



Efecto de variables ambientales sobre la síntesis de steviósidos y rebaudiósido A

ALFREDO JARMA OROZCO – HERMES ARAMENDIZ TATIS
Ph.D. Fisiología de Cultivos – Ph.D. Fitomejoramiento
Facultad de Ciencias Agrícolas
Universidad de Córdoba
Montería - Colombia

V SIMPOSIO INTERNACIONAL DE KA´A HE´Ë
STEVIA Ka´a He´ë – Stevia, la planta de la integración y patrimonio ancestral de América
17 y 18 de Noviembre de 2010 (Asunción – Paraguay)





Agradecimientos:

John Alarcón



PRODALYSA
next generation sweetener







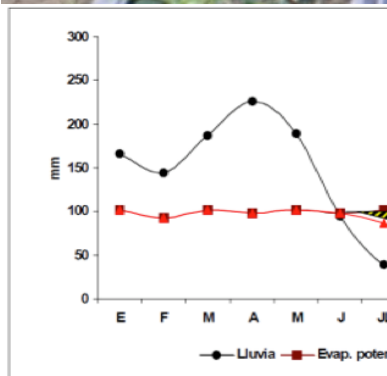
EL PROBLEMA PARA LOS CULTIVADORES:

EPOCAS DE ALTA, MEDIA Y BAJA PRECIPITACION

VARIACION EN LA OFERTA DE LUZ

VARIACION DE TEMPERATURAS

OTROS





OBJETIVO:

Determinar el efecto de la RFA y de las temperaturas máximas y mínimas registradas en tres épocas de siembra, sobre la cantidad de glucósidos totales (GT), la concentración de RebA y la relación RebA/OG en *Stevia* (M1 y M2)



Foto: Cortesía Sr. Francisco Guerrero. Cultivo Agroindustrias de la *Stevia*
(Cerrito – Valle del Cauca, Colombia)



Preguntas ?

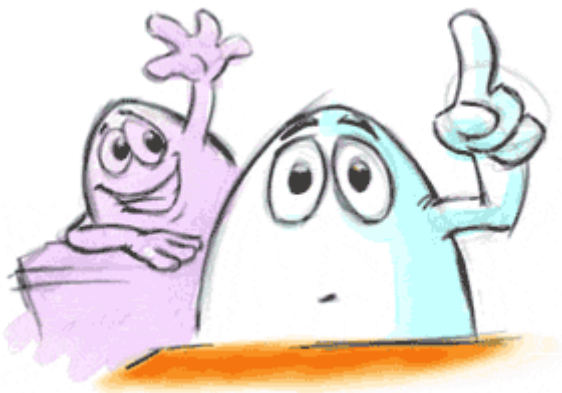
Questions ?

Perguntas ?

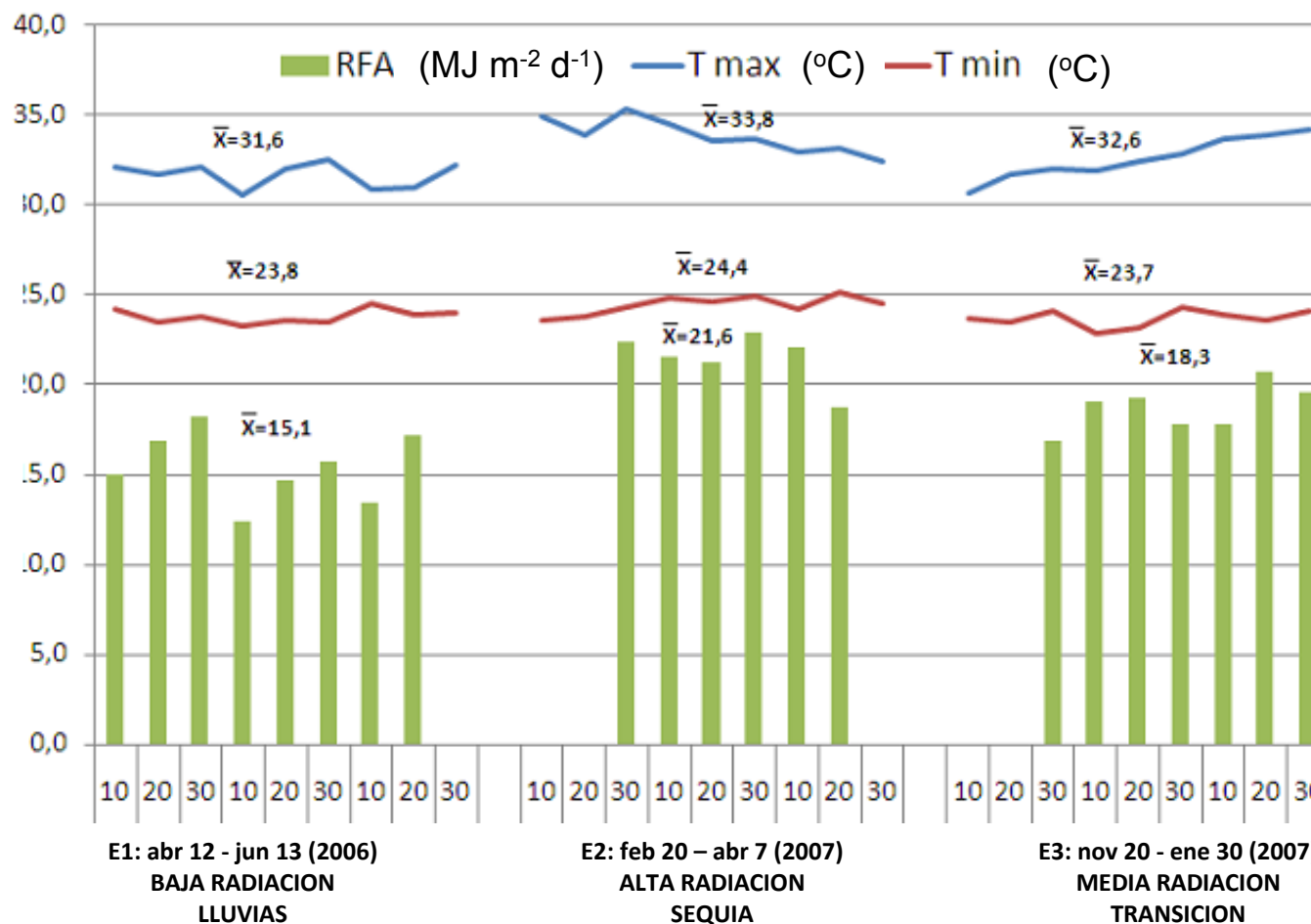
Fragen ?

שאלות ?

Вопросы ?



QUE EPOCAS ESCOGIERON?



Condiciones de RFA (MJ m⁻² s⁻¹), T max y T min (°C) en tres épocas de siembra





EN QUE BASARON SUS HIPÓTESIS?



Glucósidos de esteviol

RebA/St indicador de calidad mundial ($\approx 0,4$): 2-5% **RebA** / 4-10% **St**

(De Oliveira *et al.*, 2007)

Alta calidad de la hoja: RebA/St = 1 (> 1). RebA: + dulce y – amargo

(Carakostas *et al.*, 2008)

Síntesis depende: Genotipo y condiciones ambientales

(Gardana *et al.*, 2010)



Adaptabilidad *Stevia*

Gran variedad regiones geográficas mundo: Reporte de ellas: Ramesh *et al*, (2006)

Adaptabilidad: mejor comportamiento 35 - 45° latitud cada lado Ecuador

(Midmore y Rank, 2002)

Hábitat natural (nororiente paraguay: 21-22° S) se encuentra silvestre a:
200 y 700 m.s.n.m. Temperatura media anual de 22,5 °C (mín/max:
17/26°C). 1600 mm/año de precipitación

(Soejarto, 2002)

Como cultivo: Requerimientos luz y temp varían **significativamente** entre
regiones

(Hoyle, 1992)



Stevia y luz

Floración: fotoperíodo-dependiente: (>) cuando duración del día es (<). Sin embargo, algunos gen: día corto y otros: INSENSIBLES fotoperíodo

(Brandle, 2004)

Crecimiento y GT varían con genotipo: Genotipos floración temprana (respuesta a días cortos): probablemente (>) GT pero (<) MS (Sumida, 1980)

Genotipo sometidos a días largos: alta relación H/T (Brandle y Rosa, 1992)

Cmto vegetativo, AF, PSH y rend GT (50%): (>) días largos (Ramesh *et al.*, 2006)

Síntesis IPP: Directamente proporcional a RFA

(Metivier y Viana, 1979; Gunter, *et al.*, 1994)

Cmto vegetativo y GT: (<) 12 h pero (>) 16 h e intensidad luz (Yermakov y Kochetov, 1996)



Stevia y temperaturas

Rango óptimo:

Sakaguchi y Kan (1982): 15-30 °C, y soporta temp críticas de 0-2 °C

Midmore y Rank (2002): Cmo veg reduce: (<) 20 °C

Barathi (2003): Límites: Tmax = 40 °C y Tmin = 10 °C

Richard (2004): Límites: Tmax= 44 °C y Tmin = - 6 °C

Efecto de T sobre GT: Polémica mundial (Ramesh *et al.*, 2006)

Mizukami *et al.*, (1983): Rel $T^{\circ}_{\text{dia}}/T^{\circ}_{\text{noche}}$ factor determinante producción

GT: Mejor 25°C / 20°C

Nepovim *et al.*, (1998): T° NO influye en concentración GT

Parsons (2003): T° SI influye en concentración GT (directa y/o indirecta:

$T^{\circ}_{\text{dia}}/T^{\circ}_{\text{noche}}$)



QUE METODOLOGÍA UTILIZARON?



Universidad de Córdoba

13 msnm - 8°52' N y 76°48' W
T. anual: 28°C - H.R. 80%
p.p.: 1200 mm - BS: 2108,2 h año⁻¹

Diseño experimental

D.C.A.
6 tratamientos factorial 3 (E) x 2 (G)
12 Rep.

Anova

E – G – ExG
Interacción: tabla medias doble entrada
DMS: 5%

Correlación

Entre principales variables dep. e ind.
SAS versión 9.1.

GT y RebA (% MS hoja)

Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
Lab. Prodalysa Ltda (Chile)

OG = RebA - GT



**CUALES FUERON SUS
PRINCIPALES RESULTADOS?**



Promedio de RFA y Temperaturas

Época	RFA (MJ m ⁻² d ⁻¹)	Tmax (°C)	Tmin (°C)
E1 (> precip)	15,05	21,61	18,28
E2 (< precip)	31,6	33,7	32,5
E3 (½ precip)	23,8	24,4	23,6



Anova

Significancia estadística de los cuadrados medios de glucósidos totales (g/g hoja seca), rebaudiósido A (g/g GT) y relación rebaudiósido A/OG de dos genotipos de estevia sembrados en tres épocas del Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007

Fuente de Variación	gl	Cuadrado Medio del Error		
		GT (g/g hoja seca)	RebA (% de GT)	Relación RebA/OG
Épocas (E)	2	87,92 **	276,93 **	5,97 **
Genotipo (G)	1	34,72 **	401,37 **	6,96 **
E x G	2	21,09 **	85,76 *	3,93 *
Error	66	4,1287	19,7220	0,3029
Total	71			
Media		15,2	74,3	3,02
CV (%)		13,37	5,98	18,19

GT=Glucósidos totales; RebA=Rebaudiósido A; OG=Otros glucósidos; CV = Coeficiente de variación y gl = Grados de Libertad.
NS, * y ** = no significativo, significativo ($p \leq 0.05$) y altamente significativo ($p \leq 0.01$) respectivamente



Interacciones

Análisis de las interacciones ExG para glucósidos totales (g/g hoja seca), rebaudiósido A (g/g GT) y relación rebaudiósido A/OG de dos genotipos de estevia sembrados en tres épocas del Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007

Variables de calidad de la hoja

Gen	GT (g/100 g hoja seca)			RebA (g/100 g GT)			RebA/OG		
	E1 (<RFA)	E2 (>RFA)	E3 (½RFA)	E1 (<RFA)	E2 (>RFA)	E3 (½RFA)	E1 (<RFA)	E2 (>RFA)	E3 (½RFA)
	M 1	13,1 b	13,0 b	17,3 a	71,2 b	77,4 a	67,1 c	2,5 b	3,5 a
M 2	13,9 b	16,5 a	17,2 a	77,5 a	77,8 a	77,5 a	3,4 a	3,6 a	2,9 b
DMS (5%)		1,65			3,61			0,4	

GT=Glucósidos totales; Reb-A=Rebaudiósido A; OG=Otros glucósidos; Promedios con la misma letra dentro de un mismo genotipo y variable son iguales estadísticamente de acuerdo al test protegido de DMS (5%)



Correlaciones

Coeficientes de correlación de Pearson $N=36$ y $Pr > |r|$ entre variables ambientales y calidad de la hoja de dos genotipos de estevia cultivados en tres ambientes del Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007.

	RFA (MJ m ⁻² d ⁻¹)		Tmax (°C)		Tmin (°C)		Media ± SD	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
GT (g/100 g hs)	0,624 <0,000	0,557 0,000	0,717 <0,000	NS	0,570 0,000	NS	0,14±0,0	0,15±0,0
RebA (g/g GT)	NS	-0,465 0,004	-0,502 0,001	-0,602 0,000	-0,589 0,000	-0,512 0,001	0,71±0,0	0,76±0,0
RebA/OG	NS	-0,430 0,008	-0,571 0,000	-0,590 0,000	-0,656 <0,000	-0,517 0,001	2,71±0,8	3,32±0,8
Media ± SD	18,4±2,6		32,8±0,7		23,7±0,4			

GT=Glucósidos totales; hs=hoja seca; RebA=rebaudiósido A; OG=Otros glucósidos; RFA=Radiación fotosintéticamente activa; Tmax=Temperatura máxima; Tmin=Temperatura mínima; SD=Desviación estándar. NS=No significativo (p>0.05).



Discusión

GT

Respuestas genéticas diferenciales

Luz: GA3P / A. Piruvico – IPP

AltasT° : DESCONOCIMIENTO. cambios regulador transcripcional (bHLH) – Factor Interactuante del Fitocromo 4 (PIF4): regulado x G – (> afectado en M1 vs M2?). Polémica mundial (Nepovim vs Parsons).

Hidroxilación *ent*-KA a esteviol: NAPH y O₂

RebA y RebA/OG

RFA yT°: Induce glucosilaciones del esteviol principalmente en OG pero no en RebA

RFA y To: Probablemente favorecieron:

UGT85C2 (steviol a steviolmonósido), *UGT74G1* (steviolbiósido a steviósido)

UGT76G1



Foto: Cortesía Sr. Francisco Guerrero.
Cultivo Agroindustrias de la Stevia
(Cerrito – Valle del Cauca, Colombia)



Discusión

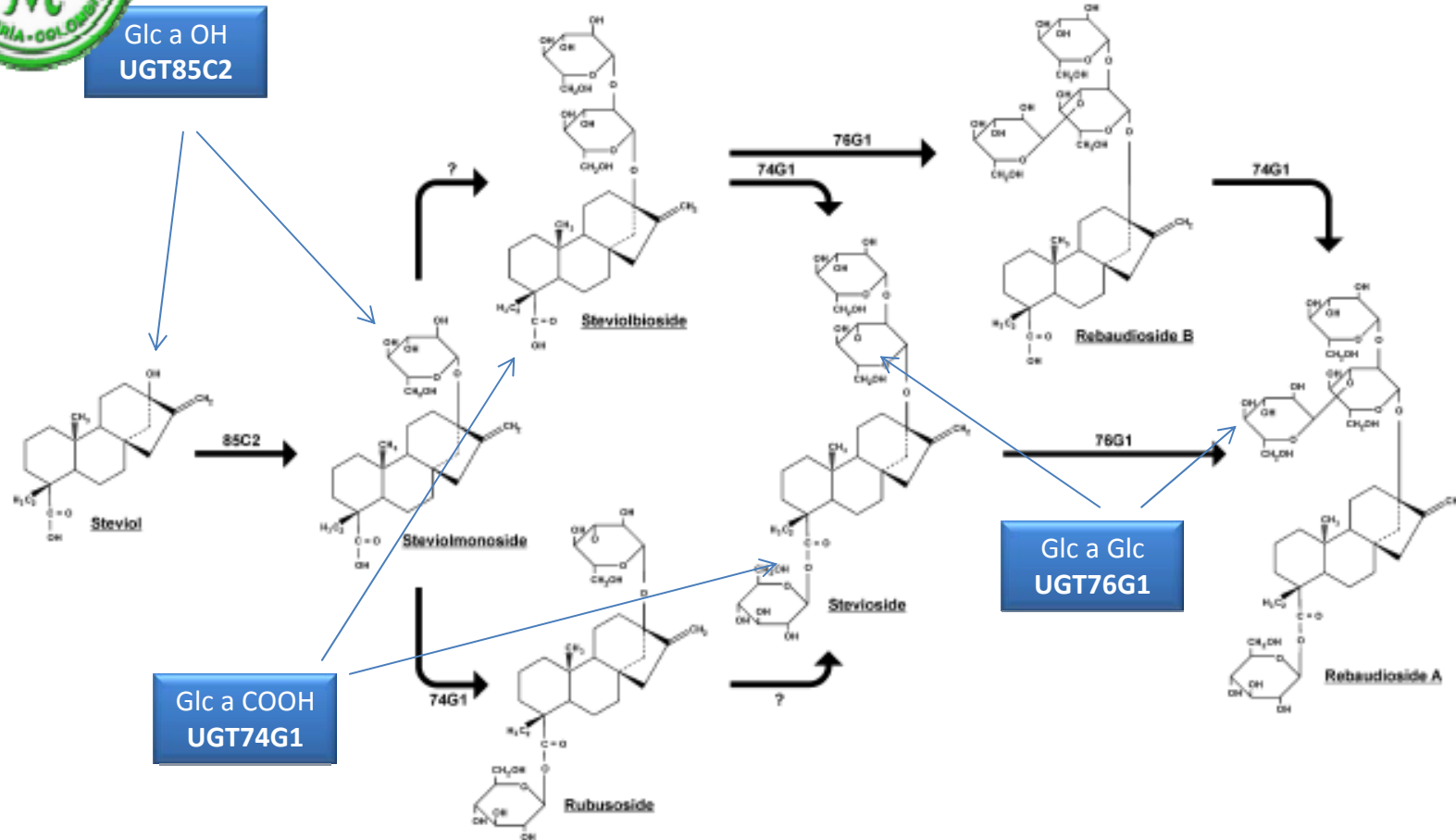


Figure 8. Proposed enzymes and biosynthetic pathway for the synthesis of rebaudioside A from the aglycone steviol.



**CUALES FUERON SUS
PRINCIPALES CONCLUSIONES?**



En términos generales, el aumento en la concentración de GT correlaciona positivamente con la RFA en M1 y M2 y con las temperaturas (máximas y mínimas) en M1.

Este aumento se expresa principalmente por un aumento en la concentración de OG y no de RebA, aunque para M1, al incrementarse la oferta de RFA, el aumento en la concentración de todos los glucósidos es similar



RFA y temperaturas correlacionan con la concentración de RebA (negativa) y OG (positiva).

Esta concentración diferencial sería gobernada principalmente por características del genotipo que, ante estos estímulos ambientales codificarían diferencialmente genes involucrados en síntesis de enzimas que catalizan reacciones específicas de glucosilaciones del esteviol, principalmente UGT 85C2 y UGT74G1 que transfieren UDP-glucosa en la formación de esteviolmonónido y estevióside respectivamente.



Foto: Cortesía Sr. Francisco Guerrero. Cultivo Agroindustrias de la Stevia
(Cerrito – Valle del Cauca, Colombia)



El Caribe Colombiano



DONDE FUE QUE HICIERON EL TRABAJO?

