glutatión reducido (GSH) como reductor (Sairam y Tyagi, 2004).

Los mecanismos no enzimáticos están compuestos por moléculas como: pigmentos, glutatión, ácido ascórbico y varios MetS. Existen diversos metabolitos secundarios que, a través de diversas funciones, pueden estar involucrados en la protección no enzimática de las plantas frente al estrés oxidativo (Ramos-Valdivia *et al.* 2012).

2.6.1.3 Fenoles

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros. Esta síntesis se da a partir de fenilalanina por la vía del Shikimato (Fig. 5), juegan un rol muy importante en las plantas, debido a que regulan el metabolismo y síntesis de la lignina (Dixon y Paiva, 1995).

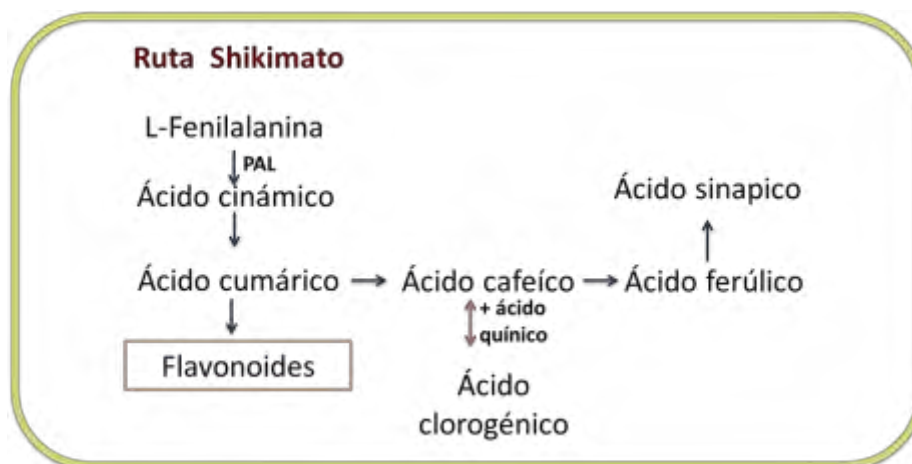


Figura 5. Ruta de Biosíntesis de los Fenilpropanoides (Modificada de Solecka, 1997).

En las plantas se encuentran un número considerable de compuestos fenólicos (flavanoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, ácidos fenólicos, etc.) (Cai *et al.* 2006).

2.6.1.3.1 Fenilalanina amonio liasa (PAL)

PAL es la primera enzima en la ruta del metabolismo fenólico y su actividad enzimática se activa por condiciones de estrés. Actúa catalizando la L-fenilalanina, que es un aminoácido aromático, dirigiendo el flujo de carbono de la vía de Shikimato a las vías del metabolismo de fenilpropanoides. Se trata de una vía metabólica secundaria en las plantas superiores y algunos otros organismos, involucrada principalmente en los mecanismos de defensa (MacDonald y D'Cunha, 2007). Esta reacción es la primera etapa de la amplia gama de reacciones que biosíntesis los fenilpropanoides (Jones, 1984).

Se ha demostrado que de la actividad enzimática de PAL puede variar durante las fases de desarrollo de planta y condiciones de estrés ya sean bióticos y abióticos a los que este expuesta (Dixon y Paiva, 1995; Tomás-Barberán y Espín, 2001), promueve un incremento en la concentración de compuestos fenólicos que incluye la formación de lignina, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, que son sustratos para enzimas oxidantes, tales como polifenol oxidasas (PPO) y peroxidasa (POX).

2.7 Estrés oxidativo en cultivo *in vitro*

En la literatura existen diferentes trabajos en que estudian el efecto de inductores abióticos y/o bióticos y el estallamiento oxidativo. Zhang *et al.* (2013), en cultivos de raíces transformadas de *Artemisia annua* evaluaron la producción de artemisinina por la adición de nanopartículas de plata (NPs Ag), observando que la producción incrementó en las raíces tratadas, también indujeron el estrés oxidativo incrementando la actividad de CAT. Huerta-Heredia *et al.* (2009), incrementaron la producción de alcaloides oxindol monoterpénicos (AOM) y de 3- α -dihidrocadambinal (DHC) con la adición de H₂O₂ en raíces de *Uncaria tomentosa*, además observaron el incremento de la actividad

enzimática de peroxidasas aumentando la concentración de H_2O_2 . En cultivos de suspensiones celulares de *Salvia miltiorrhiza*, Dong *et al.* (2010), estudiaron el efecto a elicitación con ácido salicílico (AS) encontrando que incrementa la acumulación de compuestos fenólicos como fenilalanina amonio liasa (PAL), tirosina aminotransferasa (TAT) y la actividad enzimática de SOD, CAT y GPOX. Ali *et al.* (2008), en cultivos de raíces *Panax ginseng*, en sistema de biorreactores evaluaron la adición de CO_2 , disminuyendo la acumulación de ginsenósidos, por lo contrario, obtuvieron un incremento tanto en la actividad enzimática y no enzimática. Ali *et al.* (2006), en cultivos de raíces en biorreactor de *Panax ginseng* indujeron la actividad antioxidante y la producción de saponinas con cobre (Cu) a diferentes concentraciones, demostrando la existencia del estallamiento oxidativo. Ali *et al.* (2005a), a escala biorreactor en cultivos de raíces de *Panax ginseng* aumentaron la concentración de CO_2 encontrando que hubo un incremento en la concentración de fenoles y flavonoides. Ali *et al.* (2005b), indujeron la respuesta del sistema antioxidante en cultivo en biorreactor de raíces de *Panax ginseng* modificando los niveles de O_2 . La producción de ginsenósidos se incrementó, así como la actividad antioxidante enzimática.

En *S. rebaudiana*, se han reportado los siguientes trabajos de estrés oxidativo, Javed *et al.* (2016), observaron en plántulas micropropagadas de *S. rebaudiana*, el efecto en la actividad antioxidante por la adición de NPs ZnO de 0 a 1000 ppm, donde a 1 ppm obtuvieron la mayor producción de fenoles ($4.67 \text{ mg}_{\text{EqAG}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$). Álvarez-Robles *et al.* (2016), adicionaron concentraciones de metanol (0.1%, 0.5%, 1.5% y 2.5%) en brotes de *S. rebaudiana*, el mayor contenido de fenoles de $90.32 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{EqAG}}/\text{g}_{\text{p.s.}}$ con 1.5% de metanol. Desai *et al.* (2015), observaron la fitotoxicidad de la adición de diferentes concentraciones de NPs ZnO (50, 100, 200, 400 y 1000 mg/L) en plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana*, encontrando que la maquinaria antioxidante enzimática fue actividad, encontrando que con 1000 mg/L se presentó la mayor actividad de CAT y SOD, mientras que para GPOX la mejor actividad fue con 100 mg/L. Rathore *et al.* (2014), evaluaron la influencia de NaCl (25, 50, 75, 100 y 125 mM) en dos cultivares de *S. rebaudiana*, observando que a 75 mM se obtuvo el mayor contenido de fenoles totales ($22.42 \text{ mg}/\text{g}_{\text{p.f.}}$).

3. Justificación

En cultivos de tejidos vegetales se ha demostrado que el estrés provocado ya sea por elicitores bióticos o abióticos estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno, desencadenando una cascada de señalización comandada por el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), provocando un desequilibrio entre las especies oxidantes y antioxidantes, favoreciendo así la producción de MetS. Ese aumento de MetS puede ser utilizado fisiológicamente por el cultivo vegetal como una estrategia antioxidante para recuperar el equilibrio oxidativo. El cultivo *in vitro* de raíces es atractivo biotecnológicamente como un sistema órgano diferenciado que permite estudiar las respuestas bioquímicas a factores de estrés y a partir de estas proponer estrategias que potencialicen la producción de MetS. La planta *S. rebaudiana* es de amplio interés ya que ha demostrado importantes beneficios en la salud. Diferentes estrategias de producción se han implementado como el establecimiento de cultivos *in vitro* de raíces en suspensión. Sin embargo, en cultivos *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* no existen reportes de la participación del estrés oxidativo y su regulación. Conociendo todo lo anterior, es importante estudiar el efecto la participación de los sistemas antioxidantes enzimático y no enzimático, en respuesta al estrés para obtener información de los procesos bioquímicos que se desarrollan en *S. rebaudiana*.

4. Hipótesis

La respuesta de los sistemas antioxidantes enzimático y no enzimático en cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana* se activará por elicitación abiótica.

5. Objetivo General

Evaluar el crecimiento, la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática en cultivos *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana* bajo el régimen de elicitación abiótica.

6. Objetivos Específicos

6.1.1 Obtener un cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*.

6.1.2 Estudiar el efecto de la adición de inductores abióticos sobre el crecimiento, producción de compuestos antioxidantes y la capacidad antioxidante enzimática en cultivos *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*.

6.1.3 Relacionar el papel del estrés oxidativo y la respuesta antioxidante en cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*.

7. Metodología

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan.

7.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado fueron plántulas micropropagadas de *S. rebaudiana* establecidas en el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan. Las raíces provenientes de medio semisólido se separaron de la plántula para su posterior establecimiento en medio líquido (Alvarado-Orea *et al.* 2014).

7.2 Establecimiento de raíces en medio líquido

Se colocaron explantes de las raíces de las plántulas en matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 50 mL de medio MS a la mitad (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 2% (p/v) de sacarosa y 0.5 mg/L de ácido indolbutírico (IBA). El pH del cultivo se ajustó a 6.3 previo a la esterilización a 121 °C por 15 min. Las raíces se mantuvieron en oscuridad y en fotoperiodo 16/8 luz/oscuridad a 25 ± 2 °C a 110 rpm de agitación orbital. Para el mantenimiento de la línea de cultivo *in vitro* de raíces se realizaron subcultivos cada 15 días.

7.3 Extracción e identificación de Glucósidos de Esteviol (GE)

7.3.1 Extracción de Glucósidos de Esteviol (GE)

Para llevar a cabo la extracción de GE a partir de raíces *in vitro* de *S. rebaudiana* se siguió la metodología reportada por Bondarev *et al.* (2001), modificada. La biomasa se liofilizó, se pulverizó, utilizando un mortero con pistilo y los GE se extrajeron de forma sucesiva dos veces con metanol: H₂O (80:20 v/v), en una relación de 10 mL por cada gramo de

biomasa, se sónico por 30 min. Posteriormente, se centrifugó por 15 min a 3500 rpm, el sobrenadante de la extracción sucesiva se aforo a 5 mL, se separó una alícuota de 0.5 mL para la cuantificación de fenoles totales, todas las muestras se concentraron hasta su peso constante.

7.3.2 Extracción en fase solida (SPE)

La extracción en fase solida se realizó con cartuchos Strata C₁₈-E de 100 mg/mL, siguiendo la metodología de Wöelwer *et al.* (2010). Los cartuchos se limpiaron con metanol (6 mL) y se acondicionaron con H₂O (6 mL). La preparación de la muestra se realizó resuspendiendo los extractos crudos en 200 µL de acetonitrilo: H₂O (80:20 v/v) y se llevó a 10 mL con H₂O, centrifugando a 3500 rpm por 15 min y fue recuperado el sobrenadante. Posteriormente, el sobrenadante se pasó por el cartucho de SPE, se lavó con H₂O (10 mL) y acetonitrilo: H₂O (20:80 v/v) (10 mL) y se secó por 15 min a flujo de aire. Los GE fueron eluidos con acetonitrilo: H₂O (80:20 v/v) (4 mL). Se llevó a sequedad para su posterior análisis.

7.3.3 Cromatografía en capa fina TLC

Los extractos de raíces de *Stevia rebaudiana* fueron resuspendidos en metanol: H₂O (80:20 v/v), con ayuda de micropipetas, se aplicaron en la placa de sílica gel 60 F₂₅₄ sin dañar la superficie. Se utilizaron como estándares el Reb A (1432-Sigma Aldrich), Est (50956-Sigma Aldrich) y ácido clorogénico (00500590-Sigma Aldrich). Para la separación del Est y Reb A en las placas, se utilizaron 3 fases móviles: acetato de etilo: etanol: acetona: H₂O (15:3:6:6 v/v/v/v) (S₁ y S_{1'}) (Londhe y Nanaware, 2013), cloroformo: MeOH: N-propanol: H₂O (5:6:1:4 v/v/v/v) (S₂) y N-butanol: ácido acético: H₂O (8:1:1 v/v/v) (S₃). Las placas se tiñeron con 3 soluciones reveladoras: orcinol 0.5% en metanol: ácido sulfúrico (95:5 v/v) (R₁), ácido fosfomolibdico diluido (R₂) y anisaldehído (R₃), seguido de un calentamiento de 2 a 4 min (Dacome *et al.* 2005; Reis *et al.* 2011). La identificación de

los GE y fenoles de las muestras se comprobó por comparación de los factores empleados (R_f) de los estándares Est, Reb A y Ácido Clorogénico.

Para determinar el R_f se utilizó la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{L_c}{L_s}$$

Donde:

L_c = Longitud que recorrió cada compuesto, desde la zona de punteo de la muestra hasta la altura alcanzada.

L_s = Longitud que recorrió el disolvente desde la zona de punteo hasta el frente del solvente.

Para la separación de los fenoles se utilizó la fase móvil (S2) acetato de etilo: ác. fórmico: ác. acético: H₂O (100:11:11:27 v/v/v/v) y se observaron a una longitud de onda de 254 nm dando una coloración azul fluorescente (Wagner y Bladt, 1996). El ácido clorogénico en las muestras se identificó con la comparación del R_f con el estándar.

7.3.4 Espectrofotometría de masas

La identificación de los GE por espectrofotometría de masas se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Shafii *et al.* (2012). Las fracciones de los extractos obtenidas por SPE se suspendieron en metanol: agua (80:20 v/v) a una concentración de 1 mg/mL, con respecto al peso seco de la fracción del extracto, después se llevaron a 30 ppm en metanol grado masas y se inyectaron por infusión directa al equipo de espectrometría de Masas LCQ Fleet ion trap LC/MSⁿ (ThermoScientific) a 10 μ L/min.

7.4 Cinética de crecimiento

Las raíces *in vitro* de *S. rebaudiana* se inocularon al 2% (p.f./v) en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL medio de cultivo MS a la mitad (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 2% (p/v) de sacarosa y 0.5 mg/L de IBA. La toma de muestra se llevó a cabo cada tercer día, separando la biomasa del medio del cultivo y secándola con papel filtro. Para la determinación del peso seco la muestra se liofilizó hasta llegar a peso constante

7.4.1 Índice de crecimiento

El índice de crecimiento (IC), se determinó mediante la ecuación:

$$IC = \frac{P_f}{P_{fi}}$$

Donde:

IC= Índice de crecimiento.

P_f = Valor del peso seco al final o toma de muestra durante el experimento.

P_{fi} = Valor del peso seco al inicio del experimento.

7.5 Cuantificación de Fenoles totales

Para determinar fenoles totales (FT) se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Singleton *et al.* (1999), modificada. Los extractos se resuspendieron en metanol: H₂O (80:20 v/v) teniendo una concentración final de 50 mg/mL. La mezcla de reacción consistió en 100 µL de extracto, 1 mL de Folin-Ciocalteu (10%) (F9252-Sigma Aldrich), 800 µL de carbonato de sodio (NaHCO₃) (1M) (230952-Sigma Aldrich). Se incubó por 60 min a temperatura ambiente y la absorbancia fue leída a 765 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS Optizen pop). Se realizó una curva de calibración (ver Anexo), utilizando

catequina como estándar (C1251-Sigma Aldrich) y la concentración de fenoles totales, se expresó en equivalentes de catequina/miligramo de extracto seco.

7.6 Cuantificación de Flavonoides

La cuantificación de flavonoides totales se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Dewanto *et al.* (2002). Los extractos fueron resuspendidos en metanol: H₂O (80:20 v/v) teniendo una concentración final de 50 mg/mL. La mezcla de reacción consistió en 125 µL de extracto, 375 µL de etanol, 25 µL cloruro de aluminio (AlCl₃) (10%) (237078-Sigma Aldrich), 25 µL acetato de potasio (CH₃CO₂K) (1 M) (P3542-Sigma Aldrich) y 700 µL H₂O. Se incubó por 30 min a oscuridad y la absorbancia fue leída a 415 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS Optizen pop). Se realizó una curva de calibración (ver Anexo), utilizando rutina (78095-Sigma Aldrich). La concentración de flavonoides totales fue expresada en equivalente de rutina/miligramo de extracto.

7.7 Experimentos de elicitación

7.7.1 Nanopartículas de óxido de Zn (NPs ZnO)

Las NPs ZnO fueron donadas por el Depto. de plásticos en la agricultura, Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo, Coah. Estas se agregaron a matraces Erlenmeyer 125 mL con 50 mL de medio de cultivo líquido en concentraciones finales de 5 ppm (T1) y 15 ppm (T2), los medios de cultivo después de adicionar las NPs ZnO se sonicaron durante 30 min. El pH del medio del cultivo se ajustó a 6.3 previo a esterilizarse y se esterilizaron a 120 °C por 15min. A cada matraz se agregó 2% (p.f./v) de raíces. La toma de muestra se realizó a los 5 días después de la adición de NPs ZnO. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

7.7.2 Peróxido de Hidrogeno (H₂O₂)

Se inocularon matraces Erlenmeyer con 50 mL de medio de cultivo líquido con 2% de raíces (p.f./v). A los 10 días de crecimiento se añadió dos concentraciones de peróxido de hidrógeno (250 µM y 500 µM), la toma de muestra se realizó los días 1, 3 y 5 posteriores a la adición. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

7.7.3 Metil Jasmonato (MeJa)

Se inocularon matraces Erlenmeyer con 50 mL de medio de cultivo líquido con 2% de raíces (p.f./v). A los 10 días de crecimiento se adicionaron dos concentraciones de metil jasmonato (250 y 500 µM). El metil jasmonato (392707-Sigma Aldrich) fue disuelto en etanol y esterilizado en frío con filtros de nylon de 0.48 µM previo a su uso (Mathew y Sankar, 2012). La colecta se realizó los días 1, 3 y 5 posteriores a la adición. El experimento se realizó por triplicado.

7.8 Actividad enzimática

7.8.1 Extracción y cuantificación de la actividad enzimática

Las raíces se congelaron y pulverizaron con ayuda de nitrógeno líquido, después se agregó una solución amortiguadora (Tabla 2), se probaron dos tipos de pH, para poder determinar cuál proporcionaba la mayor actividad enzimática por su comparación en geles de actividad (ver Anexo). El extracto se mezcló cuidadosamente. Se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. Todo se realizó a 4 °C. La proteína total se cuantificó por el método de Bradford, (1976) (500-0205 Vigorad), utilizando como estándar albúmina de suero de bovino (BSA) (500-0209 BioRad).

Tabla 2. Solución amortiguadora para la extracción de enzimas.

Enzima	Buffer de extracción
APX, CAT, GPX y PAL	NaPO ₄ 100 mM a pH 7, 1% PVPP, 1 mM EDTA
APX, CAT, GPX y PAL	NaPO ₄ 100 mM a pH 7, 1% PVPP, 1 mM EDTA y 5 mM ascorbato

7.8.1.1 Actividad enzimática de APX (EC: 1.11.1.11)

La actividad de APX se cuantificó por el método descrito por Nakato y Asada, (1987), siguiendo la descomposición del H₂O₂ dependiente del ascorbato. La mezcla de reacción consistió en tomar extracto crudo de proteínas, solución amortiguadora de Na₂HPO₄ 50 mM pH 7, EDTA 0.1 mM, Ascorbato 0.1 mM y H₂O₂ 0.1 mM. Se leyó a 290 nm al espectrofotómetro (UV/VIS Optizen pop). La actividad de APX fue calculada utilizando el coeficiente de extinción del ascorbato (2.8 M cm⁻¹) y se expresó como μM/g_{prot}*min.

7.8.1.2 Actividad enzimática de CAT (EC: 1.11.1.6)

La actividad de CAT se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Aebi, (1984). La mezcla de reacción consistió en una solución amortiguadora de Na₂HPO₄ 100 mM a pH 6.8, 25 mM de H₂O₂ y extracto enzimático. La disminución de la absorbancia debido al agotamiento del H₂O₂ fue leída a 240nm en un espectrofotómetro (UV/VIS Optizen pop). La actividad de CAT se calculó usando el coeficiente de extinción de H₂O₂ (40 M cm⁻¹) y expresada como μM/g_{prot}*min.

7.8.1.3 Actividad enzimática de GPOX (EC:1.11.1.7)

La actividad enzimática de GPOX, se cuantificó por la oxidación del guayacol utilizando el método propuesto por Pütter, (1971). La mezcla de reacción contenía extracto crudo de proteínas, solución amortiguadora de Na₂HPO₄ 100 mM pH 6, 25 mM H₂O₂ y 25 mM guayacol. La absorbancia fue leída a 470 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS Optizen pop). La actividad enzimática se determinó como la cantidad de proteína necesaria para oxidar 1 μmol de guayacol por minuto.

7.8.1.4 Actividad enzimática de PAL (EC: 4.3.1.5)

La actividad enzimática de PAL se cuantificó utilizando la metodología descrita por Fritz *et al.* (1976). La mezcla de reacción consistió en extracto enzimático, una solución amortiguadora de Tris-HCl pH 8.5 150 mM, H₂O desionizada y como sustrato 2 mM de fenilalanina. La absorbancia se leyó a 270 nm (UV/VIS Optizen pop). La actividad de PAL fue calculada con el coeficiente de extinción de ácido cinámico (19.73 mM cm⁻¹) y fue expresada como μM/g_{prot}*min.

8. Resultados y Discusión

8.1 Establecimiento del cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*

El cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* fue iniciado con explantes de raíces provenientes de cultivos de plántulas crecidas en medio semisólido, éstas se cortaron separándolas de la parte aérea de la plántula y fueron colocadas en matraces que contenían medio líquido de MS a la mitad suplementado con 2% de sacarosa y 0.5 g/L de IBA (Fig. 6), bajo dos regímenes lumínicos: 1) oscuridad y 2) fotoperiodo 16/8 h.



Figura 6. Establecimiento del cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*. **A)** Raíces de plántulas en medio semisólido y **B)** Cultivo de raíces en medio líquido.

Se observó que la coloración entre los dos cultivos de raíces fue diferente; las que se encontraban en oscuridad se observaron incoloras y las raíces en fotoperiodo se tornaron de color verde (Fig. 7). Esto puede deberse a la capacidad intrínseca de los plástidos a diferenciarse a cloroplastos en las raíces, o al menos ciertas regiones de raíces de algunas plantas han mostrado conversión de amiloplastidos a cloroplastos (Kirk y Tilney - Bassett, 1978).

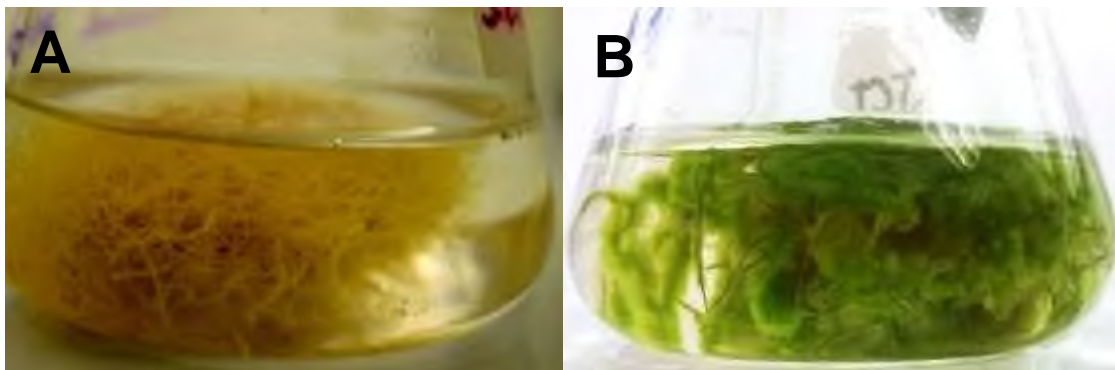


Figura 7. Raíces *in vitro* de *Stevia rebaudiana* **A)** Oscuridad y **B)** Fotoperiodo.

Las raíces, *in vivo* o *in vitro*, pueden llegar a ser verdes cuando se cultivan bajo luz, esta capacidad varía ampliamente entre especies de plantas (Torrey y Clarkson, 1975). Flores *et al.* (1988), concluyeron que cultivos de raíces transformadas, especialmente de la especie *Asterácea*, son capaces de tomar coloración verde. Flores *et al.* (1993), evaluaron la morfología fotosintética de cultivos de raíces de *B. sulphureus* y *A. oppositifolia* por microscopía de luz y microscopio electrónico de transición (TEM), observando que las raíces de *A. oppositifolia* mantuvieron su anatomía de raíz típica. Los plástidos que se encuentran en las células corticales de ambas especies tienen tilacoides diferenciados y granos de almidón que son, en general, muy similares a los cloroplastos que se encuentran en las hojas. En contraste, los plástidos de las células corticales de las raíces cultivadas en la oscuridad permanecieron en gran medida indiferenciados y en algunos casos se formaron gránulos de almidón.

En las plantas, los genes implicados en la fotosíntesis se codifican por separado en los núcleos y plástidos, y por lo tanto se requiere la cooperación estrecha entre estos dos genomas para el desarrollo de los cloroplastos funcionales. Sin embargo, se sabe muy poco sobre el potencial fotosintético de la raíz, las condiciones que favorecen su expresión, o cuán extendido está su capacidad metabólica.

8.2 Análisis químico de los metabolitos secundarios presentes en las raíces *in vitro* de *S. rebaudiana*

Con el fin de conocer el perfil metabólico del cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* en TLC, se probaron diferentes fases móviles.

8.2.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

Para la identificación de GE de los extractos metanólicos de raíces *in vitro* de *S. rebaudiana*, se utilizaron 3 fases móviles: acetato de etilo: etanol: acetona: H₂O (15:3:6:6 v/v/v/v) (S₁ y S_{1'}); para las cuales se utilizaron dos reveladores diferentes: orcinol 0.5% (R₁) (Fig. 8A) y ácido fosfomolibdico diluido (R₂) (Fig. 8B), las otras dos fases móviles fueron cloroformo: MeOH: N-propanol: H₂O (5:6:1:4 v/v/v/v) (S₂) (Fig. 8C) y N-butanol: ác. acético: H₂O (8:1:1 v/v/v) (S₃) (Fig. 8D), reveladas con Anisaldehido (R₃). Cabe destacar que de las muestras 1 y 2 de las Fig. 8C y D se puntaron 16 µg y 48 µg de extracto respectivamente. Además, que son precisamente en estos dos cromatogramas donde se observa una mayor definición en las bandas correspondientes al Est y Reb A comparadas con los estándares.

Por otro lado, también se realizó un cromatograma para la identificación de compuestos fenólicos (Fig. 9) de los extractos metanólicos de las raíces *in vitro* de *S. rebaudiana*, para la cual se utilizó la siguiente fase móvil: acetato de etilo: ác. fórmico: ác. acético: H₂O (100:11:11:27 v/v/v/v) (S₄). Teniendo en el carril 1 y 3 extractos de raíces *in vitro* de *S. rebaudiana* y en el carril 2 el estándar ácido clorogénico. Por otra parte, se aprecian otras dos bandas en la parte superior del cromatofolio, donde los R_f calculados son de 0.8 y 0.9, comparadas con los R_f reportados, probablemente se trata de ácido iso-clorogénico, ácido ferúlico o ácido cafeico, respectivamente (Wagner y Bladt, 1996).

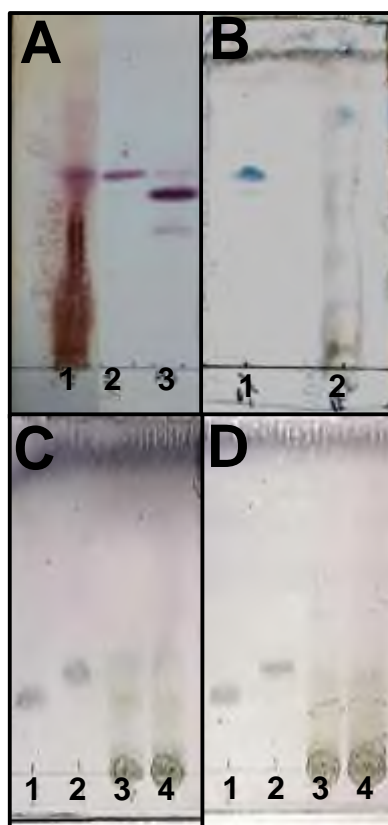


Figura 8. Identificación de GE en extractos de raíces *in vitro* de *S. rebaudiana*. **A)** 1-Muestra, 2-Est y 3-Reb A. **B)** 1-Est y 2-Muestra. **C y D)** 1-Reb A, 2-Est, 3-Muestra y 4-Muestra.



Figura 9. Identificación de compuestos fenólicos en extractos de raíces *in vitro* de *S. rebaudiana*. **1 y 3,** Extracto de raíces. **2,** ácido clorogénico.

Los Rf obtenidos tanto para la identificación de GE como para los compuestos fenólicos fueron comparados con los obtenidos con los estándares, presentados en la Tabla 3.

Tabla 3. Rf de los extractos metanólicos del cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* utilizando las fases: S₁, S_{1'}, S₂, S₃ y S₄.

Compuesto	Rf S ₁	Rf S _{1'}	Rf S ₂	Rf S ₃	Rf S ₄	Rf estándar
Reb A	0.31	0.58	0.28	0.22	-	0.31
Est	0.4	0.60	0.29	0.30	-	0.4
Ác. Clorogénico	0.4				0.47	0.47
Ác.	-				0.8*	-
Isoclorogénico	-				0.9*	-
Ác. cafeico	-				0.9*	-
Ác. ferúlico						

*Rf comparado con lo reportado por Wagner y Bladt, (1996).

8.2.2 Identificación de GE por espectrometría de masas

Se demostró la capacidad de producción de GE en el cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* por espectrometría de masas mediante la identificación de los iones moleculares y sus patrones de fragmentación correspondientes, como se muestra en la Fig. 10 y Tabla 4. En la Fig. 10A se observa el ión molecular $[M-H]^- = 803$ correspondiente al Est, además, se confirmó su identificación por comparación con el espectro de fragmentación del estándar Est (S3572-Sigma Aldrich) (Fig. 11).

Mientras que el ión molecular $[M-H]^- = 317$ de la Fig. 8B, puede corresponder a esteviol o isoestevoliol, esto de acuerdo con lo reportado con Shafii *et al.* (2012) y Gardana *et al.* (2010). Además, fue tentativamente identificado el ión molecular $[M-H]^- = 641$ que puede corresponder al esteviolbíosido o rubusósido (Tabla 4).

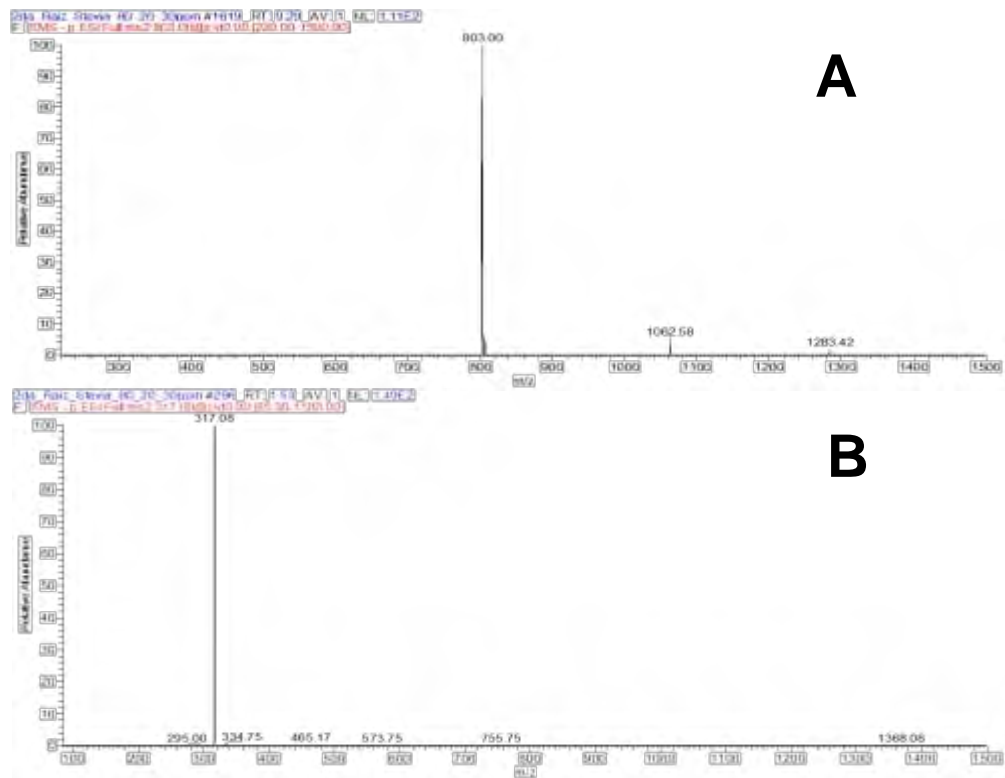


Figura 10. Espectros de GE producidos en cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* obtenidos por la técnica de infusión directa en metanol. **A)** Est y **B)** esteviol o isoesteviol.

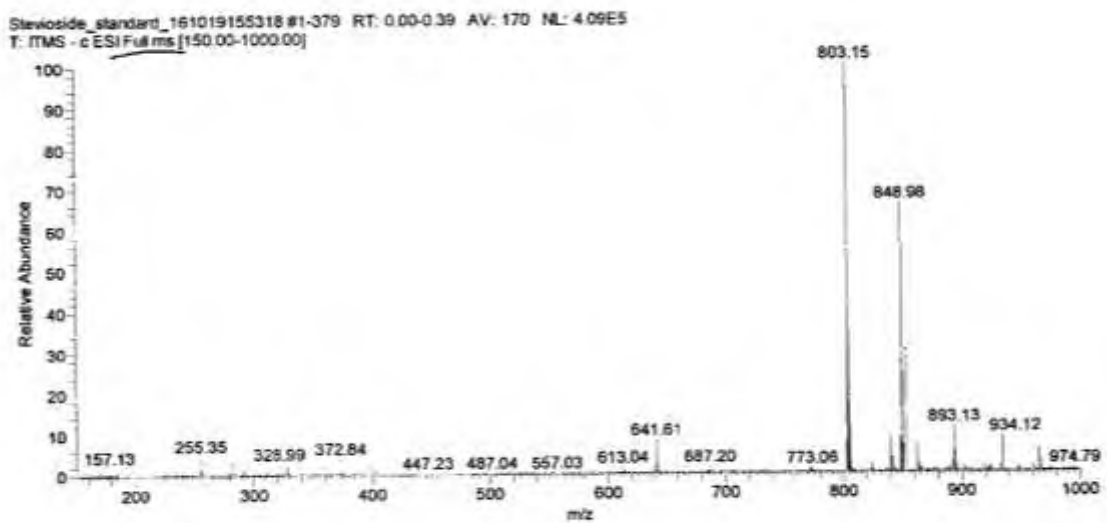


Figura 11. Espectro del Est obtenido por la técnica de infusión directa a 5 ppm en metanol.

Cabe señalar que en la metodología estándar de inyección por infusión directa al espectrómetro de masas normalmente se inyectan 5 ppm en base al peso seco del extracto.

En este caso para lograr identificar los GE en el extracto de raíz fue necesario inyectar a 30 ppm por lo que se deduce que la producción de GE es baja. Es probable que, por este motivo, trabajos anteriores no reportaron presencia de GE en cultivos *in vitro* raíces de *S. rebaudiana* (Yamasaki y Flores 1991; Reis *et al.* 2011; Fu *et al.* 2014). Este es el primer reporte que demuestra la producción de GE en cultivo *in vitro* de raíces *S. rebaudiana*.

Tabla 4. Identificación de GE en cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana*.

Ion molecular [H-H] ⁻	MS ²	MS ³	MS ⁴	Compuesto	Fuente	Parte de la planta
803	641; 624; 461; 317	479; 413; 521; 593	317	Esteviósido	Gardana <i>et al.</i> 2010; Pól <i>et al.</i> 2007	Hojas de <i>S. rebaudiana</i>
317	249; 273; 299; 231	180; 113; 205	-	Esteviol o isoesteviol	Gardana <i>et al.</i> 2010; Shafii <i>et al.</i> 2012	Hojas de <i>S. rebaudiana</i>
641	-	-	-	Esteviolbiósido o rubusósido	Gardana <i>et al.</i> 2010	Hojas de <i>S. rebaudiana</i>

[H-H]⁻ = Ion molecular en modo negativo.

MSⁿ (MS², MS³ y MS⁴) = Espectrometría en múltiples etapas.

8.3 Cinética de crecimiento

Para llevar a cabo la cinética de crecimiento, se inocularon con 2% de peso fresco (g_{p.f.}/v) de raíces, matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio líquido descrito en el apartado 6.2. La cinética se realizó durante 25 días. En la Fig. 12, se muestra la cinética de crecimiento de las raíces *in vitro* de *S. rebaudiana*, donde se encontró que la máxima

biomasa obtenida fue a los 20 días con 10.24 g_{p.s.}/L, teniendo una velocidad de crecimiento de 0.090 d⁻¹ y un tiempo de duplicación de 7.61 días. El incremento en la biomasa fue 5.6 veces mayor con respecto al inóculo inicial.

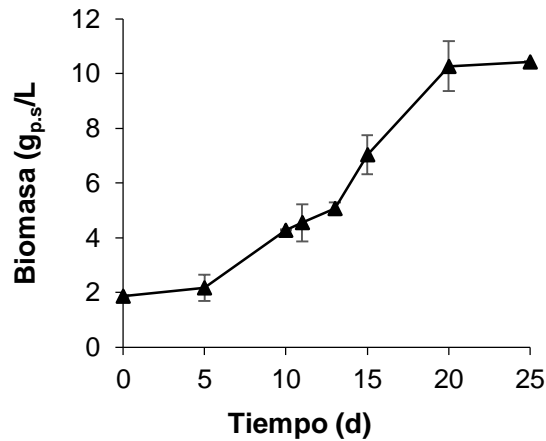


Figura 12. Cinética de crecimiento del cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*.

Reis *et al.* (2011), determinaron la productividad de cultivos de raíces *in vitro* crecidas en sistema de botella rodada y como esto dependía de la densidad del inóculo. Las biomásas iniciales fueron: 0.2, 0.3, 1.0, 2.0 y 4.0 g, la densidad óptima de inóculo fue de 0.2 g, ya que permitió un mejor desarrollo de las raíces, donde se alcanzó entre las semanas 4 y 5 su máximo crecimiento, siendo 13 veces más con respecto al inóculo inicial. En el 2013, Mathur y Shekhawat, evaluaron la dinámica de crecimiento en cultivos celulares de *S. rebaudiana* durante 28 días, demostrando que al día 14 de crecimiento, el cultivo alcanzó su máximo crecimiento, siendo 4.6 veces mayor con respecto al inóculo (10% v/v), teniendo un tiempo de duplicación de 26.35 h. Por otro lado, Fu *et al.* (2014), en cultivo *in vitro* de raíces transformadas de *S. rebaudiana* observaron que su máxima acumulación de biomasa fue entre los días 24-27, alcanzando 22.2 g_{p.s.}/L, 48 veces más comparado al inóculo. Por último, Min *et al.* (2007), señaló que altas densidades de inóculo resulta en un crecimiento pobre debido a que las raíces adventicias alcanzan

rápidamente su fase estacionaria, lo que limita la disponibilidad de oxígeno y nutrientes y por lo tanto afecta la producción de metabolitos secundarios.

Nuestros resultados demuestran tener una buena productividad en cuanto al crecimiento con respecto al inóculo inicial, obtuvimos la mitad de la biomasa comparado con lo reportado por Fu *et al.* (2014), tomando en cuenta que sus cultivos de raíces eran transformadas, las cuales muestran un crecimiento vigoroso en medio libre de fitohormona.

8.4 Elicitación abiótica en cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*

8.4.1 Efecto de la adición de NPs ZnO en la actividad antioxidante no enzimática

8.4.1.1 Cuantificación de fenoles totales

Se cuantificó la acumulación de fenoles totales por efecto de la adición de NPs ZnO en el cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana*, se observó que el contenido de fenoles en el control fue de 188.22 $\mu\text{g}_{\text{ECQ}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$, mientras que a 5 y 15 ppm disminuyeron su acumulación alrededor del 55% y 90%, respectivamente (Fig. 13). Javed *et al.* (2016), observaron en plántulas micropropagadas de *S. rebaudiana*, que con la adición de 1 ppm NPs ZnO se obtuvo la mayor producción de fenoles 4.67 $\mu\text{g}_{\text{EqAG}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$. Comparando nuestros resultados con los obtenidos por Javed *et al.* (2016), se podría suponer que la concentración adicionada a los cultivos *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* fue muy elevada y que los fenoles pudieron haber actuado como el primer mecanismo de defensa de la planta.

Krishnaraj *et al.* (2012), evaluaron el efecto de la adición de 10 ppm de NPs Ag sobre el contenido de fenoles totales en plántulas de *Bacopa monnieri* (Linn.) cultivadas en hidroponía bajo fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) durante 30 días. El análisis del contenido de fenoles totales en las plantas tratadas con NPs Ag cambió hacia el metabolismo secundario incrementando acumulación de fenoles con respecto al tiempo, siendo la raíz la que presentaba un mayor contenido de fenoles totales comparada con

las hojas y tallo. Además, una reducción en los niveles de proteínas y carbohidratos después del décimo día de tratamiento coincidió con un aumento significativo en el contenido fenólico. Tales respuestas se han reportado en plantas bajo estrés por metales pesados, así como de patógenos. En la mitigación del estrés por metales pesados, se ha descrito que los derivados fenólicos actúan como quelantes metálicos y como antioxidantes, reduciendo la formación de ERO.

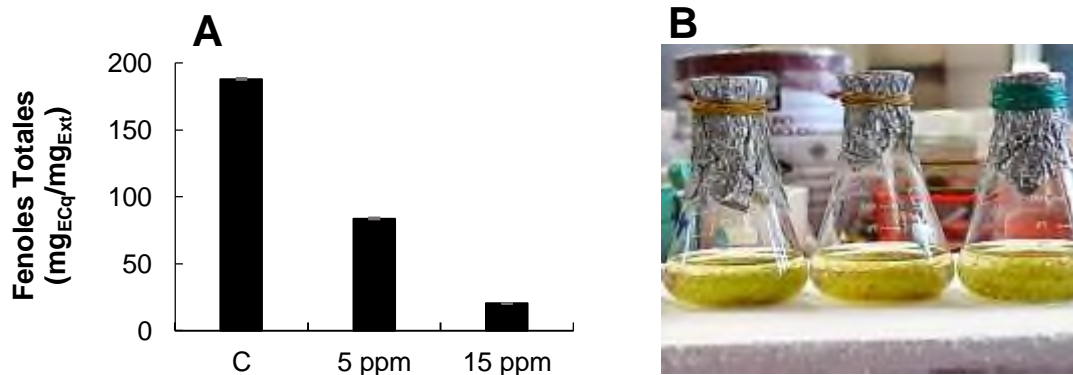


Figura 13. Efecto de la adición de NPs ZnO en la acumulación de Fenoles totales intracelular en cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana*. La adición del elicitador se realizó al tiempo cero, la toma de muestra se realizó 5 días posteriores a la adición. **A)** Producción de Fenoles totales y **B)** Raíces de *S. rebaudiana* a los 5 días a la exposición a NPs ZnO.

AL-Oubaidi y Kasid, (2015), demostraron el aumento de la producción de metabolitos secundarios (compuestos fenólicos y flavonoides) en callos de *Cicer arietinum* expuestos a diferentes concentraciones de NPs TiO₂ (0.5, 1.5, 3, 4.5 y 6 mg/L). Los resultados revelaron que las concentraciones de 4.5 y 6 mg/L estimularon mayormente la producción de estos metabolitos.

Se ha demostrado que la adición de NPs altera el metabolismo secundario en plantas incrementando la producción de ERO el cual se lleva a cabo mediante estallamiento oxidativo, así mismo diversos estudios han puesto en evidencia que las plantas tratadas con NPs incrementan la producción de compuestos fenólicos y que estos actúan como

moléculas antioxidantes contrarrestando la producción de ERO (Marslin *et al.* 2017). Similar a lo anterior reporta Huerta-Heredia *et al.* (2009), donde evaluaron la estimulación de MOA y DHC por la adición de diferentes concentraciones (200, 800 y 1000 μM) de H_2O_2 provocando estallamiento oxidativo en cultivos raíces de *U. Tomentosa*. Incrementaron la producción de MOA un 56% comparado con el control con la adición de 800 y 1000 μM de H_2O_2 , sin embargo, en raíces tratadas con 800 y 1000 μM de H_2O_2 la acumulación de DHC se redujo comparadas con el control un 30-40%. La disminución de DHC podría estar relacionada con un papel de protección en las raíces de *U. tomentosa* al ser oxidada por la presencia de H_2O_2 .

Con lo anterior es posible sugerir que los resultados mostrados en la reducción en la acumulación de fenoles por la adición de NPs ZnO a los cultivos *in vitro* de *S. rebaudiana*, estos compuestos podrían ser las primeras moléculas en ser oxidadas como respuesta del mecanismo antioxidante no enzimático provocado por el estrés oxidativo. Algunos estudios también han demostrado que el tratamiento de plantas y microorganismos fotosintéticos con NPs producen una mayor producción de compuestos fenólicos (Comotto *et al.* 2014; Ghorbanpour y Hadian, 2015; Večeřová *et al.* 2016), y que podrían actuar como antioxidantes para la depuración las ERO (Franklin *et al.* 2009).

8.4.1.2 Actividad enzimática

Por efecto del estrés oxidativo se observó un aumento en la actividad enzimática y los procesos que producen H_2O_2 y O_2^- o debilitando la función de los sistemas antioxidantes, permitiendo la formación de ERO más oxidantes como OH^- . Entre los metales pesados, Fe^{2+} y Cu^{1+} que se producen normalmente en las células, puede reaccionar con H_2O_2 y OH^- que se forma a través de la reacción de Haber-Weiss. Una de las principales consecuencias de acción de los metales pesados es incrementar la producción de ERO, que por lo general daña órganos celulares tales como membranas, ácidos nucleicos, pigmentos y cloroplastos (Maksymiec, 2007). Por lo anterior se determinó la actividad enzimática perteneciente al sistema antioxidante.

En la Fig. 14 se muestra la actividad de GPOX, CAT, APX y PAL, donde se observa que la actividad de GPOX (Fig. 14a), incrementa conforme se aumentó la concentración de NPs ZnO, hasta 11 veces para T2 comparado con el control ($49 \pm \mu\text{M}/\text{g}_{\text{prot}} \cdot \text{min}$). Mientras que, la actividad de CAT (Fig. 14b) incrementó 2.5 veces más para T2 ($2.09 \pm \text{mM}/\text{g}_{\text{prot}} \cdot \text{min}$). Se ha demostrado que el principal efecto de muchos metales pesados puede ser el resultado de una mayor actividad de la NADPH oxidasa que está parcialmente relacionado con el aumento en la formación de O_2^- . Por otro lado, la actividad de APX (Fig. 14c) disminuyó hasta 1.24 veces con la adición de 15 ppm NP ZnO. La actividad de PAL (Fig. 14d) se muestra que con el incremento en la concentración del elicitor disminuyó su actividad en 41% y 63% para T1 y T2 respectivamente, comparadas con el control ($59 \pm \mu\text{M}/\text{g}_{\text{prot}} \cdot \text{min}$), teniendo congruencia con los datos de fenoles totales anteriormente descritos.

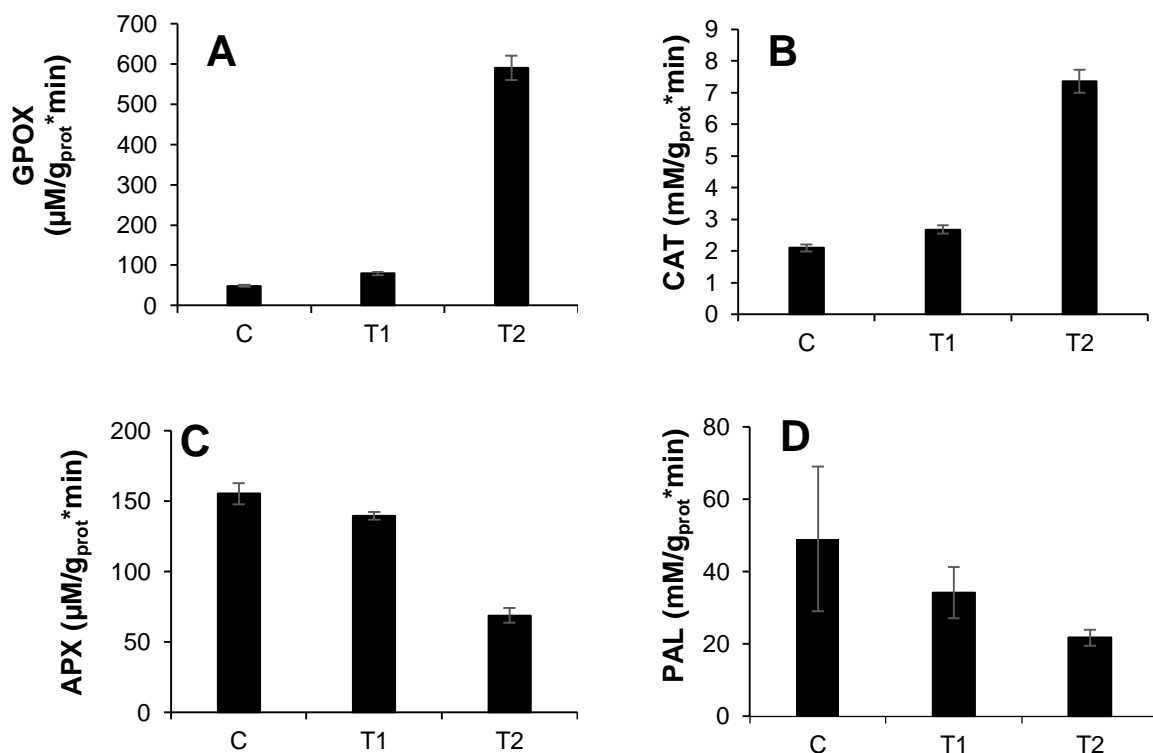


Figura 14. Efecto de las NPs ZnO en cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* a los 5 días de exposición en la actividad de **A)** GPOX, **B)** CAT, **C)** APX, **D)** PAL.

Desai *et al.* (2015), observaron la fitotoxicidad de la adición de diferentes concentraciones de NPs ZnO (50, 100, 200, 400 y 1000 mg/L) en plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana*, encontrando que la maquinaria antioxidante enzimática fue activada, con 1000 mg/L obtuvieron la mayor actividad de CAT y SOD, mientras que para POX, la mejor actividad se presentó con 100 mg/L. Resultados similares fueron reportados por Schützendübel *et al.* (2002), en raíces de *Populusx canescens* donde indujeron el estrés oxidativo por la adición de cadmio (Cd) donde a las 48 h pierden por completo la actividad de APX a una concentración de 50 μ M de Cd, asociándolo al incremento en la acumulación de H₂O₂. Piqueras *et al.* (1999), sugiere que la estimulación de un estrés oxidativo y la inhibición de enzimas antioxidantes son el resultado de la excesiva acumulación de H₂O₂.

Mirzajani *et al.* (2014), reportaron la adición de NPs Ag en raíces *O. sativa* presentaron un incremento en la actividad de SOD, APX y glutatión-S-transferasa (GST). De igual forma, Tripathi *et al.* (2017), estimularon con NPs Ag las actividades de SOD y APX significativamente, por lo contrario, inhibieron el glutatión reductasa (GR) y el DHAR en plántulas de *Pisum sativum* L. Por otro lado, Dimkpa *et al.* (2012), en raíces de trigo, la actividad de catalasa (CAT), otra enzima que protege a las células del daño oxidativo fue elevada significativamente tras el tratamiento con 500 mg/kg NPs CuO. Además, en plantas de maíz germinadas y cultivadas en suelos modificados con 400 y 800 mg/kg de NPs CeO₂ mostraron un aumento en la acumulación de H₂O₂ dependiente de la concentración después de 10 días, pero al día 20 no mostró ninguna diferencia. Un patrón similar se observó en el incremento de las actividades de CAT y APX que contrarrestan la peroxidación lipídica en las plántulas de maíz tratadas con NPs CeO₂ (Zhao *et al.* 2012).

Los resultados obtenidos por la adición de NPs ZnO a las raíces *in vitro* de *S. rebaudiana* coinciden con lo reportado en otros sistemas, donde la adición de NPs inducen al estallamiento oxidativo activando el mecanismo de defensa antioxidante enzimático. Sin embargo, las actividades de PAL junto con la producción de fenoles disminuyeron con el

incremento de las concentraciones de NPs ZnO, podría sugerirse que esta enzima pudo haber estado activa en las primeras horas de la adición de las NPs llevando a cabo la síntesis de fenoles para poder usarlos como moléculas antioxidantes y contrarrestar el estrés oxidativo. Por otro lado, se ha demostrado que altas concentraciones de metales pesados pueden inhibir el ciclo del ascorbato-glutatión, suponemos que por esta razón la actividad de APX disminuyó con el incremento en la concentración de NPS ZnO.

8.4.2 Efecto de H₂O₂ en cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana*.

8.4.2.1 Crecimiento

Se adicionaron 250 y 500 µM de H₂O₂ a las raíces de *S. rebaudiana*, al quinto día de exposición en ambas concentraciones se vio afectado considerablemente el crecimiento (Fig. 15a). Disminuyendo un 34% para 250 µM y un 41% para 500 µM con respecto al control (7.02 g_{p.s.}/L).

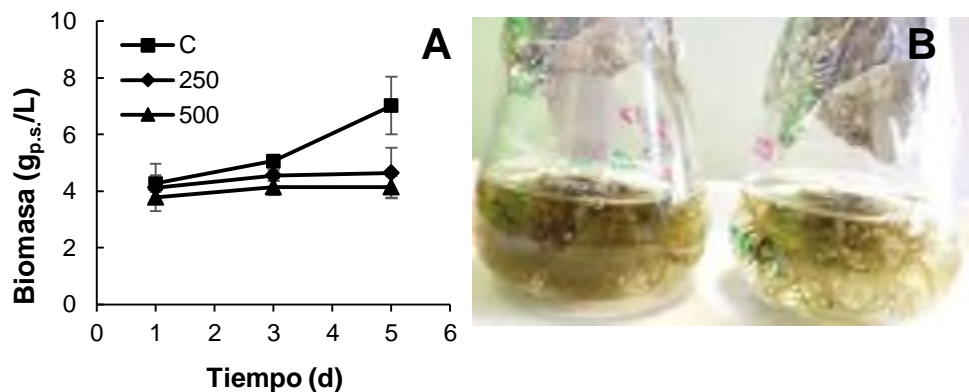


Figura 15. Efecto en el crecimiento por la adición de H₂O₂ en cultivos *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana*. La adición del elicitor se realizó a los 10 días de crecimiento, la cosecha se realizó con 1,3 y 5 días de exposición al H₂O₂. **A)** Control (■), cultivos elicitados con 250 µM de H₂O₂ (◆) y cultivos elicitados con 500 µM de H₂O₂ (▲), **B)** cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* a los 5 días de exposición a H₂O₂.

Según lo reportado por Huerta-Heredia *et al.* (2009), en cultivos de raíces de *U. tomentosa* expuestas a diferentes concentraciones de H₂O₂ (200, 400, 800 y 1000 µM),

donde con 800 y 1000 μM perdieron un 25% de crecimiento desde el 5^{to} día de exposición. Dunan *et al.* (2007), evaluaron en plántulas de *Arabidopsis* a varios compuestos que incrementan la actividad de las ERO, además de las consecuencias que estas tienen en el desarrollo de la raíz, demostrando que un exceso de H_2O_2 puede llegar a reducir considerablemente su crecimiento. Rojo y Delgado, (2010), encontraron que la adición de 1 y 5 mM de H_2O_2 en plántulas *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. redujo la longitud del brote en un 15.03 y 34.64% con respecto al control (6 mm). Resultados similares fueron presentados por Pnueli *et al.* (2003), demostrando que la acumulación de H_2O_2 en plantas de *Arabidopsis* sp. inhibió el crecimiento y desarrollo vegetal, sugiriendo que el incremento de H_2O_2 intracelular activa la expresión de factores de transcripción involucrados en el control del crecimiento.

8.4.2.2 Actividad antioxidante no enzimática

8.4.2.2.1 Cuantificación de fenoles, flavonoides totales y PAL

Los resultados de la acumulación de fenoles totales en raíces de *S. rebaudiana* por efecto de la adición de H_2O_2 (Fig. 16a), demuestran que, al día 1 se obtuvo la mayor acumulación de fenoles, a 250 μM incrementó 0.35 veces más que el control (546.09 $\mu\text{g}_{\text{ECq}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$), por lo contrario, a 500 μM de adición exógena de H_2O_2 , la acumulación de fenoles totales fue incrementando teniendo su máxima acumulación al día 5 con 0.42 veces más que el control (421.93 $\mu\text{g}_{\text{ECq}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$). Por otro lado, la producción de flavonoides totales (Fig. 16b) en raíces expuestas a 250 μM , su máxima acumulación fue al día 5 con 10.4 veces más que el control (34.63 $\mu\text{g}_{\text{ER}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$) mientras que, a 500 μM de H_2O_2 su mayor producción fue al tercer día con 4.13 veces más comparado con el control (57.40 $\mu\text{g}_{\text{ER}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$). La actividad de PAL (Fig. 16c) presentó un comportamiento similar que la producción de fenoles y flavonoides totales, siendo el día 5 donde se observó que para 250 y 500 μM incrementó 3 y 2.5 veces más su actividad con respecto al control (5.49 $\mu\text{M}/\text{mg}_{\text{prot}}*\text{min}$).

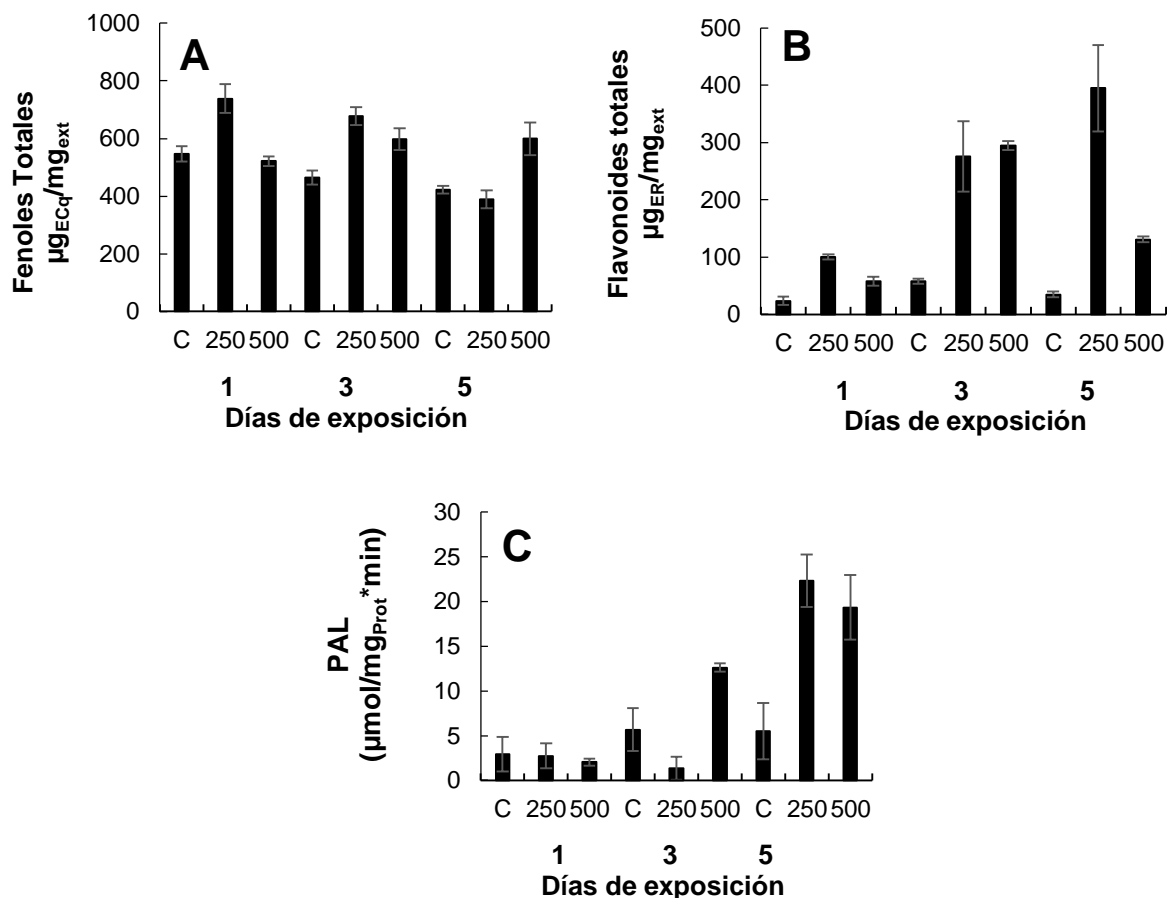


Figura 16. Efecto de la adición de H_2O_2 en cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* en la acumulación de **A)** Fenoles, **B)** Flavonoides totales y **C)** la actividad de PAL a los 1, 3 y 5 días de exposición.

Javed *et al.* (2017), estudiaron el efecto del estrés provocado por la adición exógena de 10 y 20 mM de H_2O_2 a plántulas de *S. rebaudiana* con un tiempo de exposición de 6 h. La mayor acumulación de fenoles y flavonoides totales fue observada con 10 mM de H_2O_2 , demostrando que *S. rebaudiana* tiene la capacidad de sobresalir del estrés con la ayuda de estas moléculas antioxidantes. Arencibia *et al.* (2012), indujeron el estrés oxidativo en plántulas de caña micropropagadas en biorreactores de inmersión temporal, con la adición de H_2O_2 a diferentes concentraciones (5, 10, 20 y 50 mM), observando que con la aplicación de 5 mM de H_2O_2 incrementó la producción de compuestos fenólicos.

Hao *et al.* (2014), estudiaron el efecto de la adición de ácido salicílico (AS) y H₂O₂ a suspensiones celulares de *Salvia miltiorrhiza*, la adición de 10 mM de H₂O₂ indujo la actividad de PAL y la producción de ácido rosmarínico. Diferentes investigaciones demuestran que las plantas tienen un sistema de respuesta a los elicitores, incluyendo activación de enzimas y la producción de metabolitos secundarios, los cuales no solo están regulados por las vías de señalización, sino también por un cross-talk de moléculas señal (Wang *et al.* 2011; Guo *et al.* 2014). El AS induce a la producción de H₂O₂ que a su vez puede promover la actividad de PAL y la producción de metabolitos secundarios, siendo el H₂O₂ un segundo mensajero en la traducción de señales cuando se aplica AS. Algunas enzimas antioxidantes, genes y metabolitos funcionan como principales protectores ante el estrés oxidativo en plantas. Guo *et al.* (2014), adicionaron AS a cultivos de celulares de *Salvia miltiorrhiza*, donde incrementaron la acumulación de ácido salvianólico B, demostraron que el AS puede incrementar los niveles de H₂O₂ y que existe una relación entre el AS y H₂O₂ ya que pudiera funcionar como un segundo mensajero para la producción de MetS. La inhibición de la producción de H₂O₂, demostró que no hubo una disminución significativa, proponiendo un mecanismo entre Ca²⁺, óxido nítrico, la activación de factores de transcripcionales y de genes, AS y ERO de señalización pudieran estar involucrados para producir una cantidad considerable de H₂O₂ basal para cubrir las necesidades de la célula.

8.4.2.3 Actividad antioxidante enzimática

Para evaluar el mecanismo de defensa antioxidante enzimático de las raíces de *S. rebaudiana* expuestas a H₂O₂, se cuantificó la actividad de GPOX, CAT y APX, enzimas que contrarrestan la formación de ERO. La mayor actividad de GPOX (Fig. 17a) se observó al día 5 para las dos concentraciones 250 y 500 µM de H₂O₂ con 1.02 y 0.61 veces más comparados con el control (11.49 mM/mg_{prot}*min). Para la actividad de CAT (Fig. 17b) la mayor actividad se obtuvo al día 3 con 0.50 y 1.44 veces más comparado al control (10.08 µM/mg_{prot}*min) para 250 y 500 µM, respectivamente. Por otro lado, la actividad de APX (Fig. 17c), en los primeros 3 días disminuyó en un 26% para 250 µM

mientras que para 500 μM perdió un 78% de su actividad, pero al día 5 su actividad fue parecida al control (295.24 $\mu\text{M}/\text{mg}_{\text{Prot}} \cdot \text{min}$) en ambas concentraciones.

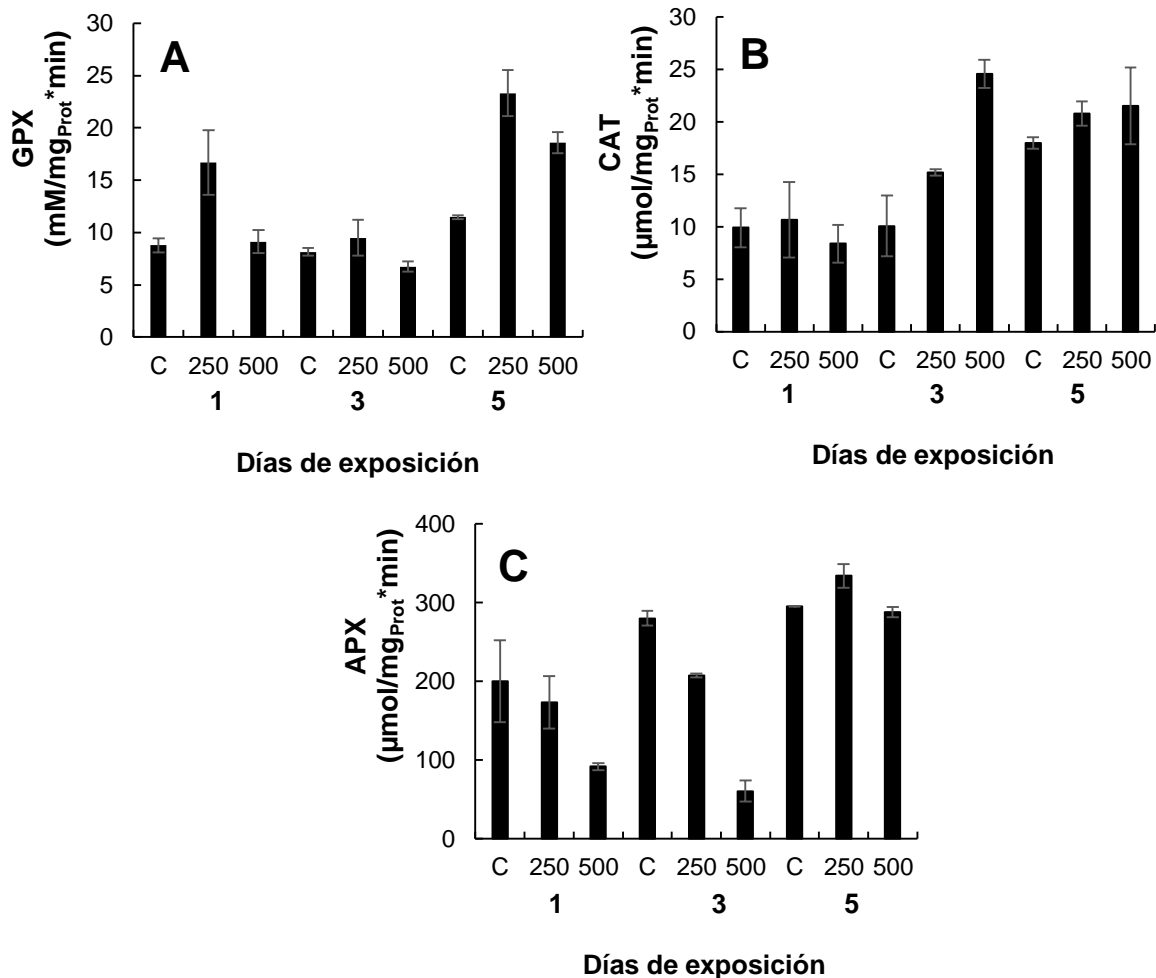


Figura 17. Efecto del H_2O_2 en cultivos *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* a los 1, 3 y 5 días de exposición en la actividad de **A)** GPOX, **B)** CAT, **C)** APX.

Hu *et al.* (2016), estresaron pasturas de centeno con cloruro de sodio y demostraron que a pesar de que las condiciones de salinidad produjeron H_2O_2 y O_2^- , la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, POX, CAT y APX inhibieron la acumulación excesiva de ERO manteniendo así la homeostasis. Las señales transmitidas por Ca^{2+} realizan

funciones río arriba o abajo en la red de traducción de señales ayudando a la planta a mejorar su adaptación al estrés estimulando una mayor actividad de enzimas antioxidantes en plantas. Srivastava y Srivastava, (2014), evaluaron el estrés hídrico (100, 200 y 300 mL de agua) y el control (400 mL de agua) en ejemplares de *S. rebaudiana* durante 40 días, encontrando que las actividades de POX y CAT incrementaron en las plantas moderadamente y ligeramente (200 y 300 mL de agua) comparado con el control donde la actividad de ambas enzimas disminuyó gradualmente. Cingoz *et al.* (2014), expusieron callos de *Digitalis* a concentraciones crecientes de H₂O₂ (0-10 mM) durante 6 horas, teniendo la mayor actividad enzimática tanto para CAT y SOD en callos que contenían en el medio 10 mM de H₂O₂. Huerta-Heredia *et al.* (2009), observaron el incremento de la actividad enzimática de POX y SOD, con forme aumentaban la concentración de H₂O₂ de 6 y 2 veces más, respectivamente. Tang *et al.* (2009), asperjaron de 50, 100 y 200 mM de H₂O₂ a hojas de *Catharanthus roseus*, a 100 mM de H₂O₂ la actividad de POX incrementó 5 veces más que el control 2 horas después de la aplicación. De igual forma, Ali *et al.* (2005a), indujeron la respuesta del sistema antioxidante enzimático en cultivo en biorreactor de raíces de *Panax ginseng* modificando los niveles de O₂ (30, 40 y 50%). La producción de ginsenósidos incrementó a niveles de 40% de O₂, así como la actividad antioxidante de enzimas como SOD, POX, CAT, APX, glutatión reductasa (GR) y glutatión S transferasa (GST). No obstante, al incrementar el O₂ a 50% disminuyó tanto la producción de ginsenósidos como la actividad antioxidante de APX, glutatión reductasa GR y GST glutatión peroxidasa (GPX) y dehidroascorbato reductasa (DHAR).

Ali *et al.* (2008), en cultivos de raíces *Panax ginseng*, en sistema de biorreactores avaluaron la adición de CO₂ disminuyendo la acumulación de ginsenósidos, por lo contrario, hubo un incremento en la actividad enzimática y no enzimática, por lo que la planta tiene la capacidad para tolerar el estrés inducido. Por otro lado, Rivera-Contreras *et al.* (2016), sometieron ecotipos *Brachypodium distachyon* a estrés por inundación durante 24 h, la tinción de hojas con nitroblue tetrazolium (NBT) y diaminobencidina (DAB) indicó presencia de O₁²⁻ y H₂O₂ respectivamente. Resultados similares se

observaron cuando se cuantificó la absorbancia de formazán (O_1^{2-}) y la oxidación Amplex Red (H_2O_2), sugiriendo que un factor determinante para la tolerancia por inundación en los ecotipos de *Brachypodium distachyon* estudiados es la gestión coordinada del estrés oxidativo. Por otro lado, Liu *et al.* (2010), estudiaron la respuesta al estrés osmótico por la adición Polietilenglicol (PEG) y H_2O_2 en dos variedades de *Cucumis sativus* y su efecto sobre la actividad antioxidante enzimática. La combinación de H_2O_2 + PEG aumentó la actividad antioxidante enzimática de Mn-SOD, GSH-Px, CAT, GPX, APX, MDHAR, DHAR y GR y los antioxidantes AsA y GSH, concluyendo que el H_2O_2 exógeno puede inducir tolerancia al estrés osmótico en hojas de pepino aumentando la actividad antioxidante y disminuyendo la peroxidación lipídica hasta cierto punto, y protegiendo así la ultraestructura de la mayoría de las membranas. La adición de H_2O_2 activó el mecanismo antioxidante enzimático y no enzimático de las raíces, lo que puso en evidencia que el sistema fue capaz de defenderse contra el estrés abiótico evitando daños celulares provocados por la excesiva producción de ERO, de igual forma aumentó la acumulación de metabolitos secundarios antioxidantes, como fenoles y flavonoides que también se encuentran involucrados en la disminución de ERO.

8.4.3 Efecto de MeJa en cultivo *in vitro* raíces de *S. rebaudiana*.

8.4.3.1 Crecimiento

En la Fig. 18a se puede observar el efecto de la adición de dos concentraciones de MeJa sobre el crecimiento de las raíces. Para 250 μ M disminuyó 42% su crecimiento, mientras que para 500 μ M 43% comparado con el control (7.03 g_{p.s.}/L). Las raíces elicidadas con MeJa (Fig. 18b) presentaron una coloración café, que podría ser un indicador de daño en el tejido.

Este mismo efecto de inhibición en el crecimiento por la adición por algún derivado de los jasmonatos ya se había visto, como lo reportado por Staswick *et al.* (1992), en semillas germinadas de *Arabidopsis thaliana*, donde observaron que la raíz primaria al estar expuesta a 0.1 μ M de MeJa inhibió su crecimiento en un 50%. Huerta-Heredia *et al.*

(2010), evaluaron la adición de 200 μM de AJ en tres diferentes etapas (inicio, exponencial y desaceleración) del crecimiento en cultivos de raíces de *Uncaria tomentosa*. Cuando la adición se realizó durante el inicio y la fase exponencial de crecimiento, la biomasa e índice de crecimiento de los cultivos no se vio afectada. Sin embargo, la adición de AJ en la fase de desaceleración de crecimiento afectó tanto la viabilidad como el crecimiento de las raíces en un 14%. Asimismo, las raíces y el medio de cultivo cambiaron a un color café oscuro debido probablemente a la producción de compuestos fenólicos. Ali *et al.* (2007), observaron el efecto de la adición 200 μM de MeJa, durante 9 días de exposición al elicitor, en raíces de *Panax ginseng* cultivadas en biorreactor, donde al día 9 el crecimiento disminuyó 10% comparado con el control. Jeong *et al.* (2005), utilizaron como elicitor ácido salicílico (AS) y ácido acetilsalicílico (AAS) en concentraciones de 0-10 mM y 0-5 mM respectivamente, en raíces transformadas de *P. ginseng*, como resultado obtuvieron que después de 3 días de exposición al elicitor las raíces inhibieron su crecimiento (7%) con 0.1 mM de AS comparado con el control (0.84 g_{p.s.}/matraz), por otro lado, las raíces elicidadas con 1 mM de AS también presentaron un decremento del 45% en el crecimiento con respecto al control (0.77 g_{p.s.}/matraz).

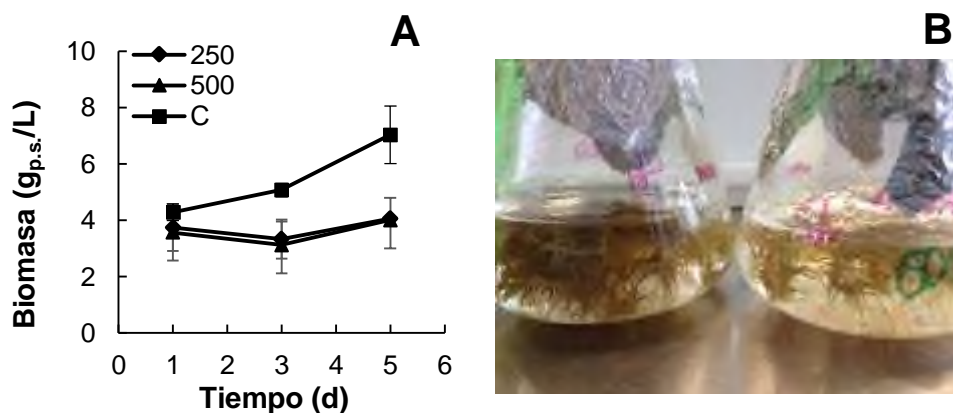


Figura 18. Efecto en el crecimiento por la adición de MeJa en cultivos *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana*. La adición del elicitor se realizó a los 10 días de crecimiento, la cosecha fue a los 5 días de exposición al MeJa. **A)** Control (●), cultivos elicitados con 250 μM de MeJa (▲) y cultivos elicitados con 500 μM de MeJa (■); **B)** Cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* a los 5 días a la exposición a MeJa.

8.4.3.2 Actividad antioxidante no enzimático

8.4.3.2.1 Cuantificación de Fenoles, Flavonoides totales y PAL

La acumulación de fenoles totales en raíces de *S. rebaudiana* por efecto de la adición de MeJa se observa en la Fig. 19a. Con la adición de 500 μM desde el día 3 incrementó la producción de fenoles hasta 0.47 veces más, comparado con el control (463.94 $\mu\text{g}_{\text{ECq}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$). Mientras que con la adición de 250 μM , la acumulación de fenoles totales aumentó al quinto día un 0.63 veces más, con respecto al control (421.93 $\mu\text{g}_{\text{ECq}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$).

Para flavonoides totales (Fig. 19b) en los primeros 3 días puede apreciarse que no hubo una variación entre los controles y las muestras tratadas con MeJa, aunque para 250 μM al día 5 la acumulación de flavonoides incremento 6.8 veces más comparado con el control (34.63 $\mu\text{g}_{\text{ER}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$), para la exposición con 500 μM , la producción de flavonoides decayó 63%. La actividad de PAL (Fig. 19c) puede correlacionarse con la acumulación de fenoles y flavonoides, se observó que la mayor actividad la presentó al día 5 donde a 250 μM , fue 2.57 veces más alta que el control (5.48 $\mu\text{M}/\text{mg}_{\text{prot}}*\text{min}$) y para 500 μM aumentó 1.45 veces más con respecto al control que se correlaciona con una acumulación de compuestos fenólicos.

Neelam *et al.* (2014), evaluaron el metabolismo fenólico en plantas de *Catharanthus roseus* crecidas en invernadero, tratadas con 100 mM de cloruro de sodio (NaCl), 0.05 mM AS y 100 mM NaCl⁺. Siendo las plantas tratadas con AS las que presentaron mayor presencia de compuestos fenólicos solubles y contenido de lignina total en hoja y raíz. Dong *et al.* (2010), elicitaron con 3, 6, 12, 22 y 25 mg/L de AS, cultivos de células de *Salvia miltiorrhiza* durante 7 días de exposición, las mejores concentraciones para la acumulación de compuestos fenólicos (ácido salvianólico B y ácido cafeico) fueron 6 y 22 mg/L teniendo su pico máximo de producción a las 8 h. En cultivos de suspensiones celulares de *Salvia miltiorrhiza*, Dong *et al.* (2010), estudiaron el efecto de la elicitación con AS, incrementaron la acumulación de compuestos fenólicos con concentraciones de AS de 6.25 a 22.5 mg/L, concluyeron que la PAL es clave en la biosíntesis del ácido

salvianólico B y el ácido cafeico. La inducción de la síntesis de fenilpropanoides bajo las condiciones de estrés es el resultado de la transcripción de genes que codifican las enzimas de esta vía.

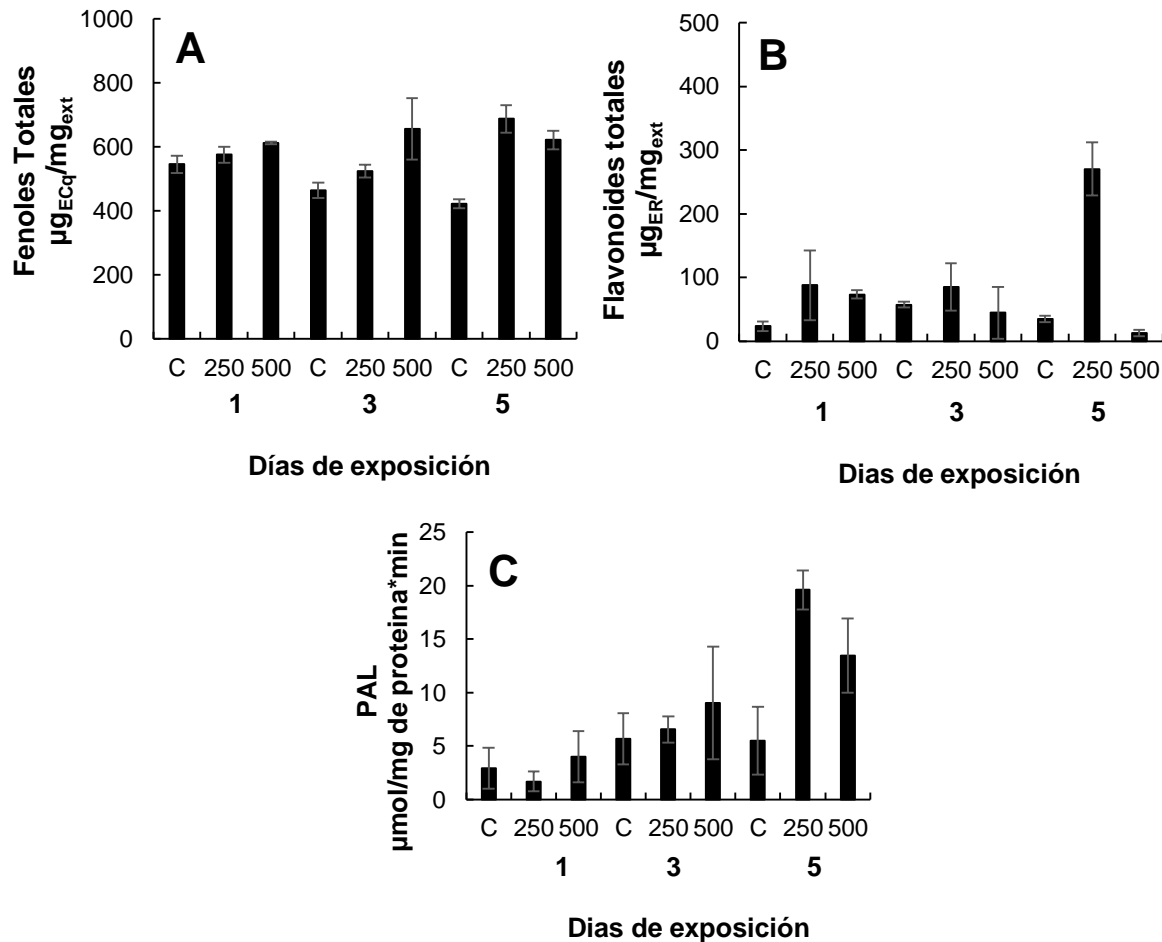


Figura 19. Efecto de la adición de MeJa en cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* en la acumulación de **A)** Fenoles totales, **B)** Flavonoides totales y **C)** PAL a los 1, 3 y 5 días de exposición.

Por otro lado, Ali *et al.* (2007), elicitaron con 200 μM de MeJa y AS, raíces de *Panax ginseng* cultivadas en biorreactor durante 9 días. Se registró un aumento significativo en

el contenido de fenoles totales y flavonoides y actividad de DPPH a los 5, 7 y 9 días de tratamiento, las plantas tratadas con AS mostraron mayores incrementos que las elicitadas con MeJa. Los aumentos paralelos de los niveles de fenoles y flavonoides y la actividad de DPPH indicaron que la mayor actividad para contrarrestar la producción de radicales libres podría deberse al aumento de los niveles de compuestos fenólicos inducidos por los tratamientos de MeJa y AS. Deduciendo que los compuestos fenólicos y otros compuestos antioxidantes pueden reducir los efectos nocivos de las condiciones de estrés y, por tanto, prevenir el desarrollo de muchos tipos de daño fisiológico. Además, las raíces tratadas con MeJa indujeron a una mayor actividad de PAL que las elicitadas con AS, sin embargo, el contenido de fenoles fue mayor en las raíces tratadas con AS. Estos resultados parecen sugerir que tanto MeJa como el AS actúan como moléculas de señalización causando cambios específicos en los niveles de expresión génica que activan la actividad de PAL y la síntesis fenólica diferencialmente. La actividad de PAL no sólo induce la acumulación de compuestos fenólicos, sino que también desempeña un papel importante en la defensa de las plantas.

8.4.3.3 Actividad antioxidante enzimática

Debido a la adición de MeJa al cultivo de raíces *in vitro* de *S. rebaudiana* se activó el mecanismo antioxidante enzimático. La enzima GPOX (Fig. 20a) al día 5 presentó su máxima actividad con 0.45 y 0.84 veces para 250 μM y 500 μM , respectivamente comparado con el control (11.48 $\mu\text{M}/\text{mg}_{\text{prot}} \cdot \text{min}$). Entretanto, CAT (Fig. 20b) al día uno incrementó su actividad en ambas concentraciones 250 y 500 μM de 0.70 y 0.42 veces más, con respecto al control (9.90 $\mu\text{M}/\text{mg}_{\text{prot}} \cdot \text{min}$). Sin embargo, para el día 5 su actividad cayó 40% y 38% para 250 y 500 μM , respectivamente. Por otro lado, la actividad de APX (Fig. 20c), al día 3 disminuyó un 26% y 78% de su actividad en ambas concentraciones de MeJa, observándose para el día 5 que su actividad enzimática fue restablecida (295.24 $\mu\text{M}/\text{mg}_{\text{prot}} \cdot \text{min}$) en ambas concentraciones.

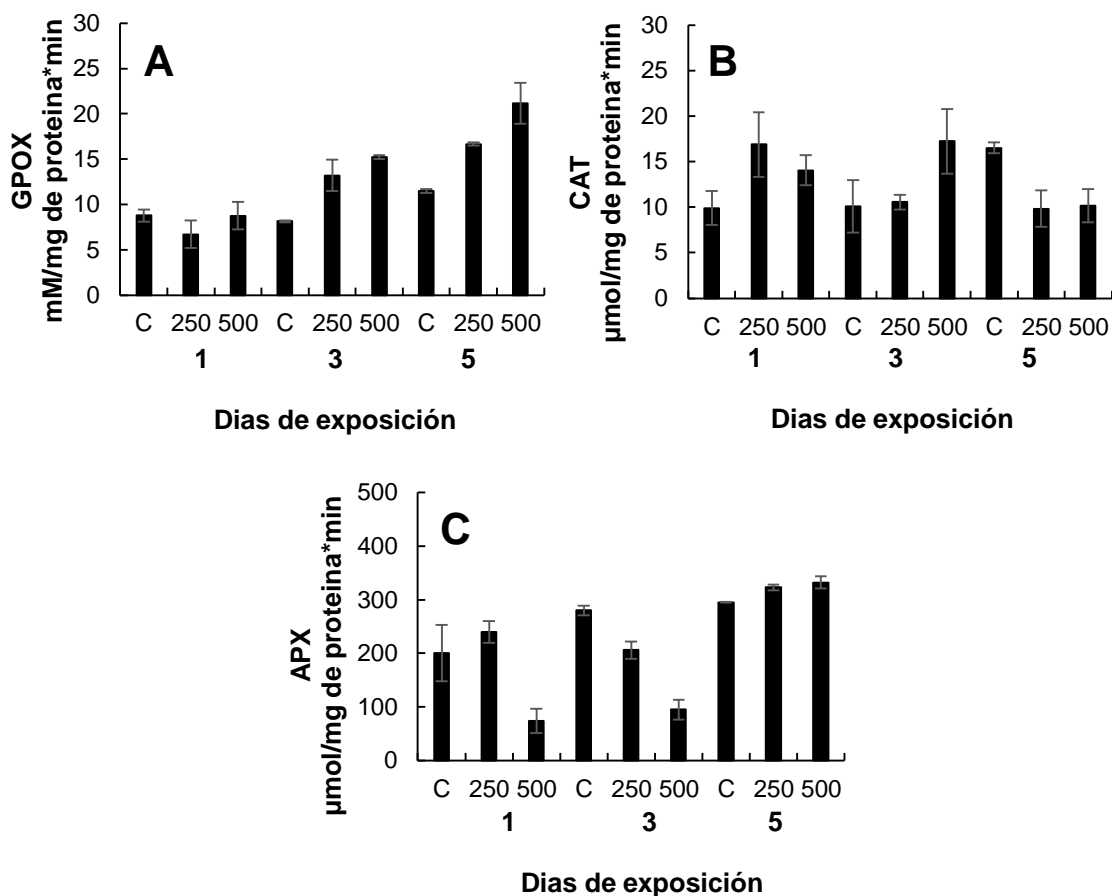


Figura 20. Efecto del MeJa en cultivos *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* a los 1,3 y 5 días de exposición en la actividad de **A)** GPOX, **B)** CAT, **C)** APX.

Dwivedi *et al.* (2016), indujeron el estrés por la adición de fluoruro a diferentes concentraciones (1 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM y 1 M) a cultivos *in vitro* de callos de *S. rebaudiana*, siendo a 3 mM donde se vio la máxima actividad enzimática de SOD, CAT y APX, pero con el incremento de la concentración de fluoruro la actividad de estas enzimas fue disminuyendo, demostrando que hubo una respuesta enzimática antioxidante ante el aumento de ERO inducido por el fluoruro. Ali *et al.* (2005), adicionaron 200 μM de MeJa a cultivos de raíces de *Panax quinquefolium* durante diferentes tiempos de exposición (3, 5 y 9 días), se indujo fuertemente la actividad de GPOX, mientras que la actividad de CAT decreció con el del tiempo, la actividad de APX permaneció inactiva durante los 9 días de

tratamiento. Por otro lado, MeJa disminuyó la actividad de monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), glutatión reductasa (GR), glutatión S transferasa (GST) y las actividades del glutatión peroxidasa (GPX). Sin embargo, se indujo la actividad de GR después de 9 días de los tratamientos MeJa. El Ascorbato oxidasa (AO), los contenidos de la ASC y la relación ASC/DHA aumentaron después del tratamiento con MeJa, pero el contenido de DHA disminuyó. También se indujeron la actividad de lipoxigenasa (LOX) así como el incremento del contenido de H_2O_2 . El decline de la actividad de CAT es indicativo de la inactivación de los genes CAT por la adición de MeJa. GPX y GST proporciona protección a la célula de la planta mediante la eliminación de H_2O_2 , MeJa inhibió GST y GPX, lo que es indicativo de la inactivación de ambas enzimas. Esto puede deberse a los efectos tóxicos de la elevada tasa de rotación de H_2O_2 o la acción de ERO, lo que perjudica las actividades enzimáticas de las plantas tratadas con MeJa.

APX descompone el H_2O_2 en H_2O , la inhibición de la actividad de APX puede deberse al efecto directo de la toxicidad inducida por MeJa sobre la proteína enzimática. Muchos han informado de que la actividad de APX es inducida por los cambios ambientales e inactivada por la generación de ERO. La disminución de la actividad MDHAR indicó la formación de radicales MDHA, generando así más DHA, que son perjudiciales para la célula vegetal. El AO es conocido por catalizar la oxidación de ascorbato a DHA con la reducción concomitante de O_2 molecular y agua. El Ascorbato, desempeña un papel importante en el metabolismo antioxidante, aumentó debido a la mayor actividad de DHAR con MeJa aumentando los niveles de ascorbato. Después de la aplicación de MeJa, la relación ASC / DHA se elevó debido a un aumento en la cantidad de ASC con una disminución significativa de DHA. El estrés por MeJa llevó a una disminución significativa en la actividad de GR, pero se recupera después de 9 días. El papel de GR en la eliminación de H_2O_2 , en células vegetales ha sido bien establecida en la vía ascorbato-glutatión, el aumento de GR en las raíces tratadas con MeJa después de 9 días, podría haber dado lugar a un mayor grupo de GSH, que posteriormente aumentaron el contenido de ASC reducido. Parece que bajo MeJa, el H_2O_2 fue eliminado por mayor nivel de contenido de ASC y los niveles inducidos de actividad DHAR. Sugiriendo que

para eliminar las ERO aparte de GST, GPX, CAT y MDHAR, las actividades de SOD y POX y la ASC reducido y alta relación ASC/DHA se caracterizó por una tendencia creciente después del tratamiento MeJa, que podría resultar potencialmente en la reducción del daño a la membrana y la protección de las plantas contra el daño oxidativo.

Ali *et al.* (2006), indujeron estrés oxidativo con la adición de 200 μM de MeJa y AS, a cultivos de raíces de *Panax ginseng*. Los resultados presentan que la actividad de SOD fue inhibida en las raíces tratadas con MeJa, la actividad de CAT se vio fuertemente afectada tanto por MeJa como por AS, las actividades de APX y GST fueron mayor con MeJa que con AS, los contenidos de ascorbato (ASC) y el estado redox de ASC/ASC+DHA y de glutatión fueron mayor con la adición de AS que con MeJa, las actividades de monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), GPOX, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) fueron inducidas en las raíces tratadas con AS. Concluyendo que las alteraciones provocadas en el mecanismo antioxidante enzimático provocado por la adición de MeJa y el AS pueden prevenir el estrés oxidativo causado por el incremento en la formación de O_2^- . Ali *et al.* (2007), reportaron que la adición de 200 μM AS a cultivo de raíces de *Panax ginseng* indujeron significativamente la producción de ácido clorogénico y quercetina dependientes de las actividades de POX comparados con el control, sin embargo, al día 9 disminuyeron pero manteniendo sus niveles por encima del control, indicando que una baja actividad de peroxidasas podría ser el resultado de un bajo porcentaje de lignificación en raíces de *P. ginseng* y esto también fue evidente por la poca actividad de cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) a los 9 días.

Los polifenoles, como flavonoides y fenilpropanoides presentes en las vacuolas y el apoplastos, pueden metabolizar el H_2O_2 como donador de electrones para las fenolperoxidasas. Este cambio da lugar a la formación de los respectivos radicales fenoxilo, que pueden regenerarse mediante una reacción no enzimática con ascorbato. De este modo, se ha sugerido en *U. tomentosa* y *C. roseus* que los alcaloides vacuolares, las peroxidasas y los derivados fenólicos pueden funcionar como eliminadores de

peróxido hidrógeno (Vera-Reyes *et al.* 2015; Ferreres *et al.* 2011), ahora bien, los fenoles y flavonoides también pueden ser utilizados para metabolizar el H₂O₂, pidiéndose explicar porque disminuyó la actividad de APX en las raíces de *S. rebaudiana* desde el punto de vista de metabolitos, desde el enzimático es probable que exista una inactivación de los ciclos, debido a la adición de MeJa, sugiriendo que la planta haya utilizado como mecanismo de defensa las moléculas con alto poder antioxidante como es el caso del ascorbato disminuyendo las altas concentraciones de H₂O₂, explicándose porque al inicio de la elicitación con MeJa la actividad de APX se vio disminuida así también muy probablemente el ciclo del ascorbato-glutación. Suponiéndose que una vez que la planta encontró el equilibrio entre las moléculas oxidantes y antioxidantes la función de la APX se restableció. La tolerancia al estrés está estrechamente relacionada con la eficacia de las enzimas antioxidantes y se conoce que estas enzimas y metabolitos antioxidantes aumentan bajo diversas tensiones ambientales (Mittler, 2002), además no solo están regulados por las vías de señalización, sino también por un cross-talk de moléculas señal (Wang *et al.* 2011; Guo *et al.* 2014).

Con base a los resultados anteriores se propone un posible mecanismo antioxidante para los cultivos *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* expuestas a estrés abiótico (Fig. 21).

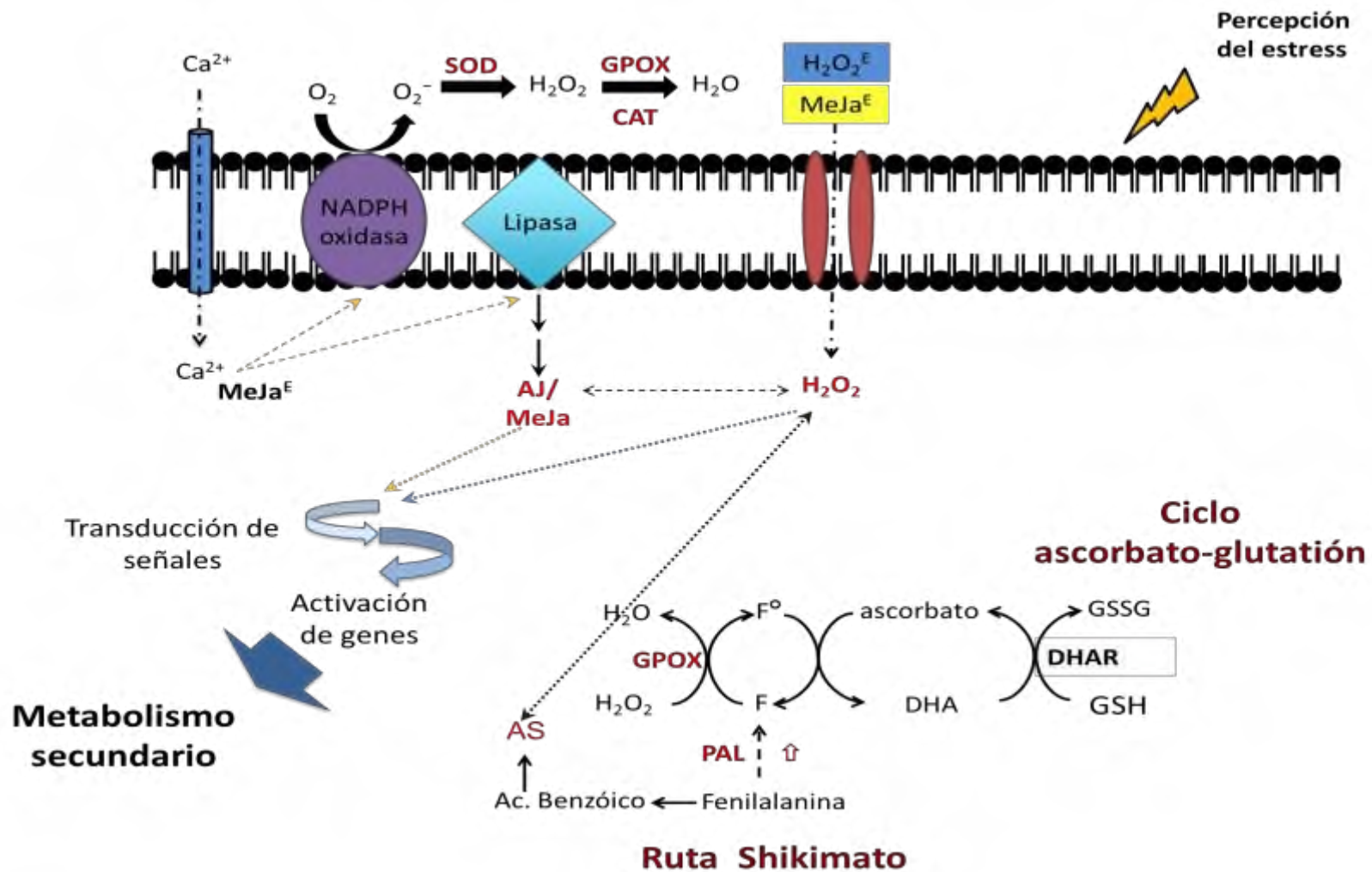


Figura 21. Posible mecanismo antioxidante en cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana* bajo estrés. Calcio (Ca^{2+}), oxígeno (O_2), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), agua (H_2O), Catalasa (**CAT**), superóxido dismutasa (**SOD**), ascorbato peroxidasa (**APX**), el guayacol peroxidasa (**GPOX**), glutatión oxidado (**GSSH**), glutatión (**GSH**), dehidroascorbato (**DHA**), ácido salicílico (**AS**), fenilalanina amonio liasa (**PAL**), fenoles y flavonoides (**F**), radical fenoxilo (**F^o**), ácido jasmonico (**AJ**), metil jasmonato (**MeJa**) y nano partículas de óxido de zinc (**NPs ZnO**).

9. Conclusión

La elicitación abiótica activó los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en cultivos *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*.

10. Recomendaciones

Cuantificar la producción de GE en las raíces de *Stevia rebaudiana* tratadas con los diferentes inductores abióticos y evaluar su efecto.

Evaluar enzimas antioxidantes involucradas en el ciclo ascorbato/glutación, así como las relaciones de los compuestos involucrados en el mecanismo antioxidante.

Bloquear mecanismo de señalización que pudieran encontrarse involucrados con la biosíntesis de los GE tales como H₂O₂, Jasmonatos, AS y canales de calcio para aprobar o rechazar su participación.

11. Anexos

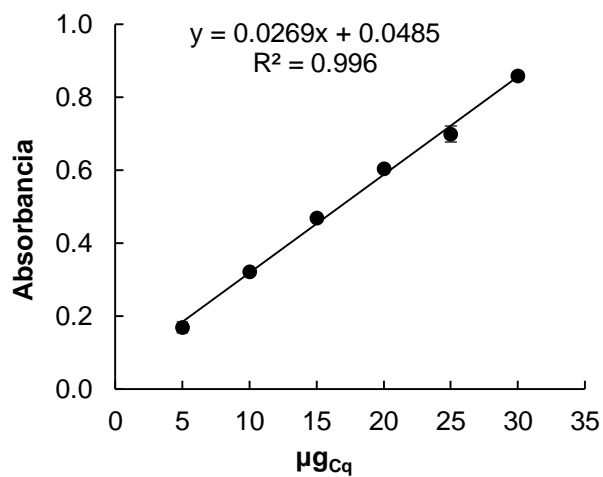


Figura 22. Curva de calibración de catequina para la cuantificación de Fenoles totales.

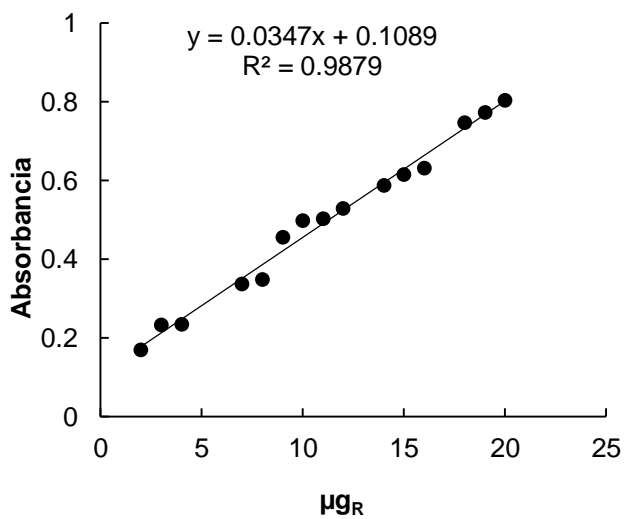


Figura 23. Curva de calibración de rutina para la cuantificación de Flavonoides totales.

11.1 Geles nativos

Para poder observar las isoformas de la actividad enzimática se realizaron geles de acrilamida del 7% al 12% como lo describe Laemmli, (1970).

11.1.1 Gel de actividad de APX

Se utilizó un gel de acrilamida al 10%, donde se corrieron las muestras a evaluar a 80 V y 4 °C. Terminada la electroforesis, se incubó el gel en una solución que contenía una solución amortiguadora 50 mM de fosfatos a pH 7 y 2 mM de ascorbato durante 20 min, transcurrido el tiempo el gel fue lavado y se incubó de nuevo en solución amortiguadora 50 mM de fosfatos a pH 7.4 mM de ascorbato y 0.1 mM de H₂O₂ por 20 min. El gel se lavó con una solución amortiguadora de 50 mM de fosfatos a pH 7, y se agregó 28 mM de tetrametiletilendiamina (TEMED) y 0.3 mM de NBT, se incubó hasta que el gel se tornó oscuro y se observaron zonas acromáticas donde se localizaron la banda de la APX (Mittler *et al.* 1993).

11.1.2 Gel de actividad de CAT

Las proteínas extraídas de las raíces de *Stevia rebaudiana* se separaron en un gel nativo de acrilamida 5% corrido a 80 V y 4 °C. El gel de actividad se realizó siguiendo el método descrito por Woodbury *et al.* (1971). Con 50 mM de H₂O₂ por 10 min y fue revelado con una solución al 2% de FeCl₃ y 2% de K₃FeCN₆ por 10 min. La catalasa reveló su ubicación por barrido de H₂O₂, causando bandas transparentes en el gel.

11.1.3 Gel de actividad de Guayacol Peroxidasa



Se utilizó un gel de poliacrilamida al 7% que se corrió a 80 V a 4 °C. Para el revelado se siguió la metodología de Pütter, (1971). El gel se sumergió durante 5 min en una solución de 50 mM de H₂O₂. El H₂O₂ se retiró y el gel se lavó con agua, después


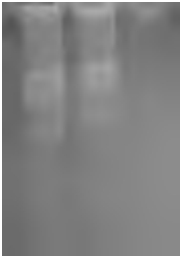
fue colocado en una solución 20 mM de guayacol. Las bandas pertenecientes a las isoformas de peroxidasas se tiñeron de color rojizo.

11.1.4 Gel de actividad de SOD

Las proteínas extraídas de las raíces *in vitro* de *Stevia rebaudiana* se separarán en un gel nativo (condiciones no desnaturalizantes) de poliacrilamida 10% con una corriente de 50 V y 4 °C. La actividad enzimática se vio después de la electroforesis, el gel se incubó en una solución compuesta de Riboflavina 28 µM, TEMED 28 mM preparados en buffer de KPO₄ 32 mM, pH 7.8 durante 30 min en agitación, después se sustituirá la solución por otra que contenía NBT 2 mM preparado en buffer de KPO₄ 36 mM y se incubará durante 30 minutos bajo luz fluorescente de 40 watts. La actividad enzimática se observará como bandas acromáticas en el fondo azul intenso del gel (Beauchamps y Fridovich, 1971).

Tabla 5. Evaluación de geles de actividad de cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*.

Enzima	Gel	Especificaciones
CAT		1 isoforma 5% de acrilamida Activación y tinción del gel H ₂ O ₂ 50 mM 2% FeCl ₃ 2% K ₃ FeCN ₆
GPOX		2 isoformas 7% de acrilamida Activación y tinción del gel H ₂ O ₂ 50 mM Guayacol 20 mM

APX		<p>1 isoforma 10% acrilamida</p> <p>Activación y tinción del gel BPI 50 mM + Ascorbato 2 mM BPI 50 mM + Ascorbato 4 mM + H₂O₂ 2 mM BPI + TEMED 28 mM + NBT 0.3 mM</p>
SOD		<p>4 isoformas 12% acrilamida</p> <p>Activación y tinción del gel Bpi 36 mM pH 7.8 + NBT 2 mM Bpi 36 mM pH 7.8 + TEMED 28 μM + Riboflavina 28 mM</p>

12. Referencias

- ADA. 2010b. Diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2010. *Diabetes Care*. 33(1), 62-69. doi: 10.2337/dc10-S062.
- Aebi H. 1984. Catalasa *in vitro*. *Methods in enzymology*. 105, 121-126.
- Ahmad P., Jaleel C. A., Salem M. A., Nabi G. y Sharma S. 2010. Roles of enzymatic and no enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress, *Critical Rev. Biotech*. 30 (3), 161-175.
- Ahmed M. B., Saladim M., Karim R., Razvy M. A., Hannan M. M., Sultana R., Hossain M. e Islam R. 2007. An Efficient method for *in vitro* clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in Bangladesh. *American-Eurasian J. Sci. Res.* 2 (2), 121-125.
- Alfermann A. W. y Petersen M. 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 43, 199-205.
- Ali M. B., Dewir Y. H., Hahn E. J. y Paek K. Y. 2008. Effect of carbon dioxide on antioxidant enzymes and ginsenoside production in root suspension cultures of *Panax ginseng*. *Environmental and experimental botany*. 63(1), 297-304.
- Ali M. B., Hahn E. J. y Paek K. Y. 2007. Methyl jasmonate and salicylic acid induce oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules*. 12, 607-621.
- Ali M. B., Hahn E. J. y Peak K. Y. 2005a. CO₂ induced total phenolics in suspension cultures of *Panax ginseng* CA. Mayer roots: role of antioxidants and enzymes. *Plant Physiol Biochem*. 43, 449-457.
- Ali M. B., Thanh N. T., Yu K. W., Hahn E. J., Paek K. Y. y Lee H. L. 2005b. Induction in the antioxidative systems and lipid peroxidation in suspension culture roots of *Panax ginseng* induced by oxygen in bioreactors. *Plant science*. 169(5), 833-841.
- Ali M. B., Yu K. W., Hahn E. J. y Paek K. Y. 2005. Differential responses of anti-oxidants enzymes, lipoxygenase activity, ascorbate content and the production of saponins in tissue cultured root of mountain *Panax ginseng* CA Mayer and *Panax*

- quinquefolium* L. in bioreactor subjected to methyl jasmonate stress. *Plant science*. 169(1), 83-92.
- Ali M. B., Yu K. W., Hahn E. J. y Paek K. Y. 2006. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant cell reports*. 25(6), 613-620.
- AL-Oubaidi H. K. M. y Kasid N. M. 2015. Increasing (phenolic and flavonoids compounds of *Cicer arietinum* L. from embryo explant using titanium dioxide nanoparticle *in vitro*. *World J Pharmaceut Res*. 4(11),1791-1799.
- Álvarez-Robles M. J., López-Orenes A., Ferrer M. A. y Calderón A. A. 2016. Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* shoot cultures. *Industrial Crops and Products*. 87, 273-279.
- Anbazhagan V. R., Ahn C. H., Harada E., Kim Y. S. y Choi Y. E. 2008. Podophyllotoxin production via cell and adventitious root cultures of *Podophyllum peltatum*. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 44(6), 494-501.
- Apel K. y Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol*. 55, 373-399.
- Arencibia A. D., Bernal A., Zayas C., Carmona E., Cordero C., González G., García R. y Santana I. 2012. Hydrogen peroxide induced phenylpropanoids pathway eliciting a defensive response in plants micropropagated in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Plant science*. 195, 71-79.
- Arora A., Sairam R. K. y Srivastava G. C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. 82, 1227-1238.
- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology*. 50(1), 601-639.
- Balandrin M. J. y Klocke J. A. 1988. Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. *Medicinal and Aromatic plant*. 4, 1-36.
- Balestrasse K. B., Gardey L., Gallego S. M. y Tomaro M. L. 2001. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Aust. J. Plant Physiol*. 28, 497-504.

- Beauchamps C. y Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276-287.
- Bondarev N., Reshetnyak O. y Nosov A. 2001. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Science.* 161(1), 155-163.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry.* 72(1-2), 248-254.
- Brandle J. 2005. *Stevia*, Natures Natural Low Calorie Sweetener. En: www.certinedorganicfoodsteviaFAQ. Consulta: junio 2005.
- Brandle J. E. y Telmer P. G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochem.* 68, 1855-1863.
- Brandle J. E., Richman A., Swanson A. K. y Chapman B. P. 2002. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. *Plant molecular biology.* 50(4-5), 613-622.
- Brandle J. E., Starratt A. N. y Gijzen M. 1998. *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological, and chemical properties. *Can. J. Plant Sci.* 78, 527-536.
- Cai Y. Z., Sun M., Xing J., Luo Q. y Corke H. 2006. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life sciences.* 78(25), 2872-2888.
- Calderón-Gabriel L., Jiménez-Brigada A., Huerta-Heredia A. A., Capataz-Tafur J. y García-López E. 2016. Effect of three strains of *Agrobacterium rhizogenes* and explant type on genetic transformation of *Stevia rebaudiana*. *Mexican Journal of Biotechnology.* 1(1), 34-41.
- Carakostas M. C., Curry L. L., Boileau A. C. y Brusick D. J. 2008. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem Tox.* 46, 1-10.
- Chan P., Tomlinson B., Chen Y. J., Liu J. C., Hsieh M. H. y Cheng J. T. 2000. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 50(3), 215-220.

- Chatsudhipong V. y Muanprasat C. 2009. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Therapeut.* 121, 41-54.
- Chen J., Jeppesen P. B., Abudula R., Dyrskog S. E., Colombo M. y Hermansen K. 2006. Stevioside does not cause increased basal insulin secretion or β -cell desensitization as does the sulphonylurea, glibenclamide: Studies *in vitro*. *Life sciences.* 78(15), 1748-1753.
- Cingoz G. S., Verma S. K. y Gurel E. 2014. Hydrogen peroxide-induced antioxidant activities and cardiotoxic glycoside accumulation in callus cultures of endemic *Digitalis species*. *Plant Physiology and Biochemistry.* 82, 89-94.
- Comotto M., Casazza A. A., Aliakbarian B., Caratto V., Ferretti M. y Perego P. 2014. Influence of TiO₂ nanoparticles on growth and phenolic compounds production in photosynthetic microorganisms. *The Scientific World Journal.* 1-9.
- Creelman R. A. y Mullet J. E. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 92(10), 4114-4119.
- Dacome A., Da Silva C., Da Costa C., Fontana J., Adelman J. y Da Costa S. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochem.* 40, 3587-3594.
- Das A., Gantait S. y Mandal M. 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Agricultural Research.* 6(1), 40-48.
- De Oliveira B. H., Packer J. F., Chimelli M. y De Jesús D. A. 2007. Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*. *J. Biotechn.* 131, 92-99.
- Desai C. V., Desai H. B., Suthar K. P., Singh D., Patel R. M. y Taslim A. 2015. Phytotoxicity of zinc-nanoparticles and its influence on stevioside production in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Biological Research.* 17(1), 1-7.
- Desikan R., Cheung M. K., Clarke A., Golding S., Sagi M., Fluhr R., Rock C., Hancock J. y Neill S. 2004. Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Funct Plant Biol.* 31, 913-920.
- Desikan R., Hancock J. T. y Neill S. J. 2003. Oxidative stress signaling. *In plant responses to abiotic stress.* 121-148.

- Dewanto V., Wu X., Adom K. K. y Liu R. H. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50(10), 3010-3014.
- Dimkpa C. O., McLean J. E., Latta D. E., Manangón E., Britt D. W., Johnson W. P., Boyanov M. I. y Anderson A. J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of Nanoparticle Research*. 14(9), 1125.
- Dixon R. A. y Paiva N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 7, 1085-1097.
- Dong J., Wan G. y 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(2), 99-104.
- Dunand C., Crèvecoeur M. y Penel C. 2007. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytologist*. 174(2), 332-341.
- Dwivedi S., Alam A., Shekhawat G. S., Sharma V. y Kumari J. 2016. Enzymatic and non-enzymatic behaviour of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) against fluoride induced stress. *International Journal of Scientific Research in Knowledge*. 4(3), 69-76.
- Edreva A., Velikova V., Tsonev T., Dagnon S., Grüel A., L. Aktas L. y Gesheva E. 2008. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen. Appl. Plant Physiol*. 34, 67-78.
- Fakruddin M. D., Hossain Z. y Afroz H. 2012. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *J Nanobiotechnol*. 10, 1-8.
- Ferrerres F., Figueiredo R., Bettencourt S., Carqueijeiro I., Oliveira J., Gil-Izquierdo A. y Barceló A. R. 2011. Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H₂O₂ affair?. *Journal of Experimental Botany*. 62(8), 2841-2854.
- Flores H. E., Dai Y. R., Cuello J. L., Maldonado-Mendoza I. E. y Loyola-Vargas V. M. 1993. Green roots: photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. *Plant Physiology*. 101(2), 363-371.

- Flores H. E., Pickard J. J. y Hoy M. W. 1988. Production of polyacetylenes and thiophenes in heterotrophic and photosynthetic root cultures of *Asteraceae*. *Biol Mol.* 7, 233-254
- Franklin G., Conceição L. F., Kombrink E. y Dias A. C. 2009. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry.* 70(1), 60-68.
- Fritz R. R., Hodgins D. S. y Abell C. W. 1976. Phenylalanine ammonia-lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals. *Journal of Biological Chemistry.* 251(15), 4646-4650.
- Fu T. J., Singh G. y Curtis W. R. 1999. Plant cell and tissue culture for the production of food ingredients. New York: Kluwer Acad. /Plenum. 290.
- Fu X., Yin Z. P., Chen J. G., Shangguan X. C., Wang X., Zhang Q. F. y Peng D. Y. 2014. Production of chlorogenic acid and its derivatives in hairy root cultures of *Stevia rebaudiana*. *Journal of agricultural and food chemistry.* 63(1), 262-268.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress response: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 9, 436-442.
- Gardana C. S. 2003. Metabolism of steviosidos y rebaudiosido A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *Journal of Agricultural Foods Chemistry.* 51, 6618-6622.
- Gardana C., Scaglianti, M. y Simonetti P. 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr A.* 1217, 1463-1470.
- Garg N. y Manchanda G. 2009. ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystem.* 143, 81-96.
- Gechev T. S., Van Breusegem F., Stone J. M., Denev I. y Laloi C. 2006. Reactive oxygen species as signal that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays.* 28, 1094-1101.
- Geuns J.M. 2003. Stevioside. *Phytochem.* 64, 913- 921.
- Gevara-Gracia A., San Román C., Arroyo A, Cortes M., De la Luz Gutiérrez-Nava M. y León P. 2005. Characterization of the *Arabidopsis* clb6 mutant illustrates the

importance of photo transcriptional regulation of the methyl-d-erythritol4-phosphatate pathway. *Plant Cell*. 17(2), 628-863.

- Ghanati F. y Bakhtiarian S. 2014. Effect of methyl jasmonate and silver nanoparticles on production of secondary metabolites by *Calendula officinalis* L. (*Asteraceae*). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 13(11), 1783-1789.
- Ghasemi B., Hosseini R. y Nayeri F. D. 2015. Effects of cobalt nanoparticles on artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua*. *Turk J Bot*. 39, 769-777.
- Ghorbanpour M. y Hadian J. 2015. Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown *in vitro*. *Carbon*. 94, 749-759.
- Gill S. S. y Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol and Biochem*. 48, 909-930.
- Guo H., Dang X. y Dong J. 2014. Hydrogen peroxide and nitric oxide are involved in salicylic acid-induced salvianolic acid B production in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Molecules*. 19(5), 5913-5924.
- Gupta P., Sharma S. y Saxena S. 2014. Effect of salts (NaCl and Na₂CO₃) on callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* for steviol glycoside production. *Applied biochemistry and biotechnology*. 172(6), 2894-2906.
- Hao W., Guo H., Zhang J., Hu G., Yao Y. y Dong J. 2014. Hydrogen peroxide is involved in salicylic acid-elicited rosmarinic acid production in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *The Scientific World Journal*. 1-7.
- Hearn L. K. y Subedi P. P. 2006. Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Food Compos. Anal*. 22, 165-168.
- Hossain, M. A., Siddique A B., Rahman S. M. y Hossain M A. 2010. Chemical composition of the essential oils of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Asian J Trad Med*. 5(2), 56-61.
- Hu T., Chen K., Hu L., Amombo E. y Fu J. 2016. H₂O₂ and Ca²⁺-based signaling and associated ion accumulation, antioxidant systems and secondary metabolism orchestrate the response to NaCl stress in perennial ryegrass. *Scientific reports*. 1-13.

- Huerta-Heredia A. A. 2010. Eventos bioquímicos del estallamiento oxidativo inducido por estrés y su relación con la producción de alcaloides indol terpénicos en cultivo de raíces de *Uncaria tomentosa*. Tesis de doctorado. CINVESTAV-IPN. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.
- Huerta-Heredia A. A., Marín-López R., Ponce-Noyola T., Cerda-García-Rojas C. M., Trejo-Tapia G. y Ramos-Valdivia A. C. 2009. Oxidative stress induces alkaloid production in *Uncaria tomentosa* root and cell cultures in bioreactors. *Engineering in Life Sciences*. 9(3), 211-218.
- Hung S. H. Yu C. W. y Lin C. H. 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot Bull Acad Sin*. 46, 1-10.
- Itzel V. Alvarado-Orea, Raquel M. Matias-Alvárez., Mauro Montes-Palmeros., Ángel Cárdenas-Cágal., Jacqueline Capataz-Tafur., David Paniagua-Vega., Ariana A. Huerta-Heredia. Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. XI Simposio Internacional de Biotecnología vegetal, Instituto de Biotecnología de las Plantas Universidad Central "Marta Abreu" cayo Santa María, Villa Clara, Cuba, 2014.
- Javed R., Usman M., Yücesan B., Zia M. y Gürel E. 2016. Effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on physiology and steviol glycosides production in micropropagated shoots of *Stevia rebaudiana* Ber. *Plant Physiology and Biochemistry*. 110, 94-99.
- Javed R., Yücesan B. y Gurel E. 2017. Hydrogen peroxide-induced steviol glycosides accumulation and enhancement of antioxidant activities in leaf tissues of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Tech*. 1-5.
- Jayaraman S., Manoharan M. S. y Illanchezian S. 2008. *In vitro* antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7(4), 1143-1149.
- Jeong G. T., Park D. H., Ryu H. W., Hwang B., Woo J. C., Kim D. y Kim S. W. 2005. Production of antioxidant compounds by culture of *Panax ginseng* CA Meyer hairy roots. *In Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. 1147-1157.
- Jones D. H. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry*. 23(7), 1349-1359.

- Kariola T., Brader G., Li J. y Palva E. T. 2005. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. *The Plant Cell*. 17, 282-294.
- Kim J., Choi Y. H. y Choi Y. 2002. Use of stevioside and cultivation of *Stevia rebaudiana* in Korea. En: Kinghorn, A.D. (Ed.). *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*. 19, 196-202.
- Kim K., Sawa Y. y Shibata H. 1996 Hydroxylation of ent-Kaurenoic acid to steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni – purification and partial characterization of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 332 (2), 223-230.
- Kim M. S., Kim H. S., Kim Y. S., Baek K. H., Oh H. W., Hahn K. W., Bae R. N., Lee I. J., Joung H. y Jeon J. H. 2007. Superoxide anion regulates plant growth and tuber development of potato. *Plant Cell Rep.* 26, 1717-1725.
- Kirk J. T. O. y Tilney-Bassett R. A. E. 1978. The Plastids. Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
- Kliebenstein D. J., Dietrich R. A., Martin A. C., Last R. L. y Dangl J. L. 1999. Regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 12, 1022-1026.
- Kochikyan V. T., Markosyan A. A., Abelyan L. A., Balayan A. M. y Abelyan V. A. 2006. Combined enzymatic modification of stevioside and rebaudioside A. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 42(1), 31-37.
- Krishnaraj C., Jagan E. G., Ramachandran R., Abirami S. M., Mohan N. y Kalaichelvan P. T. 2012. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochemistry*. 47(4), 651-658.
- Kumar H., Kaul K., Bajpai-Gupta S., Kaul V. K. y Kumar S. 2012. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene*. 492(1), 276-284.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259), 680-685.
- Landázuri P. y Tigrero J. 2009. Generalidades. In P. A. Landázuri A. y Tigrero J. O. S. (eds), *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Sangolquí-Ecuador. 1-7.

- Lemus-Mondaca R., Vega-Gálvez A., Zura-Bravo L. y Ah-Hen K. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*. 132(3), 1121-1132.
- Li Y., Wei G. y Chen J. 2004. Glutathione: a review on biotechnological production. *Applied microbiology and biotechnology*. 66(3), 233-242.
- Lichrenthaler H. K. 1998. Stress concept in plants. *Ann. NY Acad. Sci.* 851, 187-198.
- Liu Z. J., Guo Y. K. y Bai J. G. 2010. Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two *cucumber* ecotypes under osmotic stress. *Journal of plant growth regulation*. 29(2), 171-183.
- Londhe Smite V. y Nanaware Sadhana M. 2013. HPLC Method for Simultaneous Analysis of Stevioside y Rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana*. *Journak of AOAC International*. 96(3), 24-26.
- MacDonald M. J. y D'Cunha G. B. 2007. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*. 85(3), 273-282.
- Maksymiec W. (2007). Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 29(3), 177-187.
- Mandal S., Upadhyay S., Singh, V. P. y Kapoor R. 2015. Enhanced production of steviol glycosides in mycorrhizal plants: a concerted effect of arbuscular mycorrhizal symbiosis on transcription of biosynthetic genes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 89, 100-106.
- Marslin G, Sheeba C. J. y Franklin G. 2017. Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Front. Plant Sci.* 8, 1-8.
- Mathew R. y 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.
- Mathur S. y 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(3), 931-939.
- Min J. Y., Jung H. Y., Kang S. M., Kim Y. D., Kang Y. M., Park D. J., Prasad D. T. y Choi M. S. 2007. Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor

- cultures of *Scopolia parviflora* adventitious roots. *Bioresource technology*. 98(9), 1748-1753.
- Mirzajani F., Askari H., Hamzelou S., Schober Y., Römpp A., Ghassempour A. y Spengler B. 2014. Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology and environmental safety*. 108, 335-339.
- Misawa M. 1994. Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolites. FAO Agricultural Services Bulletin N°108. Ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 95.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*. 7(9), 405-410.
- Mittler R. y Zilinskas B. A. 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry*. 12, 540-546.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. y Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen network of plants. *Trends Plant. Sci.* 9, 490-498.
- Mizutani K. y Tanaka O. 2002. Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. En: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*. 19, 178-195.
- Modi A., Litoriya N., Prajapati V., Rafalia R. y Narayanan S. 2014. Transcriptional profiling of genes involved in steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* bertoni during plant hardening. *Developmental Dynamics*. 243(9), 1067-1073.
- Moller I. M., Jensen P. E. y Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 459-481.
- Montes-Palmeron M., Alvarado-Orea I. V., Pavón-Orozco P., García-López E., Huerta-Heredia A. A. 2016. Steviol Glucosides production in micropropagated seedlings of *Stevia rebaudiana* elicited with methyl jasmonate. *Mexican Journal of Biotechnology*. 1(1), 113-119.
- Moon H., Lee B., Choi G., Shin S., Prasad D. T., Lee O., Kwak S. S., Kim D. H., Nam J., Bahk J., Hong J. C. y Lee S. Y. 2003. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 358-363.

- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 31, 129-139.
- Nakano Y. y Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880.
- Neelam M., Rahul M., Ajiboye M., Kafayat Y. y Lateefat Y. 2014. Salicylic acid alters antioxidant and phenolics metabolism in *Catharanthus roseus* grown under salinity stress. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines.* 11(5), 118-125.
- Orozco J. y de Jesús A. 2010. Adaptación de clonajes de Estevia (*Stevia rebaudiana* bert.) en tres ambientes del Caribe colombiano/ Adaptation of two clones of *Stevia rebaudiana* bert.) in three Colombian Caribbean environments. Doctorado Tesis, Universidad Nacional de Colombia.
- Paul S., Sengupta S., Bandyopadhyay T. K. y Bhattacharyya A. 2012. Stevioside induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Nutr Cancer.* 64, 1087-1094.
- Piqueras A., Olmo E., Martínez-Solano J. R. y Hellin E. 1999. Cd-induced oxidative burst in tobacco BY2 cells: time course, subcellular location and antioxidant response. *Free Radical Research.* 31, 33-38.
- Pnueli L., Liang H., Rozenberg M. y Mittler R. 2003. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal.* 34(2), 187-203.
- Pól J., Hohnová B. y Hyötyläinen T. 2007. Characterisation of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 1150(1), 85-92.
- Polidoros N. A. y Scandalios J. G. 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.), *Physiol. Plant.* 106, 112-120.
- Pragati Misra, Pradeep Kumar Shukla, Krishnendu Pramanik, Sanghdeep Gautam y Chittaranjan Kole. 2016. Nanotechnology for Crop Improvement. En C. Kole (Ed.), *Plant Nanotechnology: Principles and Practices.* USA, Editorial Springer. 219-256.

- Pütter J. 1971. Peroxidases. In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis. *Academic Press*. 685-690.
- Raei M., Angaji S. A., Omid M. y Khodayari M. 2014. Effect of abiotic elicitors on tissue culture of *Aloe vera*. *Int J Biosci*. 5(1), 74-81.
- Ramachandra R. S. y Ravishankar G. A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol*. 20, 101-153.
- Ramos-Valdivia A. C., Huerta-Heredia A. A., Trejo-Tapia G. y Cerda-García-Rojas C. M. 2012. Secondary metabolites as non-enzymatic plant protectors from oxidative stress, In: Oxidative stress in plants: causes, consequences and tolerance, eds Anjum NA, Umar S, Ahmad A. IK International Publishers, New Delhi. 413-441.
- Rathore S., Sing N. y Sing S. K. 2014. Influence of NaCl on biochemical parameters of two cultivars of *Stevia rebaudiana* regenerated *in vitro*. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 10(2), 288-296.
- Reis R. V., Borges A. P. P. L., Chierrito T. P. C., de Souto E. R., de Souza L. M., Iacomini M. y Gonçalves R. A. C. 2011. Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 106(2), 329-335.
- Reis R. V., Chierrito T. P., Silva T. F., Albiero A. L., Souza L. A., Gonçalves J. E. y Gonçalves R. A. 2017. Morpho-anatomical study of *Stevia rebaudiana* roots grown *in vitro* and *in vivo*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 27(1), 34-39.
- Richman A. S., Gijzen M., Starratt A. N., Yang Z. y Brandle J. E. 1999. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant J*. 19, 411-421.
- Rivera-Contreras I. K., Zamora-Hernández T., Huerta-Heredia A. A., Capataz-Tafur J., Barrera-Figueroa B. E., Juntawong P. y Peña-Castro J. M. 2016. Transcriptomic analysis of submergence-tolerant and sensitive *Brachypodium distachyon* ecotypes reveals oxidative stress as a major tolerance factor. *Scientific reports*. 6, 1-15.
- Rojo S. S. y Delgado H. L. 2010. Peróxido de hidrógeno como inductor de tuberización *in vitro* en plantas de papa. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*. 35(3), 213-216.

- Sairam R y Tyagi A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Currement Sci.* 86, 3-10.
- Schützendübel A., Nikolova P., Rudolf C. y Polle A. 2002. Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populusx canescens* roots. *Plant Physiology and Biochemistry.* 40(6), 577-584.
- Shafii B., Vismeh R., Beaudry R., Warner R. y Jones A. D. 2012. Large-scale profiling of diterpenoid glycosides from *Stevia rebaudiana* using ultrahigh performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 403(9), 2683-2690.
- Shafii B., Vismeh R., Beaudry R., Warner R. y Jones A. D. 2012. Large-scale profiling of diterpenoid glycosides from *Stevia rebaudiana* using ultrahigh performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 403(9), 2683-2690.
- Shakeran Z., Keyhanfar M., Asghari G. y Ghanadian M. 2015. Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel*. *Turkish Journal of Biology.* 39(1), 111-118.
- Sharafi E., Nekoei S. M. K., Fotokian M. H., Davoodi D., Mirzaei H. H. y Hasanloo T. 2013. Improvement of hypericin and hyperforin production using zinc and iron nano-oxides as elicitors in cell suspension culture of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Journal of Medicinal Plants and By-Products.* 2(2), 177-184.
- Shivanna N., Naika M., Khanum F. y Kaul V. K. 2012. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Complications.* 27(2), 103-113.
- Singleton V. L., Orthofe R. y Lamuela-Raventos R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Slesak I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S. y Miszalski Z. 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta biochimica polonica.* 54(1), 39-50.
- Soejarto D. 2002. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In A. Kinghorn (Ed.), *Stevia: The genus Stevia*. London, New York: Taylor and Francis. 18-39.

- Solecka D. 1997. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum*. 19(3), 257-268.
- Srivastava S. y Srivastava M. 2014. Morphological changes and antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* under water stress. *American Journal of Plant Sciences*. 5(22), 3417-3422.
- Srivastava V., Kaur R., Chattopadhyay S. K. y Banerjee S. 2013. Production of industrially important cosmaceutical and pharmaceutical derivatives of betuligenol by *Atropa belladonna* hairy root mediated biotransformation. *Ind. Crops Prod*. 44, 171-175.
- Staswick P. E., Su W. y Howell S. H. 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89(15), 6837-6840
- Suárez E. I. y Salgado A. J. 2008. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. (Asteraceae) a través de organogénesis. Universidad de Córdoba, Dpto de Ingeniería Agronómica. Carrera 6 No. 76-103. Temas agrarios. 13(1), 40-48.
- Suga T. y Endo T. 1991. Granyl diphosphate synthase in leaves of *Pelargonium roseus*. *Phytochem*. 30(6), 1957-1761.
- Tang Z., Yang L., Zu Y. y Guo X. 2009. Variations of vinblastine accumulation and redox state affected by exogenous H₂O₂ in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant growth regulation*. 57(1), 15-20.
- Tomás-Barberán F. A. y Espin J. C. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81(9), 853-876.
- Torrey J. G. y Clarkson D. T. 1975. The Development and Function of Roots. Academic Press, New York.
- Tripathi D. K., Singh S., Singh S., Srivastava P. K., Singh V. P., Singh S. y Chauhan D. K. 2017. Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 110, 167-177.
- Ukiya M., Sawada S., Kikuchi T., Kushi Y., Fukatsu M. y Akihisa T. 2013. Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of steviol and isosteviol derivatives against human cancer cell lines. *Chem Biodivers*. 10, 177-188.

- Vanisree M. y Tsay H. 2007. Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. En: Kayser O, Quax W (Eds) Medicinal plant biotechnology. *From basic research to industrial application*. 267-285.
- Vanisree M. y Tsay H-S. 2004. Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*. 2(1), 29-48.
- Večeřová K., Večeřa Z., Dočekal B., Oravec M., Pompeiano A., Tříška J. y Urban O. 2016. Changes of primary and secondary metabolites in barley plants exposed to CdO nanoparticles. *Environmental Pollution*. 218, 207-218.
- Vera-Reyes I., Huerta-Heredia A. A., Ponce-Noyola T., Flores-Sanchez I. J. y Esparza-García F. 2013. Strictosidine-related enzymes involved in the alkaloid biosynthesis of *Uncaria tomentosa* root cultures grown under oxidative stress. *Biotechnol. Progress*. 29(3), 621-630.
- Vera-Reyes I., Ponce-Zambrano R., Lira-Saldívar R. H., Ruiz-Torres N. A., Méndez-Arquello B., Mendoza-Mendoza E. y García-Cerda L. A. 2015. Efecto de nanopartículas de óxido de zinc y cobre en germinación y crecimiento de plántulas de *Solanum lycopersicum* y *Cucumis melo*. In: Sánchez-Vázquez M., Sánchez-Castro M.E., Fernández-Luqueño F. (Eds.). Encuentro de Química Inorgánica (EQI-2015). Cinvestav, México. 160.
- Verpoorte R. 2000. Plant secondary metabolism. In *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. 1-29. eds. R. Verpoorte and A. W. Alfermann (Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, The Netherlands).
- Verpoorte R., Contin A. y Memelink J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Review*. 1, 13-25.
- Villalobos V. M. y Thorpe T. A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. *Fundamentos y aplicaciones*. 6, 127-141.
- Wagner H. y Blatt S. 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer Science y Business Media.

- Wang Y., Dai C. C., Zhao Y. W. y Peng Y. 2011. Fungal endophyte-induced volatile oil accumulation in *Atractylodes lancea* plantlets is mediated by nitric oxide, salicylic acid and hydrogen peroxide. *Process Biochemistry*. 46(3), 730-735.
- Washida D., Shimomura K., Takido M. y Kitanaka S. 2004. Auxins affected ginsenoside production and growth of hairy roots in *Panax hybrid*. *Biol. Pharm.* 27, 657-660.
- Wasternack C. 2007. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*. 100, 681-697.
- Wöelwer-Rieck U., Lankes C., Wawrzun A. y Wust, M. 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology*. 231(4), 581-588.
- Wöelwer-Rieck U., May B., Lankes C. y Wüst M. 2014. Methylerythritol and mevalonate pathway contributions to biosynthesis of mono-, sesqui-, and diterpenes in glandular trichomes and leaves of *Stevia rebaudiana* bertonii. *Journal of agricultural and food chemistry*. 62(11), 2428-2435.
- Woodbury W., Spencer A. K. y Stahmann M. A. 1971. Un procedimiento mejorado usando ferricianuro para detectar isoenzimas catalase. *Anal. Biochem.* 44, 301-305.
- Yamazaki T., Flores H. E., Shimomura K. y Yoshihira K. 1991. Examination of steviol glucosides production by hairy root and shoot cultures of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Natural Products*. 54(4), 986-992.
- Yang Y., Huang S., Han Y., Yuan H., Gu C. y Wang Z. 2015. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 86, 174-180.
- Yarizade K. y Hosseini R. 2015. Expression analysis of ADS, DBR2, ALDH1 and SQS genes in *Artemisia vulgaris* hairy root culture under nano cobalt and nano zinc elicitation. *Ext J App Sci*. 3(3), 69-76.
- Yukimune Y., Tabata H., Higashi Y. y Hara Y. 1996. Methyl Jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature biotechnol.* 14, 1129-1132.

- Zaker A., Sykora C., Gössnitzer F., Abrishamchi P., Asili J., Mousav S. H. y Wawrosch C. 2015. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. *Industrial Crops and Products*. 67, 97-102.
- Zeng J., Cai W., Yang W. y Wu W. 2013. Antioxidant abilities, phenolics and flavonoids contents in the ethanolic extracts of the stems and leaves of different *Stevia rebaudiana* Bert lines. *Sugar Tech*. 15(2), 209-213.
- Zhang B., Zheng L. P., Yi Li W. y Wen Wang J. 2013. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by Ag-SiO₂ core-shell nanoparticles. *Current Nanoscience*. 9(3), 363-370.
- Zhang C., Yan Q., Cheuk W. y Wu J. 2004. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag elicitation and nutrient feeding. *Plant med*. 70, 147-151.
- Zhao J. L., Zhou L. G. y Wu J. Y. 2010. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(1), 137-144.
- Zhao J., Davis L. C. y Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 23, 283-333.
- Zhao L., Peng B., Hernandez-Viezcas J. A., Rico C., Sun Y., Peralta-Videa J. R. y Zhang J. Y. 2012. Stress response and tolerance of *Zea mays* to CeO₂ nanoparticles: cross talk among H₂O₂, heat shock protein, and lipid peroxidation. *ACS nano*, 6(11), 9615-9622.