

Comparação de diferentes metodologias para obtenção de cultura de calos de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni

Ana Paula Patrão¹, Ananda de Castro Cunha², Valeria Rodrigues Celloto² Eliezer Rodrigues de Souto³, Regina Aparecida Correia Gonçalves² e Arildo José Braz de Oliveira^{2*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

²Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ³Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: ajboliveira@uem.br

RESUMO. As folhas de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Asteraceae) contêm glicosídeos diterpenóides (GDS), que são cerca de 300 vezes mais doce que a sacarose a 4%. O objetivo deste estudo foi avaliar a formação de calos, a partir de folhas obtidas *in vivo* e *in vitro* de *S. rebaudiana* em dois meios já descritos na literatura: Murashige e Skoog (MS), suplementado com 3 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), e o MS suplementado com 1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,5 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina 6-BAP) e um desenvolvido em nosso laboratório o Woody Plant Medium (WPM), suplementado com 6 mg L⁻¹ de ANA e 4 mg L⁻¹ de cinetina (CIN). Os explantes obtidos *in vitro* iniciaram a formação de calos um pouco mais rapidamente que os das folhas de plantas advindas da natureza. A utilização dos nutrientes do meio WPM, associada a uma combinação de fitorreguladores adequada, proporcionou velocidade de indução e multiplicação de calos bem maiores que as apresentadas nos meios que empregaram os nutrientes do MS. Novos experimentos serão realizados, depois de alcançada a estabilidade genética dos calos, visando avaliar a capacidade destes em biosintetizar os GDS.

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana*, Asteraceae, cultura de calos, glicosídeos diterpenóides, adoçante.

ABSTRACT. Comparison of different methodologies for obtaining callus cultures from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. The leaves from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Asteraceae) contain diterpenoid glycosides (GDS), which are almost 300 times sweeter than sucrose at 4%. The subject of this study was to evaluate the callus-formation from *in vivo* and *in vitro* leaves of *Stevia rebaudiana* in two already described in literature: Murashige and Skoog (MS) supplemented with 3 mg L⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); MS supplemented with 1 mg L⁻¹ of naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.5 mg L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (6-BAP) and other developed in our laboratory the Woody Plant Medium (WPM) with 6 mg L⁻¹ of NAA and 4 mg L⁻¹ of Kinetin (KIN). The explants obtained *in vitro* initiated callus formation faster than leaves from natural plants. The utilization of WPM nutrients, associated with an adequate combination of phytohormones, provided greater callus induction velocity and multiplication than the media that using MS nutrients. New experiments will be conducted after reaching genetic stability of the calluses, seeking to evaluate the capacity of these calluses to biosynthesize GDS.

Key words: *Stevia rebaudiana*, Asteraceae, callus culture, diterpenoid glycosides, sweetener.

Introdução

A *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni é uma planta endêmica originária do Paraguai e pertencente à família Compositae (Kinghorn e Soejarto, 1986; Lyakhovkin *et al.*, 1993; Matsui *et al.*, 1996). As folhas de *S. rebaudiana* contêm glicosídeos diterpenóides (GDS), que são cerca de 300 vezes mais doces que a sacarose a 4% (Kinghorn e Soejarto, 1986). Estes glicosídeos são compostos atóxicos, não-mutagênicos e não-calóricos, despertando grande

interesse por esta planta (Lyakhovkin *et al.*, 1993; Matsui *et al.*, 1996). Os GDS são representados, principalmente, por esteviosídeos e também pelos rebaudiosídeo A e C (Lyakhovkin *et al.*, 1993; Tamura *et al.*, 1984; Bondarev *et al.*, 2001).

O extrato concentrado de *S. rebaudiana*, em dose normal, pode ser usado como adoçante sem restrição por pessoas saudáveis e também por diabéticos. A diminuição de açúcar na alimentação é benéfica para diabéticos por baixar a concentração sanguínea de glicose. *S. rebaudiana* e esteviosídeo são também

seguros para paciente com fenilcetonúria. Pessoas obesas podem perder peso, substituindo o açúcar excessivo na alimentação por *S. rebaudiana* e esteviosídeo (Boeckh e Humboldt, 1981).

Estudos indicaram também que o esteviosídeo purificado induz redução na pressão sangüínea, diurese e natriurese em ratos (Boeckh e Humboldt, 1981). Administração intravenosa do esteviosídeo resultou em efeito hipotensivo significativo em ratos hipertensos, sem efeitos adversos em ratos doentes e no nível sérico das catecolaminas (Chan et al., 1998).

Tomita et al. (1997) descreveram que o extrato aquoso obtido, a quente, de *S. rebaudiana* (SE) possui um importante efeito bactericida contra *Escherichia coli* enterohemorrágica e outras bactérias envolvidas em intoxicação alimentar. Posteriormente, Takahashi et al. (2001) relataram que o SE inibe a replicação do Rotavírus HRV.

As culturas de *S. rebaudiana in vitro* são conhecidas como excelente sistema modelo na elucidação das características de produção destes diterpenóides glicosídeos (Bondarev et al., 2001). A produção de GDS, em culturas de *S. rebaudiana in vitro* é pouco entendida e os resultados obtidos por diversos autores são bastante contraditórios (Bondarev et al., 2001), por exemplo, Nabeta et al. (1976), Suzuki et al. (1976) e Miyagawa et al. (1984) não encontraram evidências da presença de GDS em cultura de calos e de células em suspensão de *Stevia rebaudiana*, entretanto Lee e Kang (1982) detectaram esteviosídeos em tecidos de calos de *S. rebaudiana*.

Com finalidade de verificar a capacidade dos calos em produzir os GDS, compostos fenólicos e polissacarídeos, o objetivo principal deste trabalho foi investigar a indução e o desenvolvimento de calos a partir de folhas de *S. rebaudiana* Bertoni cultivadas *in vivo* e comparar com os calos originados a partir de folhas de plântulas de *S. rebaudiana* cultivadas *in vitro*.

Material e métodos

Material botânico

As plântulas de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni cultivadas *in vitro* foram obtidas via micropropagação de espécies selecionadas e melhoradas, doadas pela empresa SteviaFarma (Maringá, Estado do Paraná). As folhas de plântulas desenvolvidas *in vitro* foram empregadas como explantes para estudar a formação de calos *in vitro*.

As folhas das plantas de *S. rebaudiana* foram coletadas no Horto Didático de Plantas Medicinais Professora Irenice Silva da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Estado do Paraná, depois de

desinfetadas e foram utilizadas como fonte de explantes para produção de calos.

Protocolo de desinfecção

As folhas foram coletadas pela manhã e deixadas por aproximadamente duas a três horas em água corrente, após adicionou-se cinco gotas de detergente e manteve-se em contato com o mesmo por 30 segundos para diminuir a tensão superficial e facilitar os tratamentos posteriores. Na sequência, foram enxaguadas e os seguintes procedimentos realizados em capela de fluxo laminar. As folhas foram lavadas com álcool 70% (v v⁻¹) por um minuto, depois deixadas em contato com a solução Folicur 0,02% (50 µL de Tebuconazol a 20% 500 mL⁻¹ água destilada) por cinco minutos, em seguida, lavou-se com uma solução de cloreto de mercúrio 0,05% (p v⁻¹) por dez minutos e, por fim, enxaguou-se três vezes com água deionizada estéril.

Indução e formação dos calos

As folhas foram cortadas em formato retangular, com aproximadamente 0,5 cm de largura por 1 cm de comprimento e transferidas para os seguintes meios de cultura: Murashige e Skoog (Murashige e Skoog, 1965), suplementado com 3 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D); MS suplementado com 1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,5 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (6-BAP) e o Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd e McCown, 1980), suplementado com 6 mg L⁻¹ de NAA e 4 mg L⁻¹ de cinetina (CIN), sendo cinco repetições para cada tratamento. Todos os meios foram autoclavados a 121°C por 20 min. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 25°C ± 1°C, a sala foi iluminada por lâmpadas fluorescentes (40 W), com intensidade variando de 2000-3000 lux, com fotoperíodo de 14 horas de luz. As culturas foram avaliadas visualmente a cada semana, e os dados foram registrados após quatro semanas de inoculação.

Resultados e discussão

As folhas de *S. rebaudiana* cultivadas *in vivo* e *in vitro* foram empregadas como explantes e avaliadas quanto à sua capacidade de produzir calos em três diferentes meios para indução de calos, utilizando dois meios já descritos na literatura: MS suplementado com 3 mg L⁻¹ 2,4-D (Uddin et al., 2006), o MS suplementado com 1 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de 6-BAP (Bondarev et al., 2001) e um meio desenvolvido em laboratório da UEM para formação de calos o WPM, suplementado com 6 mg L⁻¹ de ANA e 4 mg L⁻¹ de CIN. Os resultados da

indução e multiplicação dos calos estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Períodos, cores e quantidades de formação de calos a partir das folhas de *Stevia rebaudiana* cultivadas no Horto Didático de Plantas Medicinais Professora Irenice Silva, em diferentes meios de cultivo.

Meios de cultura	Dias para iniciação	Cor dos calos	Quantidade de calos	Observações
MS + 3 mg L ⁻¹ 2,4-D	21	Amarelo-marrom	Média	Calos sem clorofila
MS + 1 mg L ⁻¹ NAA + 0,5 mg L ⁻¹ 6-BAP	15	Verde-amarelado	Pobre	Poucos calos, presença de clorofila
WPM + 6 mg L ⁻¹ NAA + 4 mg L ⁻¹ CIN	8	Verde-amarelado	Alta	Quantidades maiores de calos e presença de clorofila

Tabela 2. Períodos, cores e quantidades de formação de calos a partir das folhas de plântulas cultivadas *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, em diferentes meios de cultivo.

Meios de cultura	Dias para iniciação	Cor dos calos	Quantidade de calos	Observações
MS + 3 mg L ⁻¹ 2,4-D	15	Amarelo-marrom	Média	Calos sem clorofila
MS + 1 mg L ⁻¹ NAA + 0,5 mg L ⁻¹ 6-BAP	15	Amarelados	Pobre	Poucos calos, presença de clorofila
WPM + 6 mg L ⁻¹ NAA + 4 mg L ⁻¹ CIN	7	Verde-amarelado	Alta	Quantidades maiores de calos e presença de clorofila

Os explantes obtidos de folhas de plântulas cultivadas *in vitro* iniciaram a formação de calos praticamente ao mesmo tempo em que os das folhas de plantas advindas do Horto Didático de Plantas Medicinais Professora Irenice Silva, Tabelas 1 e 2, quando comparado no mesmo meio de cultivo.

Surpreendentemente, a maior formação de calos ocorreu no meio desenvolvido em nosso laboratório, Tabelas 1 e 2, WPM suplementado com 6 mg L⁻¹ de ANA e 4 mg L⁻¹ de KIN, levando-se em consideração a velocidade de indução e quantidades de calos tanto nas folhas advindas do Horto Didático de Plantas Medicinais Professora Irenice Silva como as do cultivo *in vitro*. Os meios MS e B5 (Dixon e Gonzales, 1994) são, normalmente, os mais utilizados na literatura para a indução de calos em plantas, por isso, no caso da *S. rebaudiana*, a maioria dos autores utilizam o meio MS em combinação com diferentes concentrações de auxinas e citocininas com este objetivo (Bondarev *et al.*, 2001; Uddin *et al.*, 2006).

O meio WPM, suplementado com 6 mg L⁻¹ de ANA e 4 mg L⁻¹ de KIN, além destas características descritas anteriormente, apresentou, ainda, uma outra interessante, a presença de calos esverdeados, Tabela 1, isso é importante porque a presença de

cloroplastos ativos é requerimento essencial para que os calos de *S. rebaudiana* retenham a capacidade de biossintetizar os compostos bioativos glicosídeos diterpênicos (Kornilova *et al.*, 1997).

O grande obstáculo para utilização da cultura de calos para a produção dos glicosídeos diterpênicos é que estes são produzidos em concentrações bem inferiores às das plantas matrizes (Bondarev *et al.*, 2001). No entanto, estas dificuldades podem ser superadas, empregando-se metodologias que estimulam a produção deste metabólitos como, por exemplo, a elicitação, adição de precursores e alterações na composição dos meios de cultivo (Wang e Zhong, 2002). Outros compostos de interesse farmacológico que podem ser obtidos a partir de cultura de calos de *S. rebaudiana* são os compostos fenólicos. Tadhani *et al.* (2007) relataram que os extratos metanólicos e aquosos, obtidos a partir dos mesmos de *S. rebaudiana*, apresentam alta porcentagem de inibição de radicais livres e que esta atividade está relacionada a altas concentrações de flavonóides e outros compostos fenólicos produzidos nos calos.

Alternativamente, as culturas de calos e células de plantas podem ser empregadas para a produção de metabólitos primários tais como as proteínas, os ácidos graxos e polissacarídeos de interesse comercial (Machado *et al.*, 2006). A produção de polissacarídeos em cultura de tecidos de calos, por exemplo, foram verificadas nas espécies *Melittis melissophyllum* (Skrzypczak-Pietraszek e Hensel, 2000), *Silene vulgaris* (Gunter e Ovodov, 2002) e *Cereus peruvianus* (Machado *et al.*, 2004). As culturas de calos das três espécies produzem tipos e quantidades similares de polissacarídeos aos que são produzidos pelas plantas cultivadas na natureza. A cultura de calos e células de *S. rebaudiana* é uma alternativa muito interessante para produção de metabólitos primários, principalmente os polissacarídeos. A esse respeito, Takahashi *et al.* (2001) relataram que o extrato aquoso obtido a partir das folhas de *S. rebaudiana* inibe a replicação do Rotavírus HRV e que os principais componentes responsáveis por esta atividade, no extrato de *S. rebaudiana*, é uma mistura de polissacarídeos aniônicos, justificando o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de metodologias para a indução e formação de calos.

Conclusão

A utilização dos nutrientes do meio WPM associada à combinação de fitorreguladores adequada proporcionou velocidade de indução e multiplicação de calos bem maiores que as apresentadas pelos

outros dois meios descritos na literatura, empregando os nutrientes do MS.

Esses resultados são animadores, pois permitem projetar a realização de novos experimentos que serão realizados posteriormente, depois de alcançada a estabilidade genética dos calos, visando avaliar a capacidade destes calos em biossintetizar os GDS, flavonóides, outros compostos fenólicos e de polissacarídeos de interesse farmacológico.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro, e à SteviaFarma Industrial SA (Maringá, Estado do Paraná), pelo fornecimento das mudas e pelo suporte financeiro.

Referências

- BOECKH, E.M.A.; HUMBOLDT, G. Cardio-circulatory effects of total water extract in normal individuals and of stevioside in rats [in Portuguese]. *Cienc. Cult.*, Campinas, v. 32, p. 208-210, 1981.
- BONDAREV, N.I. *et al.* Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Sci.*, Limerick, v. 161, p. 155-163, 2001.
- CHAN, P. *et al.* The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.*, Oxford, v. 63, n. 19, p. 1679-1684, 1998.
- DIXON, A.R.; GONZALES, R.A. *Plant cell culture: a practical approach*. 2nd ed. New York: Oxford University, 1994.
- GUNTER, E.A.; OVODOV, Y. An alternate carbon source for enhancing production of polysaccharides by *Silene vulgaris* callus. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 334, n. 18, p. 1641-1645, 2002.
- KINGHORN, A.D.; SOEJARTO, D.D. Sweetening agents of plant origin. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, Boca Raton, v. 4, p. 79-120, 1986.
- KORNILOVA, O.V. *et al.* Stevia is a producer of low-calorie compounds which are sugar alternatives, new and non-traditional plants and prospects of their practical utilization. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 2., 1997, Puschino (in Russian). *Abstracts...* Puschino: [S.n.], 1997. v. 2, p. 53-55.
- LEE, J.I.; KANG, K.K. Studies on the callus culture of stevia as a new sweetening source and formation of stevioside. *Hanguk Chuksan Hakhoe Chi.*, Suwon, v. 14, p. 179-183, 1982.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, Asheville, v. 30, p. 421-427, 1980.
- LYAKHOVKIN, A.G. *et al.* Cultivation and utilization of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Hanoi: Agric. Pub. House, 1993.
- MACHADO, F.A.P.S.A. *et al.* Polysaccharide from callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *Crop Breed. Appl. Biotechnol.*, Lavras, v. 4, p. 127-134, 2004.
- MACHADO, F.A.P.S.A. *et al.* Fatty acids production from plants and callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *J. Plant Sci.*, New York, v. 1, p. 368-373, 2006.
- MATSUI, M. *et al.* Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis*, Oxford, v. 11, n. 6, p. 573-579, 1996.
- MIYAGAWA, H. *et al.* Studies on the tissue culture of *Stevia rebaudiana* and its components. *Shoyakugaku Zasshi*, Tokyo, v. 38, p. 12-18, 1984.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1965.
- NABETA, K.K. *et al.* Phytosterol from the callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 40, p. 2103-2104, 1976.
- SKRZYPCZAK-PIETRASZEK, E.; HENSEL, A. polysaccharides from *Melittis melissophyllum* L. herb and callus. *Pharmazie*, Berlin, v. 55, p. 768-771, 2000.
- SUZUKI, H. *et al.* Isolation and identification of rutin from cultured cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 40, p. 819-823, 1976.
- TADHANI, M.B. *et al.* In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J. Food Compos. Anal.*, San Diego, v. 20, p. 323-329, 2007.
- TAKAHASHI, K. *et al.* Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Res.*, Amsterdam, v. 49, p. 15-24, 2001.
- TAMURA, Y. *et al.* Comparison of *Stevia* plants grown from seeds, cuttings and stem-tipp cultures for growth and sweet diterpene glucosides. *Plant Cell Rep.*, New York, v. 3, p. 180-182, 1984.
- TOMITA, T. *et al.* Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni towards Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria. *Microbiol. Immunol.*, Tokyo, v. 41, p. 1005-1009, 1997.
- UDDIN, M.S. *et al.* In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bert in Bangladesh. *Afr. J. Biotechnol.*, Nairobi, v. 5, n. 13, p. 1238-1240, 2006.
- WANG, Z.Y.; ZHONG J.J. Combination of conditioned medium and elicitation enhances taxoid production in bioreactor cultures of *Taxus chinensis* cells. *Biochem. Eng. J.*, Amsterdam, v. 12, p. 93-97, 2002.

Received on February 16, 2007.

Accepted on October 18, 2007.