



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
Y PERFIL PROTEÓMICO EN PLÁNTULAS
TRANSFORMADAS Y SILVESTRES DE *Stevia
rebaudiana***

TESIS

**Para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología**

Presenta:

Ángel de Jesús Sánchez Córdova

Director de Tesis

Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia

Co-Director de Tesis

Dr. Edgar García López

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. 2019.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2019/MBV/029
ASUNTO	Jurado de examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 20 de febrero de 2019

C. ÁNGEL DE JESÚS SÁNCHEZ CÓRDOVA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores:

Dr. Enrique Villalobos Amador	UNPA	Presidente
Dr. David Paniagua Vega	UANL	Vocal
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	UNPA	Secretario
Dr. Julián Mario Peña Castro	UNPA	1er Suplete
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	UNPA	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

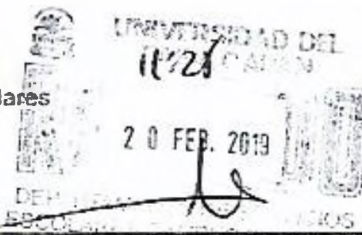
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi jí ju



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.

C.c.p. Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia – Directora de tesis
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo



CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocaril S/N, Ciudad universitaria
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPAALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/076
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 20 de febrero de 2019

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPAALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del **C. Ángel de Jesús Sánchez Córdoba**, matrícula **16140014**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Producción de metabolitos secundarios y perfil proteómico en plántulas transformadas y silvestres de *Stevia rebaudiana***" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

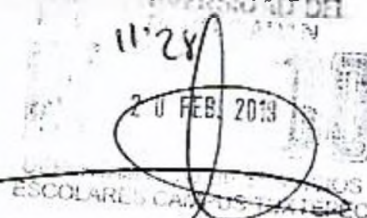
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú



Dr. Adolfo López Torres

Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Ángel de Jesús Sánchez Córdoba
C.c.p. Archivo



CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan en el laboratorio de Cultivo de Células Vegetales y en el Departamento de Plásticos en la Agricultura del Centro de Investigación en Química Aplicada en el laboratorio de Agrobiotecnología, bajo la dirección de la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia y del Dr. Edgar García López. Para la realización de los estudios se obtuvo el apoyo económico de la beca CONACyT (No. 615648) perteneciente al programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131, así como con el financiamiento del Proyecto de Cátedra CONACyT 3212 “Estudio integral de plantas medicinales para la producción y estandarización de fitoextractos” No. 235307 y del proyecto INFRA 255514: Equipamiento para fortalecer la investigación en Cultivo de Tejidos y Producción de Metabolitos Secundarios Vegetales de la Universidad del Papaloapan.



PRODUCTOS DE ESTA INVESTIGACIÓN

CARTELES

Sánchez-Córdova, A. J., Jiménez-Brigada A., López-Torres, A., García-López, E., y Huerta-Heredia, A. A. “Producción de glucósidos de esteviol en plántulas silvestres y transformadas de *Stevia rebaudiana*”. Poster. IV Encuentro Nacional sobre Biotecnología en la UATx. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México del 3 al 6 de diciembre de 2017.

Sánchez-Córdova, A. J., López-Torres, A., García-López, E., y Huerta-Heredia, A. A. “Evaluation of physiological parameters and biomass accumulation in transformed and wild type *stevia rebaudiana* seedling”. Poster. 1^{er} Encuentro de Estudiantes de Licenciatura y Posgrado UNPA. Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca, México del 2 al 9 de febrero de 2018.








ARTICULO

Sugar Tech
<https://doi.org/10.1007/s12355-018-0681-4>



RESEARCH ARTICLE

***Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation Enhances Steviol Glycosides Production and Growth in *Stevia rebaudiana* Plantlets**

Ángel de Jesús Sánchez-Cordova¹  · Jacqueline Capataz-Tafur²  ·
Blanca Estela Barrera-Figueroa²  · Adolfo López-Torres³  ·
Paul Mauricio Sanchez-Ocampo^{2,4}  · Edgar García-López^{2,4}  ·
Ariana Arlene Huerta-Heredia^{2,4} 

Received: 19 August 2018 / Accepted: 9 November 2018
© Society for Sugar Research and Promotion 2019

AGRADECIMIENTOS

Primeramente doy gracias a DIOS por haberme permitido tener tan gratas experiencias de aprendizaje dentro de mi universidad, gracias a mi universidad por permitirme ser un profesional en lo que tanto me apasiona, gracias a cada maestro que hizo parte de este arduo proceso integral de formación, que deja como producto terminado a un profesionista, y como recuerdo y prueba viviente en la historia; esta “Tesis”, que perdurará dentro de los conocimientos y desarrollo de las demás generaciones que están en proceso y por llegar...

*Sin duda alguna fueron muchas las personas que contribuyeron al proceso y conclusión de esta tesis. En primer lugar, de manera muy sincera y afectuosa quiero agradecer a la Dra. **ARIANA ARLENE HUERTA HEREDIA**, directora de esta tesis y mi maestra por muchos años; ella fue una de las pocas personas que creyó en mí, que depositó su confianza y su apoyo personal e institucional y sobre todo me alentó para que concluyera esta investigación... Por eso y muchas cosas más, gracias muchas **GRACIAS!!!***

*Al Dr. **EDGAR**, porque siempre que me explicaba algo, le entendía a la primera. Al Dr. **Enrique** por haberme prestado la mayoría de los frascos donde se sembraron las plántulas. A la Dra. **BLANCA**, por sus buenos comentarios en el escrito, siempre me animaban. Al Dr. **JULIAN**, porque siempre estaba dispuesto a prestar su equipo y material de su laboratorio. A la Dra. **SANDRA** y **RUBÍ**, por compartir de su tiempo y sus consejos. Al Dr. **DAVID**, porque siempre tenía una solución ante algún problema.*

*Gracias a mis compañeros por compartir esta gran etapa. Me permito robarme y llevarme un poco de cada uno de ellos... La calma de mi amigo **Juan Carlos**, las elocuencias de **Daniel**, la ternura de **Rachel**, la fuerza de **Rosario**, la tenacidad de **Karen**. La serenidad de **Cris** y **Erick**, que a pesar de que en ocasiones nos llegaba el agua hasta el cuello, ellos me invitaban a jugar póker. La sencillez de **Liria**, El positivismo de **Oscar**, la paciencia de **Keyla**. Gracias a Luz y Mayra por ayudarme a imprimir la tesis.*

*A los grandes amigos que hice en el CIQA, GRACIAS a **Miriam** por las pláticas, que se tornaban tan interesantes como los de dos amigos de muchos años. A **Verónica** y **Angélica** por sus conocimientos compartidos. A **Valeria** por su amistad tan bonita y dulce. A mi paisana **Liliana** por siempre acompañarme a comer y por enseñarme donde estaba todo lo necesario en el laboratorio. A mi estimado **Adrián** por esas pláticas elocuentes de regreso a casa. Un agradecimiento muy especial a la Dra. **ILEANA VERA REYES** por su paciencia y conocimientos compartir...*

*El amor recibido, la dedicación y la paciencia con la que siempre te preocupabas por el avance y desarrollo de esta tesis, es simplemente único y se ha reflejado en mi vida, GRACIAS a ti, por todas esas noches que estuviste a mi lado, por todas las veces que me corregiste, por la confianza y sobre todo por creer en mí, GRACIAS por todo QUERIDA ESPOSA... **ITZEL VIANNEY ALVARADO OREA**.*

*Gracias a mi madre **MAGDALENA CÓRDOBA PARRAL**, por el apoyo incondicional una y otra y otra vez, por todo el amor que me has dado. A mi tía **MARGARITA SÁNCHEZ CÓRDOVA**, porque a pesar de las veces que me ayudaste, sé que lo volverías a hacer sin pensarlo, por siempre estar ahí. Gracias a toda mi familia que de forma directa e indirecta apoyaron para concluir esta meta en mi vida.*

Finalmente agradezco a quien lee este apartado y más de mi tesis, por permitir a mis experiencias, investigaciones y conocimiento, incurrir dentro de su repertorio de información mental.

Ángel

DEDICATORIA

A la persona más extraordinaria que conocí en esta tierra...

*Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, por todos sus conocimientos compartidos, por ser tan noble y comprensible, pero más que nada, por su **amor**...*

TE AMO PAPÁ PEDRO SÁNCHEZ GARCIA

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABLAS	XVI
NOTACIONES	XVII
RESUMEN	19
ABSTRACT	21
1. INTRODUCCIÓN	23
2. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES	24
2.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	24
2.2. Origen y distribución	25
2.3. Clasificación	25
2.4. Descripción botánica	26
2.4.1. Patrón de crecimiento	27
2.4.2. Sistema radicular y tallo	27
2.4.3. Hojas	28
2.4.4. Flores	28
2.4.5. Semillas	29
2.5. Importancia comercial	29
2.6. Propiedades medicinales	30
2.7. Compuestos bioquímicos	31
2.8. Metabolitos secundarios de <i>Stevia rebaudiana</i>	31
2.9. Biosíntesis de glucósidos de esteviol	34
2.9.1. Precursores isoprenoides	34
2.9.2. Ruta del ácido mevalónico	36
2.9.3. Ruta del 2-C-metil-D-etil-4-fosfato	37
2.9.4. Biosíntesis de glucósidos de esteviol en <i>Stevia rebaudiana</i>	38
2.10. Regulación del flujo de las rutas MVA y MEP	38
2.11. Importancia de DXS en la ruta del MEP	43
2.12. Biosíntesis de fenoles y flavonoides	44
2.12.1. Fenoles	44

2.12.2. Flavonoides	44
2.12.3. Ruta del Shikimato	46
2.13. Estrategias para la producción de metabolitos secundarios	48
2.13.1. Cultivo <i>in vitro</i>	48
2.13.2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i>	50
2.14. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios	52
2.14.1. Elicitación biótica y abiótica	52
2.14.2. Elicitación en <i>Stevia rebaudiana</i>	54
2.14.3. Transformación genética de plántulas	56
2.14.3.1. Biobalística	56
2.14.3.2. Electroporación	57
2.14.3.3. Agrotransformación	58
2.15. Proteómica	60
2.15.1. Electroforesis bidimensional	61
2.15.2. PDQuest	62
2.15.3. Identificación y caracterización de las proteínas por MALDI-TOF	65
3. JUSTIFICACIÓN	70
4. HIPÓTESIS	71
5. OBJETIVOS	72
5.1. General	72
5.2. Específicos	72
6. MATERIALES Y MÉTODOS	73
6.1. Material vegetal	73
6.2. Micropropagación	73
6.3. Verificación de la transformación genética	74
6.3.1. Extracción de ADN genómico	74
6.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa	75
6.3.3. Análisis electroforéticos	76
6.4. Comparación de los parámetros fisiológicos	76
6.5. Extracción y cuantificación de metabolitos secundarios	77
6.5.1. Extracción de glucósidos de esteviol	77
6.5.2. Extracción de fenoles y flavonoides totales	78

6.5.3. Cromatografía en capa fina	78
6.5.4. Cuantificación de glucósidos de esteviol	79
6.5.5. Cuantificación de fenoles totales	80
6.5.6. Identificación de fenoles por UHPLC-DAD	80
6.5.7. Cuantificación de flavonoides totales	81
6.6. Extracción y cuantificación de clorofilas y carotenoides	81
6.7. Proteómica diferencial.....	83
6.7.1. Extracción de proteína total soluble.....	83
6.7.2. Cuantificación de proteína total soluble	83
6.7.3. Análisis bidimensional de las proteínas	84
6.7.4. Isoelectroenfoque	84
6.7.5. Separación de las proteínas en segunda dimensión	85
6.7.6. Análisis de los geles 2-D SDS-PAGE	86
6.7.7. Preparación de las proteínas para su análisis por MALDI-TOF	87
6.7.8. Análisis por MALDI-TOF.....	88
6.8. Análisis estadístico.....	89
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
7.1. Mantenimiento y subcultivo de <i>Stevia rebaudiana</i>	90
7.1.1. Inducción de brotes	90
7.1.2. Inducción de raíces y obtención de plántulas	92
7.2. Comprobación de la transformación genética	94
7.3. Comparación de los parámetros fisiológicos	95
7.4. Cuantificación de los metabolitos secundarios.....	102
7.4.1. Glucósidos de esteviol.....	102
7.4.2. Fenoles y flavonoides totales	105
7.5. Proteómica diferencial.....	109
7.5.1. Extracción y cuantificación de las proteínas	109
7.5.2. Distribución y separación de las proteínas dentro del gel 2-D	112
7.5.3. Detección y selección de las proteínas.....	113
7.5.4. Identificación de proteínas mediante bioinformática	117
7.5.5. Evaluación funcional de las proteínas identificadas.....	135
7.5.5.1. Proteínas concernientes a la fotosíntesis.....	136

7.5.5.2. Proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos.....	138
7.5.5.3. Proteínas involucradas con el metabolismo de aminoácidos	139
7.5.5.4. Proteínas afines con el metabolismo de ácidos nucleicos.....	139
7.5.5.5. Proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos.....	140
7.5.5.6. Proteínas involucradas en el metabolismo de proteínas	142
7.5.5.7. Proteínas asociadas con el transporte	145
7.5.5.8. Proteínas relacionadas con la organización celular	147
7.5.5.9. Proteínas involucradas en el metabolismo de hormonas	147
7.5.5.10. Proteínas afines con el estrés y defensa.....	148
7.5.5.11. Proteínas relacionadas con los metabolitos secundarios	151
7.5.6. Identificación de las proteínas por MALDI-TOF MS.....	156
7.5.6.1. Funcionalidad de las proteínas identificadas por MALDI-TOF.....	160
8. CONCLUSIONES.....	163
9. RECOMENDACIONES.....	164
10. REFERENCIAS	165
11. ANEXOS.....	206

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	24
Fig. 2. Sistema radicular y tallo de <i>Stevia rebaudiana</i>	27
Fig. 3. Diferentes etapas de la flor de <i>Stevia rebaudiana</i>	28
Fig. 4. Semilla infértil y fértil de <i>Stevia rebaudiana</i>	29
Fig. 5. Estructuras químicas de glucósidos de esteviol producidos por <i>Stevia rebaudiana</i>	33
Fig. 6. Esquema general de la biosíntesis de los terpenoides	35
Fig. 7. Ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol.....	39
Fig. 8. Representación esquemática de biosíntesis de los terpenoides y su posible interacción con microARNs	42
Fig. 9. Estructura de las diferentes subclases de flavonoides.....	45
Fig. 10. Ruta biosintética de los fenoles y flavonoides.....	47
Fig. 11. Esquema del cultivo <i>in vitro</i> de plantas superiores	49
Fig. 12. Imágenes creadas durante la detección de manchas proteicas por el programa PDQuest.....	64
Fig. 13. Diagrama esquemático de cómo las manchas proteicas de dos geles se combinan con PDQuest	65
Fig. 14. Descripción de la técnica de desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo	67
Fig. 15. Brotes de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i> , a los 20 días de cultivo	90
Fig. 16. Generación de raíces en plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	92
Fig. 17. Plántulas <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , a los 30 días de cultivo.....	93
Fig. 18. Análisis de PCR en ADN genómico de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	94

Fig. 19. Comparación de los cambios fisiológicos de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) vs silvestres de <i>Stevia rebaudiana</i> , durante los 20 días de cinética..	98
Fig. 20. Comparación de los cambios fisiológicos de las plantas transformadas (pCAMsrDXS) vs silvestres de <i>Stevia rebaudiana</i>	99
Fig. 21. Plántulas silvestres crecidas en medio de plántulas transformadas y transformadas (pCAMsrDXS) crecidas en medio de plántulas silvestres de <i>Stevia rebaudiana</i> , a los 30 días de cultivo	101
Fig. 22. Cromatografía en capa fina de esteviósido y rebaudiósido A de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	102
Fig. 23. Producción de esteviósido y rebaudiósido A de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y silvestres de <i>Stevia rebaudiana</i>	103
Fig. 24. Producción rebaudiósido A/esteviósido en plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y silvestres de <i>Stevia rebaudiana</i>	104
Fig. 25. Producción de fenoles totales en plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y silvestres de <i>Stevia rebaudiana</i>	105
Fig. 26. Identificación de fenoles en extractos de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	107
Fig. 27. Cromatograma del perfil de producción de fenoles en plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i> , a los 35 días de cultivo.....	108
Fig. 28. Cromatograma del extracto de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i> a los 35 días de cultivo, comparado con el ácido clorogénico...	108
Fig. 29. Cromatograma del extracto de plántulas silvestres de <i>Stevia rebaudiana</i> a los 35 días de cultivo, comparado con el ácido clorogénico	109
Fig. 30. Gel SDS PAGE al 12% con proteína total soluble de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	110
Fig. 31. Geles 2-D SDS PAGE al 12% con proteína total soluble de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	111
Fig. 32. Geles 2-D SDS PAGE al 12% con proteína total soluble de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i> utilizando dos diferentes gradientes de pH inmovilizado	113
Fig. 33. Corrección en la identificación de manchas proteicas en los geles 2-D SDS PAGE de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	114

Fig. 34. Comparación de la expresión de proteínas en los geles 2-D SDS PAGE de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	115
Fig. 35. Diagrama de Venn. Número de manchas proteicas detectadas en los geles de 2-D SDS PAGE de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	116
Fig. 36. Posible clasificación de proteínas expresadas diferencialmente en plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	135
Fig. 37. Posibles enzimas responsables de las diferencias en los parámetros fisiológicos evaluados y la producción de glucósidos de esteviol entre las plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	156
Fig. 38. Selección de manchas proteicas en geles 2-D SDS PAGE de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	158
Fig. 39. Diferencia de expresión de las manchas proteicas analizadas por MALDI-TOF de las plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i> ...	158
Fig. 40. Plásmido binario pCAMsrDXS conteniendo una secuencia modificada del gen DXS.....	206
Fig. 41. Zonas en las que se seccionaron las plántulas para calcular el área foliar	207
Fig. 42. Toma de muestra para calcular el área foliar a los días 15, 20, 25, 30, 35 de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	208
Fig. 43. Curva de calibración de esteviósido y rebaudiósido A.....	209
Fig. 44. Curva de calibración de fenoles totales	209
Fig. 45. Curva de calibración de flavonoides totales.....	210
Fig. 46. Curva de calibración de proteína total soluble	210
Fig. 47. Cromatograma de la producción de rebaudiósido A y esteviósido de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y silvestres de <i>Stevia rebaudiana</i> , a los 35 días de cultivo	212
Fig. 48. Ubicación celular de las proteínas identificadas de las plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	215

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	26
Tabla 2. Diferentes tipos de explantes y fitorreguladores utilizados para la micropropagación de <i>Stevia rebaudiana</i>	51
Tabla 3. Efecto de diferentes elicitores bióticos y abióticos como estrategia para aumentar la producción de metabolitos secundarios en distintas plantas	53
Tabla 4. Transformación de <i>Stevia rebaudiana</i> utilizando diferentes métodos	60
Tabla 5. Componentes de la PCR	76
Tabla 6. Condiciones de operación del isoelectroenfoque.....	85
Tabla 7. Posible identificación de proteínas en plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i> mediante bioinformática.....	117
Tabla 8. Posibles proteínas identificadas por MALDI-TOF de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de <i>Stevia rebaudiana</i>	159
Tabla 9. Análisis estadístico de los parámetros fenot de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) vs silvestres de <i>Stevia rebaudiana</i>	211
Tabla 10. Análisis estadístico de la producción de glucósidos de esteviol de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) vs silvestres de <i>Stevia rebaudiana</i>	213
Tabla 11. Análisis estadístico de la producción de fenoles totales de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) vs silvestres de <i>Stevia rebaudiana</i>	213

NOTACIONES

AACT	Acetil-CoA C-acetiltransferasa
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
ADN-T	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BA	Benciladenina
BAP	Bencil amino purina
CHS	Chalcona sintasa
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DTT	Ditiotreitol
DXR	1-Deoxi-d-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa
DXS	1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Est	Esteviósido
FT	Fenoles totales
GEs	Glucósidos de esteviol
H2O2	Peróxido de hidrógeno
HDR	4-Hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa
IAA	Ácido indolacético
IBA	Ácido indolbutírico
IDI	Isopentenil difosfato isomerasa
IEF	Isoelectroenfoque
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
IPP	Isopentil difosfato
K2O	Óxido de potasio
kDa	Kilodaltons
KIN	Kinetina

KO	Kaureno oxidasa
MeJa	Metil jasmonato
MEP	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato
mgEAG/mgExt	Miligramos equivalentes de ácido gálico por miligramo de extracto
MS	Medio de cultivo Murashige & Skoog
MSE	Metanosulfonato de etilo
MVA	Mevalonato
Na₂CO₃	Carbonato de sodio
NAA	Ácido α -naftalén acético
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
PAL	Fenilalanina amonio liasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PF	Peso fresco
pH	Potencial de hidrógeno
pl	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PS	Peso seco
Reb A	Rebaudiósido A
Rf	Factor de retención
Ri	Genes de virulencia
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Ta	Temperatura ambiente
TLC	Cromatografía en capa fina
TR	Tiempo de retención
Tris-HCl	Tris-ácido clorhídrico
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución

RESUMEN

Stevia rebaudiana, se conoce principalmente por acumular glucósidos de esteviol (GEs), además de presentar actividades biológicas como antioxidante y antimicrobiana. Actualmente, se han implementado herramientas biotecnológicas con el objetivo de micropropagar dicha planta, como es el cultivo *in vitro* y la transformación genética. Es por ello por lo que en este trabajo se investigaron cultivos *in vitro* de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y silvestres de *S. rebaudiana*, con la finalidad de comparar diversos parámetros fisiológicos, la producción de metabolitos secundarios y su perfil proteómico. Ambos tipos de plántulas fueron crecidas bajo fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad a 25 ± 2 °C y con una irradiación de $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para evaluar todos los factores se realizaron cinéticas de 20 días de duración, iniciando al día 15 después de su trasplante.

Los resultados indicaron que las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) produjeron raíces a partir del octavo día, además de producir 10% más, ser más largas y acumular 43% más de biomasa en peso fresco (PF), que las plántulas silvestres. Por otro lado, el diámetro del tallo de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) fue 30% más grueso, 14% más largo y con un mayor número de hojas (114.5 ± 3.54), en comparación a las plántulas silvestres. También se observó que las hojas y tallos de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) eran de un color verde más intenso, en comparación a las silvestres, lo que equivalió a un mayor contenido de clorofilas a, b y carotenoides, 18, 40 y 37%, respectivamente. Se determinó el área foliar por zonas; de la parte baja, intermedia y del meristemo apical; donde las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) fueron 24, 34 y 25% mayor, respectivamente, en comparación a las hojas de las plántulas silvestres. En cuanto a la acumulación de biomasa de la parte aérea, las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) alcanzaron, $642.9 \pm 30.2 \text{ mg}_{\text{PF}}$; lo que significó un incremento del 23%, en comparación a las plántulas silvestres; finalmente, el porcentaje de humedad calculado fue similar en ambas plántulas con 91.77 ± 0.27 para las transformadas (pCAMsrDXS) y 91.95 ± 0.25 para las silvestres.

La concentración de los GEs fue determinada por UHPLC-DAD, observándose que el contenido de esteviósido (Est) y rebaudiósido A (Reb A) en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) fue de 4.95 ± 0.03 mg Est/g_{PS} y 4.83 ± 0.04 mg Reb A/g_{PS}, lo que fue 1.6 y 1.1 veces más, respectivamente, en relación con las plántulas silvestres. La producción de fenoles totales de ambas plántulas no fue estadísticamente diferente, obteniendo una concentración de 42.44 ± 0.30 y 41.61 ± 0.23 µg_{EAG}/mg_{PS}, respectivamente. El análisis por UHPLC-DAD mostró que ambas plántulas tenían el mismo perfil de producción de fenoles, logrando identificar al ácido clorogénico.

El contenido de proteínas total soluble fue similar en ambos tipos de plántulas con 7.74 µg/µL en transformadas (pCAMsrDXS) y 7.65 µg/µL en silvestres. Sin embargo, en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) se presentó el mayor número de manchas proteicas 190, de las cuales 27 se expresaban diferencialmente con respecto a las plántulas silvestres, en donde destacan proteínas relacionadas con la biosíntesis de GEs y se sugiere que por ello se observó una mayor producción en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) en comparación con las silvestres. Por otro lado, también se sobreexpresaron proteínas que estaban involucradas en la producción de giberelinas, las cuales, se pudiera sugerir que son las responsables de las diferencias fisiológicas que existen entre ambas líneas.

Los resultados de nuestro trabajo demuestran que el cultivo *in vitro* de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana* es un sistema útil para la acumulación de biomasa y con ello la producción de compuestos bioactivos de interés comercial.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana, is known mainly for accumulating steviol glycosides (SGs), in addition to presenting biological activities such as antioxidant and antimicrobial. Currently, biotechnological tools have been implemented with the aim of micropropagating said plant, such as *in vitro* culture and genetic transformation. That is why in this work *in vitro* cultures of transformed and wild *S. rebaudiana* seedlings were investigated, to compare various physiological parameters, the production of secondary metabolites and their proteomic profile. Both types of seedlings were grown under photoperiod of 16/8 h of light/dark at 25 ± 2 °C and with an irradiation of $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. To evaluate all the factors, 20-day kinetics were performed, starting at day 15 after their transplant.

The results indicated that the transformed seedlings produced roots from the eighth day, besides producing 10% more, being longer and accumulating 43% more biomass in fresh weight (FW), than the wild seedlings. On the other hand, the diameter of the stem of the transformed seedlings was 30% thicker, 14% longer and with a greater number of leaves (114.5 ± 3.54), compared to wild seedlings. It was also observed that the leaves and stems of the transformed seedlings were of a more intense green color, in comparison to the wild ones, which was equivalent to a higher content of chlorophylls a, b and carotenoids, 18, 40 and 37%, respectively. The leaf area was determined by zones; of the lower part, intermediate and of the apical meristem; where the transformed seedlings were 24, 34 and 25% higher, respectively, in comparison to the leaves of the wild seedlings. As for the biomass accumulation of the aerial part, the transformed seedlings reached, $642.9 \pm 30.2 \text{ mg}_{\text{FW}}$; which meant an increase of 23%, compared to wild seedlings; finally, the percentage of humidity calculated was similar in both seedlings with 91.77 ± 0.27 for the transformed ones and 91.95 ± 0.25 for the wild ones.

The concentration of the SGs was determined by UHPLC-DAD, observing that the content of stevioside (Est) and rebaudioside A (Reb A) in the transformed seedlings

was 4.38 ± 0.04 mg Est/g_{DW} and 5.47 ± 0.03 mg Reb Ag_{DW}, which was 1 and 1.8 times more, respectively, in relation to wild seedlings. The production of total phenols of both seedlings was not statistically different, obtaining a concentration of 42.44 ± 0.30 and 41.61 ± 0.23 µg_{EAG}/mg_{DW}, respectively. The analysis by UHPLC-DAD showed that both seedlings had the same production profile of phenols, being able to identify the chlorogenic acid.

The total soluble protein content was similar in both types of seedlings with 7.74 µg/µL in transformed and 7.65 µg/µL in wild. However, in the transformed seedlings, the highest number of protein spots 190 occurred, of which 27 were differentially expressed with respect to wild seedlings, where proteins related to the biosynthesis of GEs stand out and perhaps therefore observed a higher production in the transformed seedlings in comparison with the wild ones. On the other hand, proteins that were involved in the production of gibberellins were also overexpressed, which may be responsible for the physiological differences that exist between both lines.

The results of our work show that the *in vitro* culture of transformed seedlings (pCAMsrDXS) of *S. rebaudiana* is a useful system for the accumulation of biomass and with it the production of bioactive compounds of commercial interest.

1. INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni, es un arbusto perenne originario de América del Sur, que produce glucósidos de esteviol, principalmente esteviósido y rebaudiósido A, los cuales son edulcorantes bajos en calorías y aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa. Por otro lado, también produce fenoles y flavonoides, metabolitos secundarios (MetS) que en diversas investigaciones se le han comprobado actividades biológicas, como antioxidante, antimicrobianas y antifúngicas (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). Estos MetS, tienen una gran demanda en la industria farmacéutica y alimentaria, planteando la necesidad de utilizar diversas tecnologías para su identificación, caracterización y aumento en su producción, por ejemplo, la ingeniería metabólica y las técnicas de biotecnología vegetal.

El cultivo *in vitro* y la transformación genética son estrategias biotecnológicas utilizadas con el fin de aumentar la producción de MetS, y mantener el cultivo en condiciones asépticas. Por otro lado, la proteómica es una herramienta biotecnológica basada en la cuantificación, separación, identificación y análisis de las proteínas expresadas dentro de las plantas, con el fin de conocer sus funciones que cumplen dentro de ellas.

En este trabajo se utilizaron plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y silvestres de *S. rebaudiana*, con el fin de comparar las diferencias que existen en sus parámetros de crecimiento, producción de metabolitos secundarios y la expresión de proteínas involucradas en diferentes rutas metabólicas.

2. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

2.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni

Stevia rebaudiana Bertoni (Fig. 1) es una planta medicinal ampliamente utilizada como edulcorante desde la antigüedad en América del Sur. El poder edulcorante de la hierba proviene de los glucósidos diterpénicos conocido generalmente como **glucósidos de esteviol** (GEs). Estos GEs junto con otros MetS como alcaloides, fenoles y flavonoides hacen que la planta sea adecuada para usos medicinales. Debido a estos MetS, la planta y sus extractos se utilizan ampliamente como agentes antihipertensivos (Lee *et al.*, 2001), anti-hiperglucémicos (Jeppeson *et al.*, 2002) y anti-rotavirus (Das *et al.*, 1992). Debido a los agentes edulcorantes, la planta también se usa para endulzar refrescos, salsa de soja, yogur y otros alimentos en Japón, Corea y Brasil (Tadhani *et al.*, 2007; Modi *et al.*, 2014).



Fig. 1. *Stevia rebaudiana* Bertoni (Tomada de Lemus-Mondaca *et al.*, 2012).

2.2. Origen y distribución

Stevia rebaudiana es una planta herbácea perenne, originaria de Paraguay, donde el singular poder edulcorante de sus hojas y sus propiedades medicinales han sido conocidas por los indígenas guaraníes muchos cientos de años atrás. Los indios guaraníes llamaron a la planta "kaa he-he", que se traduce como "hierba dulce", y lo usaron como edulcorante para su té de hierbas verdes "mate", y como un saboreador (Soejarto *et al.*, 1983). Es el miembro más conocido del género *Stevia*, que incluye un total de 220-230 especies (Hossain *et al.*, 2010). Se distribuye desde el suroeste de los Estados Unidos hacia el sur a través de México y América Central. También se encuentra en América del Sur, hasta Argentina central. En Brasil, se han encontrado 36 especies, distribuidas principalmente en regiones centrales (Frederico *et al.*, 1996). En su estado nativo crece en los bordes de los pantanos o en las comunidades de pastizales en suelos con agua superficial (Yadav *et al.*, 2011). En la actualidad, su cultivo se ha introducido en distintos países, como Indonesia, Tanzania (Brandle & Rosa, 1992), China, el sudeste asiático (Koyama *et al.*, 2003), Canadá, Europa, India, Bangladesh (Hossain *et al.*, 2010).

En México existen zonas de alto potencial donde se cultiva con éxito, figurando como primera alternativa el estado de Sinaloa. Otros estados que también presentan condiciones agro-potencial son: Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Quintana Roo y Yucatán (SAGARPA, 2016).

2.3. Clasificación

Stevia rebaudiana es uno de los 950 géneros de la familia Asteraceae (Tabla 1) (Soejarto *et al.*, 1983). Su género comprende aproximadamente 200 especies de hierbas anuales, perennes, subarbustos y arbustos (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). Su primera descripción botánica se atribuye a Moisés S. Bertoni. La planta fue llamada primero *Eupatorium rebaudianum* Bert., en honor de Rebaudi, el primer químico en estudiar las características químicas de las sustancias extraídas. Su nombre fue luego

cambiado al actual, y se recomendó no sólo para la producción de alimentos, sino también para los efectos medicinales que se le atribuyeron (Bertoni, 1905).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Modificada de Yadav *et al.*, 2011).

Dominio	Eucariota
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Espermatofitas
División	Magnoliofita
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Tribu	Eupatoriaceae
Genero	<i>Stevia</i>
Especie	<i>Rebaudiana</i>
Nombre científico	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni
Nombre común	Hierba dulce, Hoja miel

2.4. Descripción botánica

La planta es una hierba perenne con un sistema extensivo de raíces ligeramente ramificadas y tallos quebradizos que producen hojas pequeñas y elípticas (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). Crece entre 50 y hasta 120 cm (Ramesh *et al.*, 2006).

2.4.1. Patrón de crecimiento

El patrón de crecimiento de *Stevia* se puede dividir en cuatro etapas: germinación, período de crecimiento, floración y madurez de la semilla. La primera etapa incluye la germinación y el establecimiento, la segunda el crecimiento vegetativo, la tercera el inicio del brote floral, la polinización y la fertilización, y la cuarta crecimiento y relleno de la semilla. La duración de la siembra hasta la aparición de la semilla está relacionada con la temperatura y a 24 °C se considera óptimo para la germinación de las semillas (Goettemoeller & Ching, 1999).

2.4.2. Sistema radicular y tallo

La raíz (Fig. 2) es fibrosa, filiforme y perenne, que apenas se ramifica y se profundiza, aglomerándose en la superficie terrestre las raíces más finas y las raíces gruesas en las zonas más profundas. El tallo es anual, sub-leñoso, más o menos pubescente, con tendencia a declinar, y muy poco se pueden hacer injertos (Ramesh *et al.*, 2006).



Fig. 2. Sistema radicular y tallo de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

2.4.3. Hojas

Los primeros órganos fotosintéticos se forman después de la germinación de los dos cotiledones en la semilla (Dwivedi, 1999). Tiene un arreglo alternativo de la hoja y un hábito herbáceo del crecimiento (Singh *et al.*, 2005). Las hojas son pequeñas, sésiles, lanceoladas, oblongas, serradas por encima de la mitad y ligeramente dobladas hacia arriba. Los tricomas en la superficie de la hoja son de dos tamaños distintos, grandes (4 a 5 mm) y pequeños (2.5 mm), el índice de área foliar 80 días después de la siembra es de aproximadamente de 4.83 cm² (Fronza & Folegatti, 2003). Varían ampliamente en calidad debido a muchos factores ambientales, incluyendo condiciones del suelo, métodos de riego, luz solar, pureza del aire, prácticas agrícolas, saneamiento, procesamiento y almacenamiento. La hoja tiene un sabor agridulce, que puede permanecer en la boca durante horas. El material contiene los componentes dulces, rodeados por los componentes amargos en las nervaduras (Maiti & Purohit, 2008).

2.4.4. Flores

Las flores son pequeñas (15-17 mm) y blancas (Dwivedi, 1999), con corolas de color púrpura claro. Los pequeños floretes blancos son perfectos con órganos tanto masculinos como femeninos (hermafrodita), llevados en pequeños corimbos de dos a seis floretes (Goettemoeller & Ching, 1999). La planta puede iniciar la floración después de tener un mínimo de cuatro hojas verdaderas. La planta tarda más de un mes en pasar por las diferentes etapas de desarrollo florales (Fig. 3) y producir todas sus flores (Yadav *et al.*, 2011).



Fig. 3. Diferentes etapas de la flor de *Stevia rebaudiana* (Tomado de Yadav *et al.*, 2011).

2.4.5. Semillas

Las semillas están contenidas en aquenios delgados de unos 3 mm de longitud. Las semillas tienen un endospermo muy pequeño que se dispersan con el viento. Las semillas fértiles suelen ser de color oscuro, mientras que las semillas infértiles suelen ser pálidas o claras (Fig. 4 A y B) (Monteiro, 1980). Las semillas son muy pequeñas (1000 semillas pesan entre 0.3 y 1 g) y, como resultado, las plántulas son lentas en desarrollarse, alcanzando un tamaño adecuado para el campo a 45-60 días (Brandle *et al.*, 1998).



Fig. 4. A: semilla infértil y B: fértil de *Stevia rebaudiana* (Tomado de Yadav *et al.*, 2011).

2.5. Importancia comercial

Los extractos de hojas de *Stevia* se utilizan en Japón, Corea (Mizutani & Tanaka, 2002), y algunos países de Sudamérica para endulzar refrescos, soju, salsa de soja, yogur y otros alimentos, mientras que en los Estados Unidos se utiliza como suplemento dietético y en Bangladesh como té antidiabético (Kinghorn *et al.*, 2001). Toda esta importancia comercial se resume en su producción de GEs que la caracterizan (Brandle & 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, al no incrementar los niveles de azúcar en la sangre, ayudando también a las personas con problemas de obesidad (Das *et al.*, 2011).

2.6. Propiedades medicinales

Las hojas de *S. rebaudiana* contienen edulcorantes no calóricos (GEs) que no aporta energía, cuyo consumo podría ejercer efectos beneficiosos sobre la salud humana (Gardana *et al.*, 2010). El consumo regular de estos compuestos disminuye el contenido de azúcar en la sangre, ya que estimula la liberación de insulina en la sangre manteniendo los niveles de glucosa bajos, por lo tanto, se puede plantear como alternativa de origen natural para la población afectada por la diabetes (Suanarunsawat & Chaiyabutr, 1997; Shivanna *et al.*, 2013; Aranda-González *et al.*, 2014). Por otro lado, también controla los niveles de colesterol en la sangre (Atteh *et al.*, 2008), mejora la regeneración celular y la coagulación de la sangre, suprime el crecimiento neoplásico y fortalece los vasos sanguíneos (Jeppesen *et al.*, 2003; Maki *et al.*, 2008). Previenen la ulceración en el tracto gastrointestinal (Gupta *et al.*, 2013), incluyendo actividad antihipertensiva y anti-hiperglucémica (Chen *et al.*, 2006). También presentan propiedades, antiinflamatorias, diuréticas, anti-rotavirus (Takahashi *et al.*, 2001), ayuda a la función renal (Jutabha *et al.*, 2000), aplicaciones terapéuticas, antidiarreicas, antimicrobianas, neuroprotectoras y antitumoral (Chatsudthipong & Muanprasa, 2009; Aranda-González *et al.*, 2014; Kumari & Chandra, 2014). Además, se han utilizado en el tratamiento del cáncer de pulmón (A549), leucemia (línea celular HL60), estomago (AZ521) y de mama, en dos líneas celulares (SK-BR-3 y MCF-7) (Ukiya *et al.*, 2013).

Asimismo, también se ha comprobado su actividad antioxidante (Tadhani *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2009), dicha actividad se les atribuyen a distintos compuestos, como los labdanos, flavonoides, esteroides, ácidos fenólicos y triterpenos (Gardana *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2013). La presencia de compuestos con poder antioxidante resulta especialmente interesante, ya que intervienen en el proceso de oxidación al nivel celular, manteniendo en equilibrio la balanza de oxidante/antioxidante, al reaccionar con los radicales libres y previniendo la oxidación causada por éstos.

La toxicología de los GEs ha sido ampliamente estudiada, y los resultados, indican que no presentan efectos tóxicos, mutagénicos, teratogénicos o carcinógenos (Pól *et al.*, 2007; Gardana *et al.*, 2010).

2.7. Compuestos bioquímicos

Diversos autores han descubierto distintos compuestos en hojas, tallos y raíces de *Stevia rebaudiana*, dentro de los cuales se encuentran:

- **Minerales:** Aluminio, azufre, calcio, cobalto, cobre, cromo, fósforo, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, potasio, selenio, silicio, sodio, zinc (Savita *et al.*, 2004; Goyal & Goyal, 2010; Serio, 2010).
- **Aminoácidos esenciales:** Arginina, lisina, histidina, fenilalanina, leucina, metionina, valina, treonina, isoleucina. **No esenciales:** Aspartato, serina, glutamina, prolina, glicina, alanina, cisteína, tirosina (Abou-Arab *et al.*, 2010).
- **Ácidos grasos:** Ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico (Tadhani & Subhash, 2006).
- **Vitaminas:** C, B2, B6, ácido fólico, niacina, tiamina (Kim *et al.*, 2011).

Por otro lado, también se le ha encontrado carbohidratos, proteínas y fibra cruda (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012).

2.8. Metabolitos secundarios de *Stevia rebaudiana*

Los MetS son un grupo de compuestos biosintetizados a partir de uno o más metabolitos primarios por diversas rutas metabólicas, los cuales no son esenciales para el crecimiento ni el desarrollo de las plantas, pero juegan un papel muy importante

en la interacción de la planta con su medio ambiente, asegurando su supervivencia en el ecosistema (Verpoorte & Alfermann, 2013).

Los principales MetS de *Stevia rebaudiana* se encuentran principalmente en las hojas. Se ha reportado que la acumulación ha llegado hasta en un 30% en base a su peso seco (Brandle *et al.*, 1998). Sin embargo, actualmente se ha reportado que los GEs, también se han detectado en tallos, raíces, semillas y flores (Bondarev *et al.*, 2003; Yadav *et al.*, 2011; Alvarado-Orea *et al.*, 2017). Donde los principales son: el **esteviósido** (4-13% Est), que es de 250-300 veces más dulce que la sacarosa, pero con un sabor ligeramente amargo, el **rebaudiósido A** (2-4% Reb. A) tiene la mayor capacidad edulcorante, que va de 350-450 veces más dulce que la sacarosa y sin residuos amargos; en menor cantidad también se han encontrado el **dulcósido** (1-2%) y el **rebaudiósido C** (0.4-0.7%), también se encontraron junto con **esteviolbiósido**, **rubusósido**, **rebaudiósido B**, **D**, **E** y **F**, pero menos del 0.4% cada uno de ellos (Jackson *et al.*, 2009; Goyal & Goyal, 2010; Aranda-González *et al.*, 2014) (Fig. 5).

Todos estos GEs presentan en mayor o menor medida un sabor edulcorante y se ha descubierto que esta capacidad depende si en el carbono 13 o 19 se encuentra unido una molécula de azúcar o un grupo carboxilo (Brandle & Telmer, 2007). Sin embargo, el contenido depende de la variedad y de las condiciones en que se desarrolle el cultivo (Geuns, 2003). Diversas investigaciones sugieren que los GEs actúan para repeler a ciertos insectos y otros especulan que es un medio elaborado para controlar los niveles de ácido giberélico (Smith & Van-Stadin, 1992).

Por otro lado, se han cuantificado fenoles totales en extractos de hojas de *S. rebaudiana*, reportándose producciones de 61.5 mg_{EAG}/g_{PS} (Shukla *et al.*, 2009), mientras que Shivaana *et al.*, (2013), reportan un contenido de fenoles totales de 91 mg/g y 23 mg/g de flavonoides totales; estas diferencias se pueden deber al cuidado del cultivo, a la cantidad de nutrientes o si el cultivo es *in vitro* o silvestre.

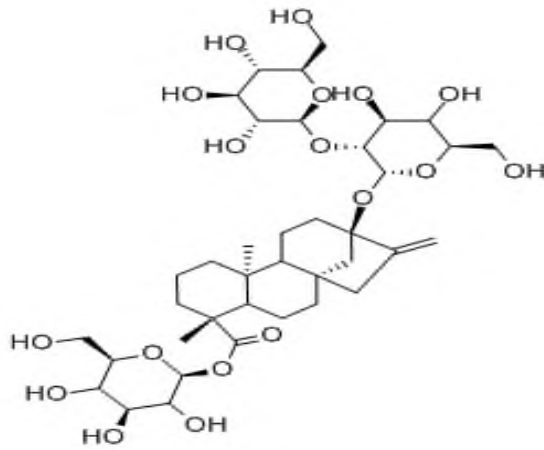
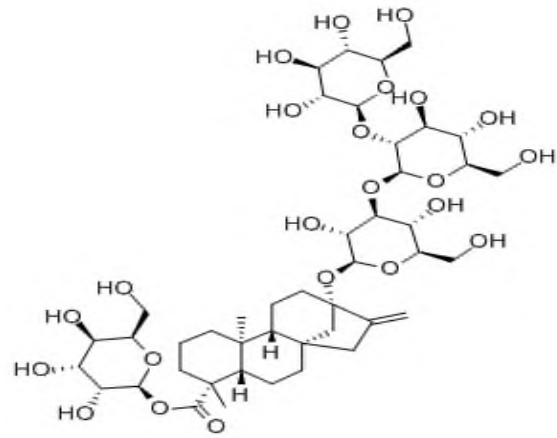
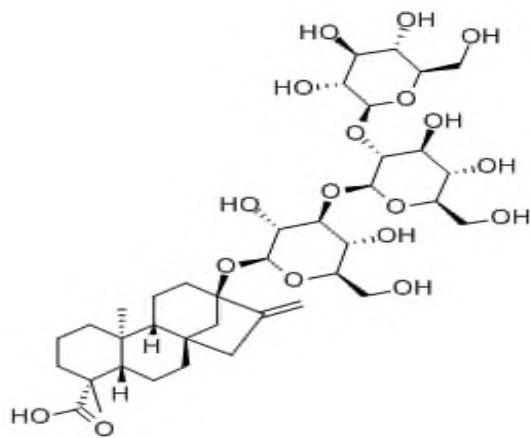
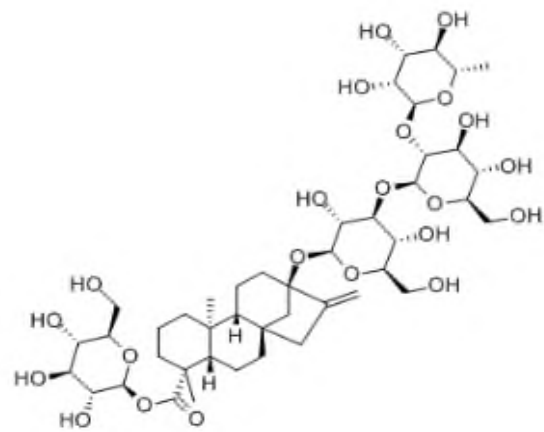
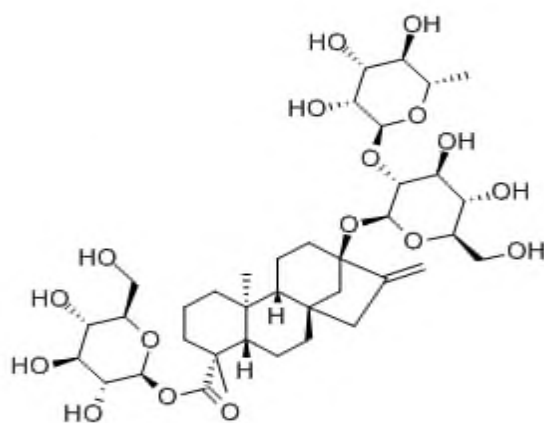
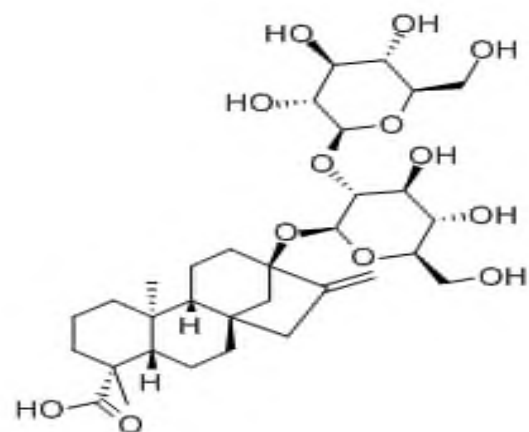
**Esteviósido****Rebaudiósido A****Rebaudiósido B****Rebaudiósido C****Dulcósido A****Esteviolbíosido**

Fig. 5. Estructuras químicas de glucósidos de esteviol producidos por *Stevia rebaudiana* (Modificada de Humphrey *et al.*, 2006; Barbet-Massin *et al.*, 2016).

Kim *et al.*, (2011), identificaron diversos ácidos fenólicos de hojas y callos de *S. rebaudiana*, entre los cuales detectaron, ácido 4-metoxibenzoico, ácido cinámico, ácido p-cumárico, ácido pirogálico, ácido salicílico y ácido sinápico.

También se ha reportado la presencia de otros MetS en planta de *S. rebaudiana*, como: alcaloides, antraquinonas, esteroides, saponinas y taninos (Tadhani & Subhash, 2006).

2.9. Biosíntesis de glucósidos de esteviol

2.9.1. Precursores isoprenoides

Los isoprenoides constituyen una de las familias más diversas de MetS. El número total de estos compuestos es del orden de 35,000-55,000. Sus estructuras y funciones son abrumadoramente variadas y especializadas (Eisenreich *et al.*, 2004). Dentro de las plantas desempeñan un papel esencial en la fluidez de la membrana, la respiración, el transporte de electrones, la señalización a base de hormonas, la regulación de la transcripción y los procesos postraduccionales, la meiosis, la apoptosis, la biosíntesis de glicoproteínas, la degradación de proteínas, la fotosíntesis, la regulación del crecimiento y el desarrollo. Como metabolitos especializados, participan en las interacciones alelopática y patógeno-planta para proteger las plantas contra herbívoros y patógenos, y también se producen para atraer polinizadores y animales dispersantes de semillas (Hunter, 2007). Por otro lado, actualmente son ampliamente utilizados como productos químicos, para la producción de caucho, así como para fármacos, saborizantes, fragancias, pigmentos, agroquímicos y desinfectantes (Bohlmann & Keeling, 2008).

Todos los terpenoides, incluyendo el esteviósido y rebaudiósido A, son producidos por dos precursores universales de 5 carbonos; el isopentil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP). Los cuales se sintetizan a partir de dos rutas independientes, que utilizan diferentes precursores. Una es la ruta del mevalonato (MVA), donde IPP y DMAPP se sintetizan a partir de ácido mevalónico, la cual se lleva a cabo en el citosol.

La otra, conocida como la ruta plastídica del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), la cual usa piruvato y D-gliceraldehído-3-fosfato para la síntesis de IPP y DMAPP (Fig. 6) (Cordoba *et al.*, 2009).

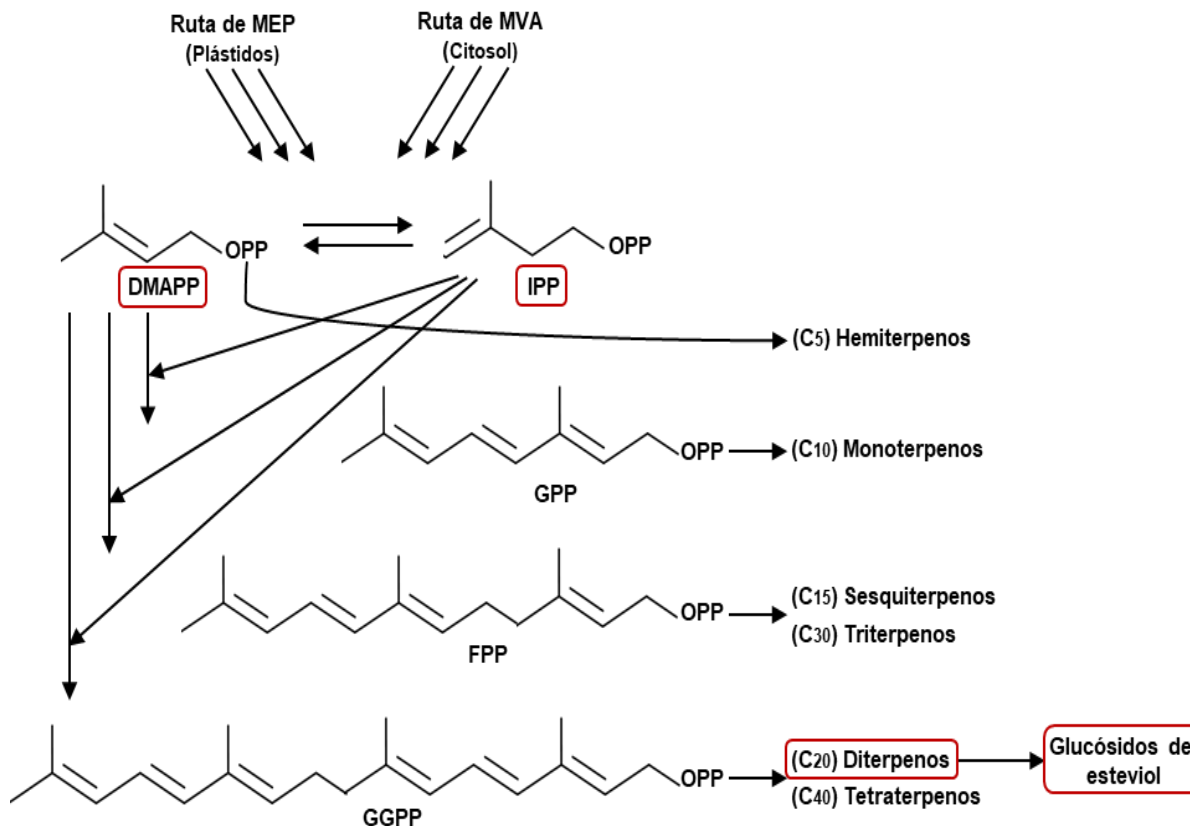


Fig. 6. Esquema general de la biosíntesis de los terpenoides. DMAPP: dimetilalil difosfato. **IPP:** difosfato. **GPP:** geranil difosfato. **FPP:** farnesil difosfato. **GGPP:** geranilgeranil difosfato (**Modificado de Bohlmann & Keeling, 2008**).

Los glucósidos de esteviol y las giberelinas son derivados de kaureno. En *Stevia*, el kaureno se convierte en esteviol (el "esqueleto" de los GEs), el cual es glucosilado para formar los principales edulcorantes. Los compuestos precursores son sintetizados en el cloroplasto, y desde allí son transportados al retículo endoplásmico, aparato de Golgi y luego vacuolados (Smith & Van-Stadin, 1992). Hoy en día se ha descubierto que existen dos rutas para la síntesis de estos compuestos, las cuales llegan a un punto de entrecruzamiento (Cross-talk), una es la ruta del MVA en el citosol y la otra la MEP en los plástidos (Laule *et al.*, 2003; Brandle & Telmer, 2007; Mendoza-Poudereux *et al.*, 2017).

2.9.2. Ruta del ácido mevalónico

La biosíntesis de los isoprenoides se sintetiza a través de la ruta de **MVA** (citosol). La reacción inicial de la ruta es catalizada por acetil-CoA c-acetiltransferasa, también llamada acetoacetil-CoA tiolasa (AACT, EC 2.3.1.9). La AACT es una tiolasa de clase II que condensa dos moléculas de acetil-CoA a acetoacetil-CoA en una reacción reversible (Miziorko, 2011).

El acetoacetil-CoA se convierte en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS, EC 2.3.3.10). La HMG-CoA se convierte en ácido mevalónico (MVA) en dos etapas de reducción, cada una de las cuales requiere nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como equivalente reductor, esta reacción es catalizada por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR, EC 1.1.1.34) (Montamat *et al.*, 1995).

En dos reacciones sucesivas catalizadas por MVA quinasa (MK, EC 2.7.1.36) y fosfo-MVA quinasa (PMK, EC 2.7.4.2), el MVA se fosforila a MVA 5-difosfato. El siguiente paso es la síntesis de uno de los precursores de terpenos, el IPP, por una descarboxilación dependiente de ATP de MVA 5-difosfato, que es catalizada por difosfo-MVA descarboxilasa (MPDC, EC 4.1.1.33). Por último, se sintetiza el DMAPP, por una descarboxilación del IPP, por la enzima isopentil difosfato isomerasa (IPPI, EC 5.3.3.2). La biosíntesis del esteviósido y rebaudiósido A, puede iniciar a partir de la ruta del MVA, ya que a la altura del IPP y DMAPP, la ruta del MVA realiza un entrecruzamiento con la ruta del MEP (Fig. 7 A) (Vranová *et al.*, 2013).

A partir del DMAPP, se puede sintetizar el farnesil difosfato (FPP), por la enzima farnesil difosfato sintasa (FPPS, EC 2.5.1.10), el cual es el precursor de los sesquiterpenos y triterpenos. Por medio de esta ruta también se puede sintetizar geranilgeranil difosfato (GGPP), esta reacción se lleva a cabo por la enzima geranilgeranil difosfato sintasa (GGPPS, EC 2.5.1.29) (Vranová *et al.*, 2013).

2.9.3. Ruta del 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato

La ruta del **MEP** (Fig. 7 B), produce IPP y DMAPP en los plástidos. Comienza con la condensación de (hidroxietil) tiamina (derivada del piruvato) y el grupo aldehído C1 del D-gliceraldehído 3-fosfato (G-3P) que se convierten en 1-desoxi-d-xilulosa-5-fosfato (DXP). La reacción de condensación es catalizada por la enzima 1-desoxi-d-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS, EC 2.2.1.7), libera CO₂ y es una reacción irreversible (Estévez *et al.*, 2000).

La enzima 1-desoxi-d-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR, EC 1.1.1.267), cataliza el reordenamiento de la cadena DXP, así como la subsiguiente reducción del aldehído resultante por NADPH para formar MEP, lo que podría representar el primer intermediario comprometido en esta ruta metabólica (Totté *et al.*, 2000).

El MEP se convierte en 4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritrol (CDP-ME) por la enzima 2-C-metil-D-eritrol 4-fosfato citidiltransferasa (MCT, EC 2.7.7.60). Después, el CDP-ME por una reacción dependiente de ATP, se convierte en 2 fosfo-4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritrol (CDP-ME-P), por la enzima 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritrol kinasa (CMK, EC 2.7.1.148). Posteriormente, el CDP-ME-P se convierte en 2-C-Metil-D-eritrol-2,4 ciclodifosfato (MD), por la enzima 2-C-metil-D-eritrol 2,4-ciclodifosfato sintasa (MDS, EC 4.6.1.12). La enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato sintasa (HDS, EC 1.17.7.1), convierte a MD en 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato (HD), el cual es el precursor de IPP y DMAPP. El HD, necesita de la enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (HDR, EC 1.17.1.2), para poder sintetizar al IPP o DMAPP, esta reacción es dependiente de NADPH. El paso de IPP a DMAPP se realiza por la enzima isopentenil difosfato-isomerasa (IPPI, EC 5.3.3.2). El DMAPP puede sintetizar a geranilgeranil difosfato (GGPP) por el geranil difosfato, con la enzima geranil difosfato sintasa (GPPS, EC 2.5.1.1) (Cordoba *et al.*, 2009; Vranová *et al.*, 2013).

2.9.4. Biosíntesis de glucósidos de esteviol en *Stevia rebaudiana*

La biosíntesis de las estructuras de GEs y giberelinas comienza en paralelo, ocupan los precursores isoprenoides generados por la ruta del MEP o MVA. La biosíntesis inicia con la condensación de DMAPP que resulta en GGPP. EL GGPP se convierte en copalil difosfato (CPP) por la enzima copalil difosfato sintasa (CPPS, EC 5.5.1.13). El CPP es catalizado a kaureno por la enzima kaureno sintasa (KS, EC 4.2.3.19). El siguiente paso, corresponde a la oxidación de kaureno a ácido kaurénico por la enzima kaureno oxidasa (KO, EC 1.14.13.78). El punto de ramificación con la biosíntesis de las giberelinas se encuentra en la hidroxilación del ácido kaurénico a esteviol (el precursor de los GEs), con la ayuda de la enzima ácido kaurénico hidroxilasa (KAH, EC 1.14.13.79). Las glucosilaciones posteriores resultan en esteviolmonósido, por la enzima UGT85C2-UDP-glucosiltransferasa 85C2. En esteviolbiósido, por la enzima UTG-glucosiltransferasa. En esteviósido, por la enzima UGT74G1-UDP glucosiltransferasa 74G1 y, por último, en rebaudiósido A por la enzima UGT76G1-UDP-glucosiltransferasa 76G1 (Fig. 7) (Totté *et al.*, 2000; Modi *et al.*, 2014).

2.10. Regulación del flujo de las rutas MVA y MEP

La regulación de las rutas de MVA y MEP en las plantas es muy compleja. Los flujos de la ruta de los isoprenoides de las plantas se controlan tanto en los niveles de transcripción y de enzimas. Además, se le suman los estímulos ambientales, haciendo más compleja la regulación de ambas rutas (Vranová *et al.*, 2013).

La información disponible sobre la regulación de la biosíntesis de GEs en *S. rebaudiana* son sumamente escasos, sin embargo, la regulación de terpenoides ha sido estudiada, principalmente por análisis de niveles de expresión, en otros sistemas vegetales como en Lavanda (*Lavándula latifolia*) (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2006) y *Arabidopsis thaliana* (Estévez *et al.*, 2001, Wright *et al.*, 2014).

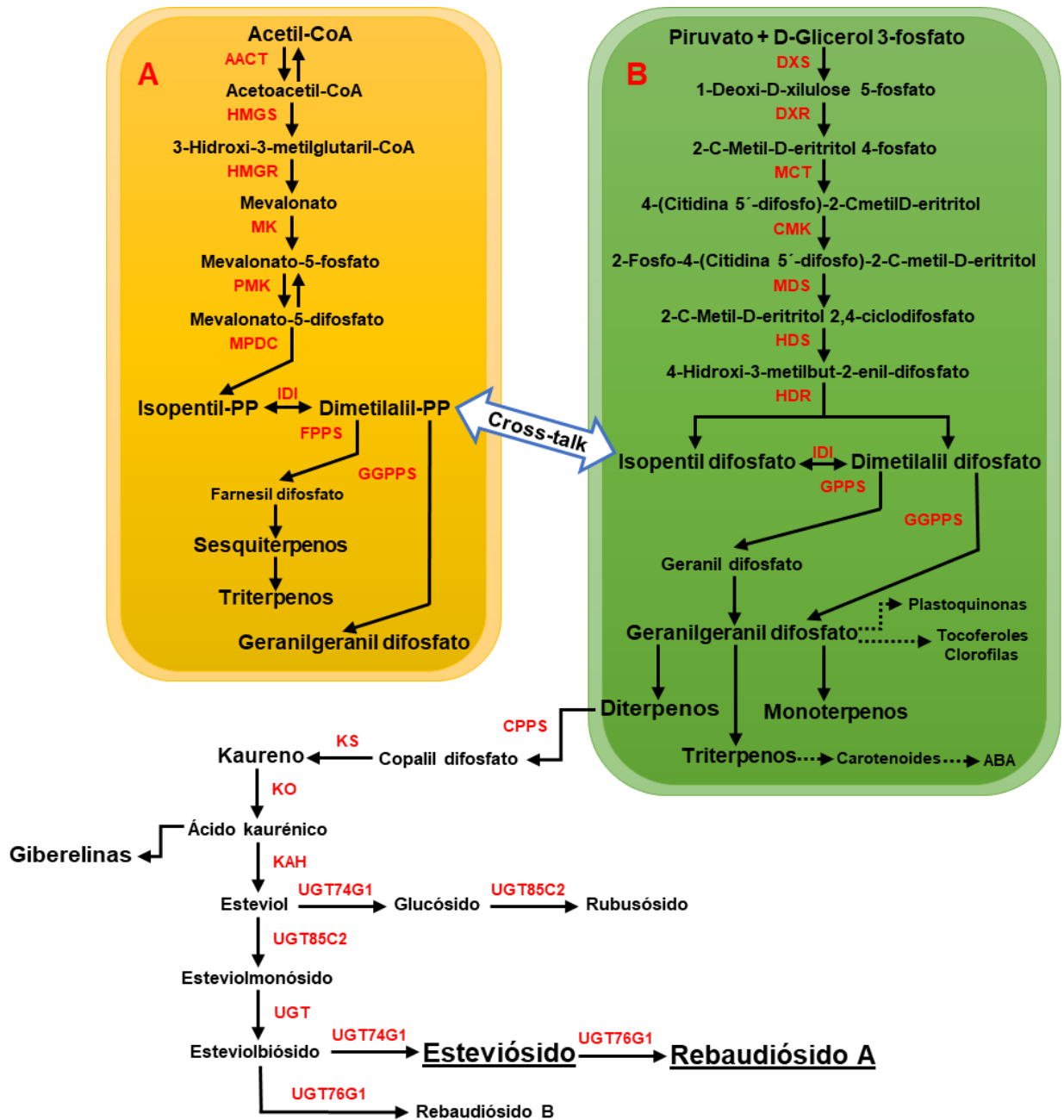


Fig. 7. Ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol. A) Ruta-MVA (Citosol). AACT: acetil-CoA C-acetiltransferasa. HMGS: 3-Hidoxi-3-metilglutaril-CoA sintasa. HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa. MK: MVA quinasa. PMK: fosfo-MVA quinasa. MPDC: MVA difosfato descarboxilasa. IPPI: isopentil difosfato isomerasa. FPPS: farnesil difosfato sintasa. GGPPS: geranilgeranil difosfato sintasa. B) Ruta-MEP (Plástidos). DXS: 1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa. DXR: 1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa. MCT: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidiltransferasa. CMK: 4- (Citidina 5'-difosfo) -2-C-metil-D-eritritol kinasa. MDS: 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa. HDS: 4-Hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato sintasa. HDR: 4-Hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa. GPPS: geranil difosfato sintasa. CPPS: copalil difosfato sintasa. KS: kaureno sintasa. KO: kaureno oxidasa. KAH: ácido kaurénico hidroxilasa. UGT85C2: UDP-glucosiltransferasa 85C2. UTG: glucosiltransferasa. UGT74G1: UDP-glucosiltransferasa 74G1. UGT76G1: UDP-glucosiltransferasa 76G1 (Modificada de Humphrey *et al.*, 2006; Cordoba *et al.*, 2009; Vranová *et al.*, 2013).

La ruta del **MVA** está regulada principalmente a nivel de la HMGS y HMGR; se sabe que la actividad HMGR regula el flujo metabólico a través de la ruta y la producción final de los productos finales isoprenoides. El escenario parece ser más complejo en el caso de la ruta del **MEP**. De hecho, la ruta del MEP puede ser regulada por varias enzimas, incluidas la DXS, DXR y HDR (Rodríguez-Concepción, 2006; Mendoza-Poudereux *et al.*, 2017).

Wright *et al.*, (2014), utilizaron un análisis de control metabólica (MCA), que implica la medición del coeficientes de control (es decir, cantidades que indican el grado de control que ejerce una enzima individual sobre el flujo a través de una ruta metabólica), donde determinaron que el coeficiente de control de flujo (FCC) de la DXS es de 0.82 y según con el teorema de la adición de los flujos del MCA indican que la suma de las FCC de todas las enzimas en una ruta metabólica suman 1. Revelando claramente que la DXS es la enzima principal que controla el flujo de la ruta MEP.

Por otro lado, los estudios de transformación que han sido reportados con mayor impacto en la regulación de la producción de GEs se ubican en las reacciones catalizadas por las enzimas DXS, DXR y HDR (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2012).

Estévez *et al.*, (2001), exploraron el efecto de la expresión de DXS en la producción de giberelinas. Se sabe que estos compuestos constituyen una gran familia de diterpenos que actúan como hormonas vegetales y participan en muchos procesos de desarrollo. Se forman convirtiendo el GGPP en ent-kaureno y estos pasos iniciales se llevan a cabo en los plástidos. Los resultados demostraron que la alteración de los niveles de DXS causaba cambios en la acumulación de giberelinas y con ello un cambio en la morfología de las plántulas, como la elongación y grosor del tallo, demostrando que DXS es fundamental en la ruta MEP.

Diversos estudios han justificado que la biosíntesis de GEs está básicamente localizada en los plástidos y, en general, se lleva a cabo a través de la ruta del MEP,

comenzando por el precursor del esteviol. Amplias evidencias indicaron que el paso primario en la síntesis de GEs (es decir, la formación del ácido kaurénico) ocurre solo en tejidos verdes (plástidos), que finalmente se convierte en el esteviol. Sin embargo, la glucosilación del esteviol tiene lugar en el citoplasma mediante tres glucosiltransferasas diferentes: UGT85C2, UGT74G1 y UGT76G1. Entre los tres genes glucosiltransferasa, se ha informado que UGT85C2 es el gen limitador de la velocidad de la ruta, que principalmente gobierna no solo la funcionalidad de la vía biosintética subyacente, sino también la afirmación de la recuperación del producto (Mohamed *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015; Pandey *et al.*, 2016).

Debido a la inmensa importancia biológica de los GEs, es crucial comprender la regulación de su ruta biosintética lo más completa posibles. En el pasado, el avance en las tecnologías moleculares nos ha permitido comprender mejor las proteínas, enzimas, genes, etc. involucrados en la ruta biosintética de los GEs. Sin embargo, no se ha investigado a fondo el papel de regulación de los microARNs. Los microARNs son ribonucleótidos pequeños y no codificantes que funcionan como reguladores críticos de la expresión génica en eucariotas. A pesar del conocimiento acumulado de la regulación mediada por los microARNs de varios procesos, la participación de los microARNs en la regulación de la biosíntesis del producto vegetal secundario aún no se conoce del todo (Gupta *et al.*, 2017). El rol de los microARNs en la biosíntesis de terpenoides ha sido estudiado recientemente. Yu *et al.*, 2015, observaron que, terpeno sintasa (TPS) cataliza la conversión de farnesil difosfato (FPP) en sesquiterpenos (C15). El factor de transcripción SPL9 y el objetivo de microARN-156, se unen directamente y activan el promotor del gen de terpeno sintasa 21 (TPS21) y regulan positivamente su transcripción, regulando así la síntesis de sesquiterpenos (Fig. 8).

De forma similar, Vashisht *et al.*, (2015), predijeron que el microARN-4995 se dirigía al ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de una enzima 3-desoxi-7 fosfoheptulonato sintasa, que está implicada en la ruta biosintética del picrosido en una hierba medicinal *Picrorhiza kurroa*. Por otro lado, Fan *et al.*, (2015), detectaron varios microARNs implicados en la ruta de biosíntesis sesquiterpénica en *Xanthium strumarium* L. Por

ejemplo, los microARNs de las enzimas aguas arriba en las rutas de biosíntesis de terpenoides (DXS, HMGR, MDS, HDS, GGDS e IDI), fueron predichos como objetivos por microARN-7539, microARN-5021 y microARN-1134 (Fig. 8). Finalmente, Saifi *et al.*, (2015), extrajeron y validaron 11 microARNs que están implicados en la ruta biosintética de GEs en *Stevia rebaudiana* y establecieron el patrón de relación con los niveles de expresión de sus microARNs diana, así como los contenidos de glucósidos de esteviol en hojas, flores y tallos, concluyendo que algunos microARNs juegan un papel crucial en la regulación de los GEs.

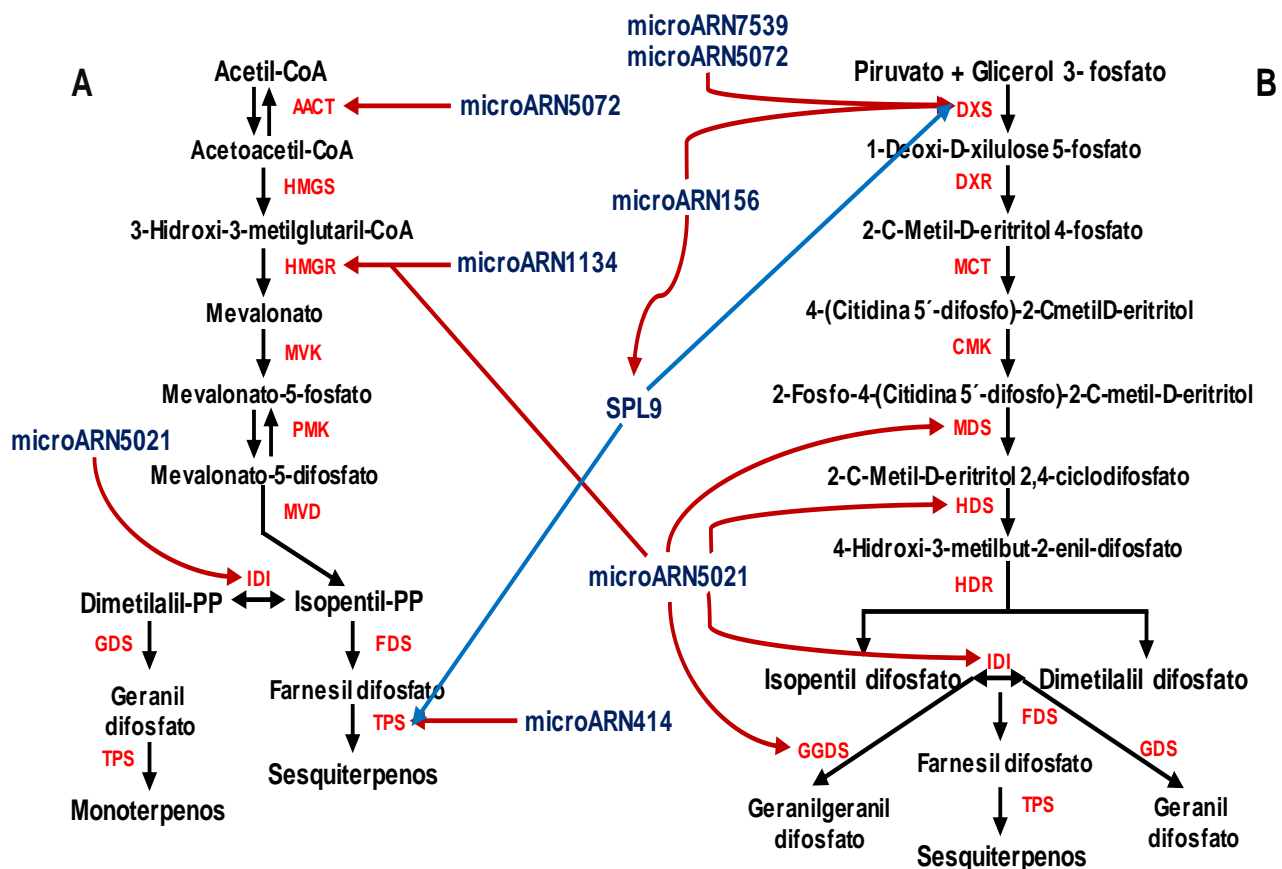


Fig. 8. Representación esquemática de biosíntesis de los terpenoides y su posible interacción con microARNs. A) Ruta-MVA. AACT: acetil-CoA C-acetiltransferasa. HMGS: 3-Hidoroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa. HMGR: 3-hidoroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa. MVK: MVA quinasa. PMK: fosfo-MVA quinasa. MVD: MVA difosfato descarboxilasa. IDI: isopentil difosfato isomerasa. FDS: farnesil difosfato sintasa. GDS: geranil difosfato sintasa. TPS: terpeno sintasa. **B) Ruta-MEP.** DXS: 1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa. DXR: 1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa. MCT: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidiltransferasa. MCK: 4- (Citidina 5'-difosfo) -2-C-metil-D-eritritol kinasa. MDS: 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa. HDS: 4-Hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato sintasa. HDR: 4-Hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa. FDS: farnesil difosfato sintasa. GGDS: geranilgeranil difosfato sintasa (Modificada de Gupta *et al.*, 2017).

2.11. Importancia de DXS en la ruta del MEP

La ruta del MEP funciona mediante la participación de ocho enzimas consecutivas para producir IPP y DMAPP, que son los compuestos básicos de los isoprenoides, iniciando de los precursores piruvato y D-gliceraldehído 3-fosfato. De estas 8 enzimas, la DXS es la principal, ya que controla el 82% del flujo de la ruta (Cordoba *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2014).

Diversas pruebas experimentales demuestran que DXS juega un papel crítico en la síntesis de IPP y DMAPP. El análisis de líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan niveles de DXS superiores o inferiores mostró que el nivel de diversos productos finales de isoprenoides que incluyen clorofila, carotenoides, tocoferoles y ácido abscísico (ABA), aumentan o disminuyen en las plantas transgénicas correspondientes (Estévez *et al.*, 2001). Resultados similares se han obtenido en otras plantas, incluyendo tomate (Lois *et al.*, 2000; Enfissi *et al.*, 2005), menta (Mahmoud & Croteu, 2001), patata (Morris *et al.*, 2006), *Ginkgo biloba* (Gong *et al.*, 2006) y *Stevia rebaudiana* (Jiménez-Brigada, 2018). El impacto en el nivel de algunos productos finales de la ruta informado en estos análisis respalda que, en las plantas, esta enzima cataliza un paso limitante de la velocidad para la síntesis de los componentes básicos de IPP y DMAPP, y también, para la acumulación de varios productos finales isoprenoides (Cordoba *et al.*, 2009).

Por lo tanto, actualmente, DXS representa el objetivo más obvio para la manipulación de esta ruta metabólica. La importancia de tales manipulaciones de la ruta MEP y la experimentación que ha llevado a cultivos mejorados ha sido de gran importancia para poder mejorar los rendimientos de los MetS de interés (Cordoba *et al.*, 2009). Si bien, la información con respecto a la regulación de la ruta MEP en *S. rebaudiana* no ha sido lo suficientemente estudiada, se puede asegurar que DXS juega un papel crucial en la biosíntesis de los GEs.

2.12. Biosíntesis de fenoles y flavonoides

Los compuestos fenólicos naturales, tales como fenoles y flavonoides son unos de los principales MetS responsables de la actividad antioxidante de las plantas.

2.12.1. Fenoles

Los ácidos fenólicos son MetS ampliamente extendidos por todo el reino vegetal. Los cuales son cruciales para el crecimiento y la reproducción de las plantas, y se producen como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, etc., y también para defender las plantas lesionadas (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011). Estos compuestos forman un grupo diverso que incluye los ácidos hidroxibenzoicos y hidroxicinámicos.

Los compuestos de ácido hidroxicinámico son (a menudo) producidos como ésteres simples con glucosa o ácidos hidroxicarboxílicos. Dichos compuestos fenólicos son diversos en estructura molecular, y se caracterizan por anillos aromáticos hidroxilados (Mandal *et al.*, 2010). En relación con el hombre, los ácidos fenólicos se vinculan con beneficios a la salud, debido a sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Cabrera-Soto *et al.*, 2009).

2.12.2. Flavonoides

Al igual que los ácidos fenólicos, los flavonoides son MetS que son comunes en todas las plantas superiores. Más de 3,000 flavonoides diferentes se han caracterizado químicamente y las nuevas estructuras se siguen informando. Todos los flavonoides comparten el esqueleto estructural básico C6-C3-C6, que consiste en dos anillos aromáticos C6 (A y B) y un anillo heterocíclico (C) que contiene un átomo de oxígeno. Se dividen en seis subclases, tales como: **flavonas** (apigenina, luteolina y tangeretina),

flavonoles (isorhamnetina, kaempferol, miricetina y quercetina), **flavanonas** (eriodictiol, hesperetina y naringenina), **flavan-3-ols** (catequina y epicatequina), **isoflavonas** (daidzeína, genisteína y gliciteína) y **antocianidinas** (cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina) (Fig. 9). Cada tipo de flavonoide se somete a modificaciones adicionales tales como hidroxilación, metilación, acilación, glucosilación, dando como resultado la enorme diversidad y colores (amarillos, naranjas, azules y rojos) de los flavonoides encontrados en la naturaleza (Koes *et al.*, 1994; Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011).

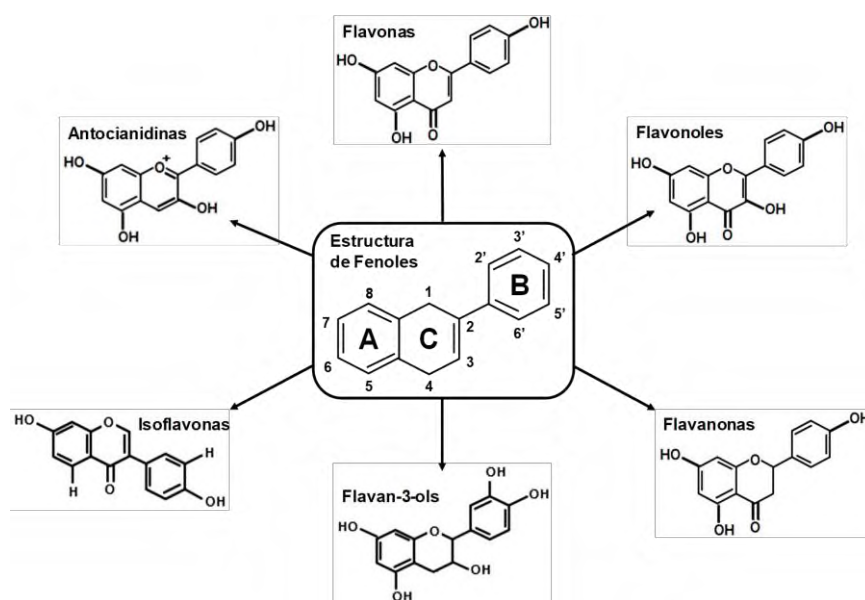


Fig. 9. Estructura de las diferentes subclases de flavonoides (Modificada de Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011).

Dichos MetS actúan como atractores visuales para favorecer la polinización, como un mecanismo de defensa frente al ataque de insectos y microorganismos y como protectores de la radiación UV por sus propiedades antioxidantes (Martino, 2000).

En su relación con el hombre, actúan como antioxidantes naturales, es decir, tienen la capacidad de secuestrar y neutralizar los radicales libres, especies químicas muy reactivas que fácilmente conducen a reacciones incontroladas, resultando en diversas formas de daños oxidativos sobre las moléculas, diversas células y tejidos; causando su degeneración, envejecimiento, pérdida de su función y otras formas importantes de

daño celular. Por lo tanto, los flavonoides juegan un papel importante en la prevención de varios procesos fisiopatológicos asociados con el estrés oxidativo y presencia de radicales libres, tales como el cáncer y diversas enfermedades neurodegenerativas (alzhéimer), cardiovasculares (hipertensión arterial) y metabólicas (diabetes mellitus II) (Reyes *et al.*, 2014).

En *Stevia rebaudiana*, diversos reportes han comprobado la producción y efecto antioxidante de compuestos fenólicos. Muanda *et al.*, (2011), identificaron 18 compuestos fenólicos que demostraron una alta capacidad antioxidante de las hojas de *Stevia*. Gawel-Bęben *et al.*, (2015), evaluaron el contenido de compuestos fenólicos en extractos acuosos, etanólico y glicol-acuoso (GA) de hojas secas, observando que el extracto de GA presentaba el máximo contenido de fenoles (ácido cafeico, clorogénico y ferúlico) y flavonoides (catequina, epicatequina, luteolina y rutina). Molina-Calle *et al.*, (2017), detectaron 21 compuestos fenólicos agrupados en dos principales familias: flavonoides, y derivados de ácido quínico y cafeico.

Por otro lado, Kim *et al.*, (2011), evaluaron extractos acuosos mostrando una actividad antioxidante relativamente alta al inhibir al 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y las actividades de eliminación de aniones superóxido en diferentes concentraciones; concluyendo que estos extractos son capaces de inhibir y reducir los radicales libres terminando la reacción en cadena de los radicales y, por lo tanto, actúan como agentes reductores.

2.12.3. Ruta del Shikimato

Tanto los fenoles como los flavonoides se biosintetizan a partir de fenilalanina por la ruta del Shikimato (Tomás-Barberán & Espín, 2001). Los fenoles se derivan del ácido cinámico, que se forma a partir de fenilalanina por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), esta enzima es la más importante en esta ruta. Varios fenoles se producen a partir del ácido cinámico mediante una serie de reacciones de hidroxilación, metilación y deshidratación. Dichos ácidos fenólicos incluyen al p-cumárico, cafeico, clorogénico,

ferúlico, 5-hidroxiferúlico, sinápico, benzoico, salicílico y p-hidroxibenzoico (Fig. 10) (Dixon & Paiva, 1995).

La síntesis de flavonoides comienza con la condensación de 1 molécula de p-coumaroil-CoA y tres moléculas de malonil-CoA que producen a chalcona (CH). Esta reacción se lleva a cabo por la enzima chalcona sintasa (CHS). Los dos precursores inmediatos de la CH proceden de dos vías diferentes de metabolismo primario. La p-coumaroil-CoA se sintetiza a partir de la ruta fenilpropanoidea general. Malonil-CoA se sintetiza por carboxilación de acetil-CoA, un intermedio central en el ciclo de Krebs. La CH es posteriormente isomerizada por la enzima chalcona flavanona isomerasa (CHI) para producir flavanonas. A partir de estos intermediarios centrales, la ruta diverge en varias ramas laterales, donde cada una produce una clase diferente de flavonoides (Fig. 10) (Koes *et al.*, 1994).

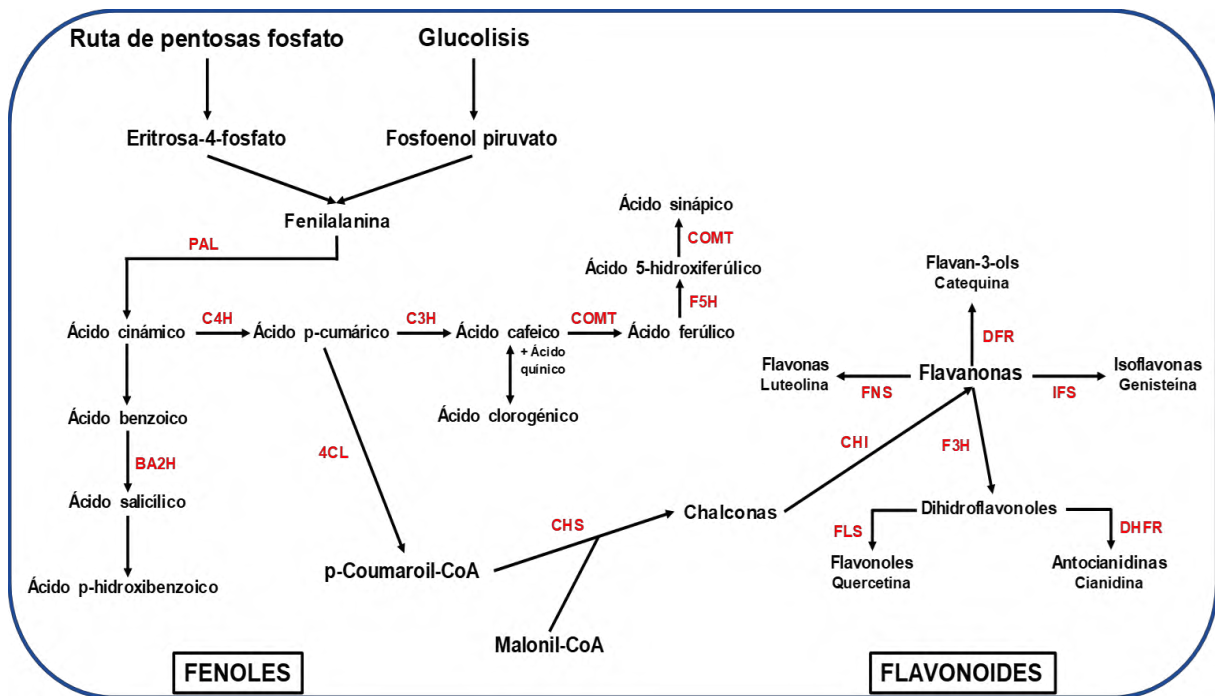


Fig. 10. Ruta biosintética de fenoles y flavonoides. PAL: fenilalanina amonio liasa. BA2H: ácido benzoico-2-hidroxilasa. C4H: cianato 4-hidroxilasa. C3H: p-Cumarato 3-hidroxilasa. COMT: ácido cafeico O-metiltransferasa y ácido sinápico O-metiltransferasa. F5H: ácido ferúlico 5-hidroxilasa. 4CL: 4-coumarato-Coenzima A ligasa. CHS: chalcona sintasa. CHI: chalcona flavona isomerasa. FNS: flavona sintasa. DFR: dihidroflavonol 4-reductasa. IFS: isoflavona sintetasa. F3H: flavona 3- hidroxilasa. FLS: flavonol sintasa. DHFR: dihidroflavonol reductasa (Modificada de Koes *et al.*, 1994; Dixon & Paiva, 1995; Mandal *et al.*, 2010; Mouradov & Spangenberg, 2014).

2.13. Estrategias para la producción de metabolitos secundarios

2.13.1. Cultivo *in vitro*

Todas las plantas tienen la capacidad de sintetizar una variedad muy abundante de compuestos orgánicos, los que las hace de un gran interés comercial. Generalmente, estos compuestos bioactivos son la fuente principal para la producción de fármacos, agroquímicos, pesticidas, insecticidas, saborizantes, colorantes, perfumes y/o aditivos alimentarios (Zhao *et al.*, 2005). Comúnmente, estos compuestos se obtienen de las plantas silvestres, lo que involucra una serie de desventajas, una de ellas, es la baja y lenta acumulación de dicho compuesto, 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 & Alfermann, 2013). Es por ello, por lo que el cultivo *in vitro* es una estrategia esencial para la producción de estos compuestos, de manera más eficaz y rápida.

El cultivo *in vitro* es una técnica biotecnológica, que consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial y así poder generar una nueva planta. Este principio se basa en la ley de totipotencia, la cual indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece (sin importar su función o posición en ella), y por lo tanto tiene la capacidad de regenerarse en una nueva planta completa e idéntica a la planta madre. Durante este proceso es necesario adoptar procedimientos de asepsia, para mantener a los cultivos libres de cualquier contaminación microbiana (Roca & Mroginski, 1991; Ferl & Paul, 2000).

Actualmente, se realizan diferentes tipos de cultivos *in vitro*, como cultivo de protoplastos, órganos, tejidos y células (Fig. 11).

Esta técnica se caracteriza por:

- Se producen en espacios relativamente pequeños.
- Las condiciones ambientales a las que está acostumbrada se optimizan, hablando de factores físicos, nutricionales y hormonales.
- Se excluyen todos los microorganismos (hongos, bacteria y/o virus), gracias a las prácticas de asepsia, además se eliminan otras plagas de patrones superiores, como los insectos y/o nematodos.
- El patrón normal de desarrollo de la planta a menudo se rompe, y un tejido aislado puede dar lugar a un callo o puede desarrollarse de muchas maneras inusuales (por ejemplo, la formación de órganos).
- La capacidad de cultivar protoplastos o células individuales permite manipulaciones que antes eran imposibles.
- **Permite la obtención de compuestos de interés (MetS) con mayor rapidez y facilidad.**

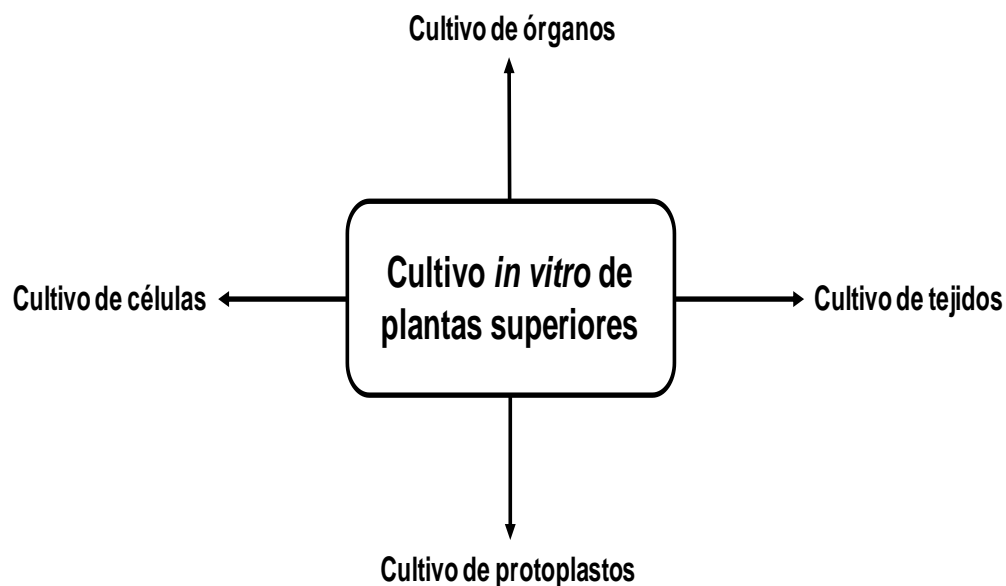


Fig. 11. Esquema del cultivo *in vitro* de plantas superiores (Modificado de Pierik, 1997).

2.13.2. Cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana*

Una de las limitantes de la propagación de *S. rebaudiana* fue desde un principio, la tasa de germinación de las semillas, que por lo general oscila en menos de un 10% (Hossain *et al.*, 2008; Soliman *et al.*, 2014). Posteriormente se probó con la propagación por esquejes, teniendo un menor éxito de propagación (Laribi *et al.*, 2012). En ambos casos, además de una baja tasa de propagación, se encontró con otros factores limitantes, como plantas menos vigorosas, menor número de individuos que se pueden obtener simultáneamente de una sola planta y no se producen plantas con apariencia y crecimiento uniforme, lo que provoca una gran variedad en el crecimiento y madurez de las plantas, teniendo como resultado diferentes niveles y composición de GEs (Jitendra *et al.*, 2012). Debido a todas estas limitantes, el cultivo *in vitro* es el único método alternativo para la propagación más rápida de plantas de *S. rebaudiana*.

El cultivo de tejidos vegetales cuenta con algunas ventajas sobre otros sistemas de propagación, ya que proporciona una propagación clonal uniforme y rápida durante todo el año. Por lo tanto, la propagación *in vitro* aparece como una técnica alternativa para la rápida multiplicación de *S. rebaudiana* en un corto lapso. La micropropagación de *S. rebaudiana* se puede llevar a cabo mediante organogénesis directa o indirecta lo que proporciona un sistema rápido y fiable para la producción de un gran número de plántulas libres de enfermedades genéticamente uniformes, independientemente de la estación y con una acumulación de GEs más rápida (Ibrahim *et al.*, 2008; Shatnawi *et al.*, 2011; Autade *et al.*, 2014).

Desde hace ya varios años existen diferentes reportes para el establecimiento de protocolos de propagación *in vitro* de *S. rebaudiana* (Handro *et al.*, 1977) y hasta la fecha se siguen modificando o generando nuevos protocolos (Razak *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015; Yücesan *et al.*, 2016), con diferentes explantes y combinaciones de fitorreguladores.

En la Tabla 2, se resumen los diferentes tipos de explantes, combinaciones y concentraciones de fitorreguladores utilizados para la micropropagación de dicha planta.

Tabla 2. Diferentes tipos de explantes y fitorreguladores utilizados para la micropropagación de *Stevia rebaudiana*.

Tipo de explante	Inducción de brotes	Inducción de raíces	Inducción de callos	Referencia
	Fitorregulador utilizado			
Hojas y segmentos de tallos	---	---	2,4-D 0.5 mg/L BA 0.5 mg/L	Handro <i>et al.</i> , 1977.
Segmentos nodales con brotes axilares	BAP 2 mg/L IAA 1.13 mg/L	IBA 2 mg/L	---	Debnath, 2008.
Puntas de brote y hojas	BA 2 mg/L	NAA 0.001 mg/L	---	Ibrahim <i>et al.</i> , 2008.
Segmentos nodales y hojas	BAP 3.5 mg/L	---	2,4-D 2 mg/L	Sairkar <i>et al.</i> , 2009.
Puntas de brote, segmento nodal y hojas	BA 1 mg/L IAA 0.5 mg/L	IAA 1 mg/L	---	Anbazhagan <i>et al.</i> , 2010.
Hojas	BAP 2 mg/L	IBA 0.5 mg/L	---	Preethi <i>et al.</i> , 2011.
Segmentos nodales	BAP 0.5-3 mg/L KIN 0.5-3 mg/L	NAA, IAA IBA 0.5-2 mg/L	---	Thiyagarajan & Venkatachal, 2012.
Hojas	---	---	BA 8.9 μ M NAA 2.7 μ M	Mathur & Shekhawat, 2013.
Segmentos nodales	BAP 0.5 mg/L KIN 0.25 mg/L	IBA 1.0 mg/L	---	Razak <i>et al.</i> , 2014.
Hojas	---	---	NAA 2 mg/L	Gupta <i>et al.</i> , 2015.
Segmentos nodales	BAP 1-2 mg/L KIN 0.5-1 mg/L	IAA 0.25 mg/L	---	Yücesan <i>et al.</i> , 2016.
Hojas	BAP 1 mg/L IAA 0.5 mg/L	IBA 0.5 mg/L		Montes-Palmeros, 2017.

Los sistemas de cultivo *in vitro* representan una potencial fuente renovable de diversos MetS con actividad biológica, que no pueden ser producidos por células microbianas o síntesis química (Mulabagal & Tsay, 2004). Sin embargo, en diversos trabajos se ha reportado que la producción de los compuestos de interés tiende a disminuir; esto se puede deber a que como ya se mencionó, el cultivo *in vitro* es una estrategia para mantener el cultivo en condiciones asépticas, y sin embargo 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. Basados en este principio se han creado estrategias para la producción de MetS de forma *in vitro*; estas incluyen tratamientos con diversos elicitores y estrés biótico y abiótico (Yukimune *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2004).

2.14. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios

2.14.1. Elicitación biótica y abiótica

En un sentido amplio, la elicitación, es la capacidad de las plantas de reaccionar ante varios estímulos por estrés, provocando respuestas fisiológicas y morfológicas, que conducen a la formación y acumulación creciente de MetS. Estos compuestos están relacionados con los mecanismos de defensa de las plantas contra insectos, herbívoros y patógenos, o para sobrevivir a estrés abiótico en su medio natural (Zhao *et al.*, 2005). Los inductores bióticos y abióticos se usan para estimular la formación secundaria de productos metabólicos en cultivos *in vitro*, reduciendo así el tiempo de proceso para alcanzar altas concentraciones de MetS y volúmenes del cultivo. Existen distintos tipos de elicitores, de origen fúngico, bacteriano, de levadura, polisacáridos, glicoproteínas, enzimas inactivadas y sales de metales pesados (Rao & Ravishankar, 2002; Mulabagal & Tsay, 2004).

En la Tabla 3, se muestran diferentes elicitores utilizados en diversas plantas para aumentar la producción y acumulación de MetS.

Tabla 3. Efecto de diferentes elicitores bióticos y abióticos como estrategia para aumentar la producción de metabolitos secundarios en distintas plantas.

Especie	Factor biótico/abiótico	Metabolito secundario	Referencia
<i>Lepidium sativum</i>	Abiótico Sulfato de zinc Sulfato de cobre	Alcaloides Lepidina	Pande <i>et al.</i> , 2000.
<i>Picea abies</i>	Abiótico Metil jasmonato	Diterpenos	Martin <i>et al.</i> , 2002.
<i>Ocimum basilicum</i>	Abiótico Metil jasmonato	Fenoles Ácido rosmarínico y ácido cafeico	Kim <i>et al.</i> , 2006.
<i>Brassica rapa</i> L.	Abiótico Cloruro de sodio	Glucosinolatos	Steinbrenner <i>et al.</i> , 2012.
<i>Brugmansia candida</i>	Biótico Extracto de levadura	Alcaloides Tropano y escopolamina	Pitta-Álvarez <i>et al.</i> , 2000.
<i>Beta vulgaris</i>	Biótico Glicanos purificados de origen microbiano	Betalainas	Savitha <i>et al.</i> , 2006.
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Biótico Extracto de levadura	Fenoles Ácido rosmarínico	Yan <i>et al.</i> , 2006.
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Biótico Larvas de <i>Spoladea recurvalis</i>	Betacianinas	Casique-Arroyo <i>et al.</i> , 2014.
<i>Vitis vinifera</i>	Abiótico Ácido jasmónico e irradiación por luz	Antocianinas	Zhang <i>et al.</i> , 2002.
<i>Solenostemon scutellarioides</i>	Abiótico Metil jasmonato	Fenoles Ácido rosmarínico	Sahu <i>et al.</i> , 2013.
<i>Ocimum sanctum</i>	Abiótico Metil jasmonato	Terpenoides y Alcaloides	Mathew & Sankar, 2014.
<i>Catharanthus roseus</i>	Abiótico Ketoconazol	Alcaloides Ajmalicina	Jaleel <i>et al.</i> , 2007.

2.14.2. Elicitación en *Stevia rebaudiana*

Existen diversos reportes en donde se han estudiados diferentes tipos de elicitor (bióticos y abióticos) para incrementar la productividad y acumulación de GEs, fenoles y flavonoides totales, la capacidad antioxidante y el efecto de las concentraciones del elicitor en la morfología de las plantas de *S. rebaudiana*.

Javed *et al.*, (2017), evaluaron el efecto del peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en brotes de *S. rebaudiana*; los resultados indicaron que una concentración de 10 mM aumentaba en un 2.97% y 2.32% el Reb A y Est, respectivamente. La misma concentración aumento el contenido de fenoles ($3.58 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$) y flavonoides totales ($2.78 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$). Por otro lado, Ahmad *et al.*, (2016), evaluaron el efecto de diferentes luces de colores (azul, verde y roja) en callos de *S. rebaudiana*, donde observaron que la exposición a la luz azul aumentó el contenido de fenoles totales ($102.32 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{PS}}$), flavonoides totales ($22.07 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{PS}}$) y la capacidad antioxidante ($11.63 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{PS}}$).

Por otra parte, Desai *et al.*, (2015), evaluaron diferentes concentraciones de nanopartículas de zinc (NPs ZnO, 50, 100, 200, 400 y $1000 \text{ mg}/\text{L}^{-1}$) en plántulas de *S. rebaudiana*, encontrando que una concentración de $200 \text{ mg}/\text{L}^{-1}$ mostró un aumento en las características fisiológicas de las plántulas, como la altura de brotes. En el mismo año, Kilam *et al.*, probaron una combinación de hongos *Piriformospora indica* (Pi) y *Azotobacter chroococcum* (Az), sobre el crecimiento de las plántulas, el potencial antioxidante y el contenido de GEs en *S. rebaudiana*. Los resultados indicaron que las plántulas tratadas con Pi + Az mostraron un aumento significativo en todos los parámetros de crecimiento de las plántulas en comparación con el control. El contenido de fenoles y flavonoides totales aumentó considerablemente con el tratamiento de Pi + Az (con respecto al control), con un 6.04 ± 0.06 (p/p) y 3.772 ± 0.03 (p/p), respectivamente. En cuanto a los GEs hubo un aumento de 2 veces en el contenido de Est y Reb A en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con Pi + Az en comparación con las plantas no inoculadas.

El estrés causado por la adición de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl 0.05-0.20%) y carbonato de sodio (Na₂CO₃ 0.0125-0.10%) durante 2 semanas, mostró diferencias en la acumulación de GEs en callos de *S. rebaudiana*. La cantidad de GEs aumentó de 0.27 (control) a 1.43 y 1.57% con NaCl 0.10% y Na₂CO₃ al 0.025%, respectivamente. En el caso del cultivo de células en suspensión, las mismas concentraciones de NaCl y Na₂CO₃ aumentaron el contenido de GEs de 1.36 (control) a 2.61 y 5.14%, respectivamente, en el 10^o día (Gupta *et al.*, 2014). Zeng *et al.*, (2013), examinaron los efectos de tres diferentes concentraciones de NaCl (60, 90 y 120 mM) sobre el crecimiento, las respuestas fisiológicas y la composición de GEs de *S. rebaudiana*. Los resultados mostraron que el peso seco total disminuyó en un 40% a 120 mM de NaCl. En cuanto al contenido de GEs, la concentración de 60 mM aumento ligeramente la producción de Reb A (83.86 ± 2.17 mg/g_{PS}), con respecto al control (80.86 ± 0.94 mg/g_{PS}), y en la concentración de Est, no hubo ningún aumento, con ningunas de las concentraciones.

Por otro lado, Ceunen *et al.*, (2012), valoraron los efectos causados por luz LED roja, en plantas de *S. rebaudiana* crecidas en invernadero, concluyendo que después de 7 semanas de tratamiento, el crecimiento vegetativo se estimuló y se mantuvo, y el contenido de GEs era aproximadamente dos veces mayor en las plantas tratadas con LED (9.13% g GEs/g_{PS}) que en el grupo de control (5.88% g GEs/g_{PS}). Ma & Shi, (2011), evaluaron la aplicación de diferentes concentraciones (0, 90, 120 y 150 kg/ha) de óxido de potasio (K₂O) en cultivos de *S. rebaudiana*, y los resultados demostraron que una concentración de 120 kg/ha, incrementó la tasa fotosintética, la actividad de las raíces y la resistencia a otros tipos de estrés.

Como antecedentes del equipo de trabajo, Montes-Palmeros, (2017), evaluó 3 concentraciones diferentes de metil jasmonato (MeJa) 25, 50 y 100 µM y tiempos de exposición (24, 72 y 120 h), sobre la producción de Est, Reb A, fenoles totales y acumulación de clorofila de plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana*. Observó que la adición de 25 µM durante 24 h de exposición, indujo la mayor acumulación de Reb A, Est y fenoles totales, incrementando 2.11, 2.6 y 1.74, veces más respectivamente,

comparadas con las plantas sin tratamiento. En contraste, observó que la clorofila disminuyó 48.6 y 58.9% a las 120 h de exposición con 50 y 100 μM , respectivamente, en comparación con el control. Finalmente, Alvarado-Orea, (2017), evaluó NPs ZnO, H_2O_2 y MeJa, sobre la acumulación de MetS en raíces *in vitro* de *S. rebaudiana*. Consiguiendo que la adición de 15 ppm de NPs ZnO disminuyó hasta un 90% la acumulación de fenoles totales al día quinto, en comparación al control. Por otro lado, 500 μM de H_2O_2 al día quinto, incrementaron la producción de fenoles totales en un 42%, en comparación con el control, y la acumulación de fenoles totales aumento 63% al quinto día, con 250 μM de MeJa, comparándolo con el control.

2.14.3. Transformación genética de plántulas

La transformación genética es un mecanismo que en la actualidad es ampliamente utilizado dentro del campo del fitomejoramiento, como estrategia para incrementar la producción de MetS de plantas mono y dicotiledóneas. Este sistema permite insertar genes foráneos dentro de un tejido vegetal receptor para la creación de plantas genéticamente modificadas. Para realizar la transformación genética se han utilizado diversas técnicas como: **biobalística** o **microinyección**, **electroporación** y transformación mediada por ***Agrobacterium spp.***, entre otras (Blanco *et al.*, 2003; Loaiza & Valverde, 2006). Sin embargo, cada método tiene sus propias ventajas y desventajas por lo que el método óptimo depende del diseño experimental y objetivo (Kim *et al.*, 2010).

2.14.3.1. Biobalística

El bombardeo con microprojectiles llamada **biobalística**, emplea partículas metálicas a alta velocidad para administrar ácido desoxirribonucleico (ADN) biológicamente activo en células vegetales (Sanford, 1988; Christou, 1992). Millones de partículas de metal recubiertas de ADN son inyectadas en células o tejidos diana utilizando un dispositivo biológico o una pistola de genes. El ADN eluye las partículas que se alojan

dentro de las células, y una parte puede incorporarse de forma estable en los cromosomas del huésped, dando como resultado la recuperación de transformantes estables (Kikkert *et al.*, 2004). Originalmente se utilizaban partículas de tungsteno para introducir macromoléculas tales como ácido ribonucleico (ARN) y ADN (Klein *et al.*, 1987). Actualmente se utilizan partículas de oro cubiertas con las moléculas de los genes que se desea introducir a la célula, donde, el bombardeo se realiza a altas velocidades y presión, utilizando aire o helio comprimido (Sanford, 2000).

Las principales ventajas del bombardeo con microproyectiles, son:

- Transformación de tejido organizado.
- Recuperación rápida.
- Sistema de entrega universal.
- Transformación de especies recalcitrantes (Christou, 1992).

2.14.3.2. Electroporación

La **electroporación** es una técnica ampliamente utilizada para la transferencia de genes en sistemas microbianos, animales o vegetales. Tiene la ventaja de ser eficaz, simple y aplicable a una amplia gama de especies vegetales. Dicha técnica, puede usarse para suministrar ADN en un gran número de células en un corto plazo (Wu & Feng, 1999). Sin embargo, hace poco tiempo, el éxito con la electroporación se había limitado solo a protoplastos (Potrykus, 1991), pero en la actualidad se sabe que es factible suministrar ADN vía electroporación directamente a ciertas células vegetales (Singh *et al.*, 2005).

La electroporación es el uso de impulsos cortos de alta tensión para superar la barrera de la membrana celular. Mediante la aplicación de un campo eléctrico externo, que sólo supera la capacidad de la membrana celular. Este estado permeabilizado

transitorio puede usarse para transferir una gran variedad de moléculas, ya sea por difusión simple en el caso de moléculas pequeñas o por procesos conducidos electropóricamente que permitan el paso a través de la membrana desestabilizada, como es el caso de la transferencia de ADN. Actualmente esta es una técnica que se ha utilizado para la transferencia de genes en protoplastos de *S. rebaudiana* (Singh *et al.*, 2005).

2.14.3.3. Agrotransformación

El proceso de transformación que emplea *Agrobacterium spp.*, se utiliza principalmente por su facilidad y alto porcentaje de transformación en una gran variedad de especies vegetales, tanto mono como dicotiledóneas. Este mecanismo fue conocido a mediados de los años 70's (Gelvin, 2000).

El proceso de transformación se inicia cuando *Agrobacterium spp.*, percibe señales químicas de las células dañadas de la planta, las cuales son consideradas como inductoras de la respuesta de virulencia. Un ejemplo son los compuestos fenólicos, los cuales son liberados por las células de la planta cuando ocurre una herida, y sirven como inductores o co-inductores de los genes bacterianos, lo que facilita que se lleve a cabo la transformación de una manera más exitosa (Blanco *et al.*, 2003).

Agrobacterium tumefaciens y *rhizogenes* proporcionan excelentes sistemas de vectores para la producción de plantas transgénicas (Potrykus, 1991). *A. tumefaciens* sirve para la transformación de plantas y *A. rhizogenes* para raíces.

A. tumefaciens debe de contener el plásmido Ti, denominado "plásmido inductor de tumores", lo cual indica que, si en la planta se genera un tumor, es el resultado de una integración estable del ADN bacteriano en el genoma nuclear de las células de la planta. Por otro lado, *A. rhizogenes* debe de contener un plásmido similar, denominado "plásmido inductor de raíces" (Ri). El cual cae en un principio similar, en donde, si la raíz muestra más vellosidades indica que se realizó una integración estable del ADN

bacteriano en el genoma nuclear de las células de la raíz. Se requieren tres componentes en estos plásmidos para la incorporación de ADN bacteriano en el genoma de la célula vegetal. En primer lugar, el ADN a ser transferido, denominado “ADN de transferencia” (ADN-T). En segundo lugar, genes de virulencia (*vir*), que comprenden seis grupos de complementación, responsables de la transferencia del ADN-T. Y, por último, un grupo de genes cromosómicos que probablemente son importantes en la dinámica membrana-célula (Towers & Ellis, 1993). Sin embargo, existen otros factores que podrían afectar el éxito o fracaso de la transformación mediada por alguna de las dos sepas bacterianas, como: la edad de la planta, tipo de tejido a transformar, densidad y período de precultivo de la bacteria, tiempo y condiciones de inoculación del tejido con *Agrobacterium*, y presencia de necrosis en el tejido de la planta causada por *Agrobacterium*, entre otras (Ko *et al.*, 2003).

Independientemente del tipo de transformación que se utilice, se puede generar una planta completa y genéticamente estable, a partir de las células transformadas, esto se puede lograr con la manipulación de las células transformadas y con la ayuda de diferentes fitorreguladores, como: auxinas y citoquininas, dando como resultado, raíces o brotes (Henry *et al.*, 1994).

Existen pocos trabajos realizados de transformación de *Stevia rebaudiana*, donde se han utilizados los métodos de biobalística, agentes mutágenos (metanosulfonato de etilo MSE), radiación gama, *Agrobacterium tumefaciens* y *rhizogenes*.

Un ejemplo es el realizado por Jiménez-Brigada, (2018), quien transformó raíces de *S. rebaudiana*, por agrotransformación con la ayuda de *A. rhizogenes* (cepa K599), insertándole un plásmido binario pCAMsrDXS, que contiene una secuencia del gen DXS modificada. La infección se llevó a cabo por inmersión de los hipocótilos en una suspensión de *A. rhizogenes*, posteriormente fueron colocados en medio MS suplementado con sacarosa, vitaminas y sin reguladores de crecimiento; hasta la aparición de raíces pilosas. Transcurrido 17 días estas raíces regeneraron plántulas de manera espontánea.

En la Tabla 4, se resumen algunos trabajos en donde se han utilizados estos métodos, en *Stevia rebaudiana*.

Tabla 4. Transformación de *Stevia rebaudiana* utilizando diferentes métodos.

Método utilizado	Partes de la planta utilizadas	Cepas/Tipo de partícula	Órgano transformado	Referencia
Agrotransformación <i>A. rhizogenes</i>	Explantes de hojas y tallos	-----	Raíces	Kumari & Chandra, 2017.
Físico y químico	Explantes de hojas y tallos	Radiación gamma y metanosulfonato de etilo	Plántulas	Khan <i>et al.</i> , 2016.
Agrotransformación <i>A. rhizogenes</i>	Hojas y entrenudos	ATCC 15384 y LBA 9402	Raíces	Michalec-Warzecha <i>et al.</i> , 2016.
Biobalística	Meristemo apical	Partículas de oro	Plántulas	Mubarak <i>et al.</i> , 2015.
Agrotransformación <i>A. tumefaciens</i>	Segmentos nodales	EHA-105	Plántulas	Khan <i>et al.</i> , 2014.
Agrotransformación <i>A. rhizogenes</i>	Hojas, Segmentos nodales e inter-nodales	LBA 9402	Raíces	Singh, 2011.

2.15. Proteómica

En el pasado, la identificación de proteínas se realizaba mediante análisis de ARNm, pero más tarde se descubrió que no había una correlación con el contenido de proteínas ya que la expresión génica se regula después de la transcripción y la traducción del ARNm causa diferencias (Rogers *et al.*, 2008). La mayoría de las proteínas se modifican químicamente mediante modificaciones postraduccionales, principalmente a través de la adición de grupos carbohidratos y fosfatos. Tales modificaciones juegan un papel importante en la modulación de la función de muchas proteínas. Las modificaciones postraduccionales más comunes incluyen glucosilación, fosforilación, ubiquitinación, metilación, acetilación y lipidación (Dhingra *et al.*, 2005).

Actualmente, se cuenta con una herramienta más precisa para la identificación y análisis de las proteínas: la **proteómica** es una herramienta utilizada para el análisis de las proteínas expresadas en un sistema biológico en etapas de desarrollo específicas o para identificar cambios en el proteoma bajo diferentes condiciones ambientales. Este estudio permite identificar las proteínas y las funciones que cumplen en el organismo vivo, las cuales son responsables de la mayoría de los procesos biológicos. El análisis proteómico trata directamente con los cambios a gran escala en las proteínas (Tomanek, 2011; Liu *et al.*, 2016).

2.15.1. Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional es actualmente la tecnología central para estudiar las diferencias en los niveles de expresión de proteínas y sus modificaciones postraduccionales entre varias muestras biológicas, haciéndolo uno de los métodos más potentes para analizar el proteoma completo de células, líneas celulares, órganos y tejidos de plantas, además de poder realizar análisis proteómicos subcelular, incluso para la caracterización de la red de procesos celulares en un orgánulo particular, como mitocondrias, cloroplastos, núcleos y membranas plasmáticas (Canovas *et al.*, 2004; Joyard *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2011). Dicha técnica combina el isoelectroenfoque (IEF) con electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Los cuales se realizan implicando dos separaciones secuenciales de una muestra en direcciones perpendiculares. La dimensión IEF se ejecuta primero, en tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG), separando las proteínas dependiendo de su carga neta. Después, la tira se coloca sobre un gel de placa SDS-PAGE y se somete a electroforesis, separando así, en una segunda dimensión dependiendo de su peso molecular. Dado que estos dos métodos de separación dependen de propiedades independientes, este procedimiento puede resolver muestras biológicas complejas con un alto grado de especificidad y precisión. Las proteínas resueltas y las fracciones polipeptídicas pueden identificarse luego según lo indicado por sus ubicaciones en el gel 2-D, así como por su expresión diferencial en diferentes muestras, la proximidad a otros puntos, la intensidad, etc. El poder de la técnica 2-D radica principalmente en su capacidad

para separar simultáneamente miles de proteínas que se pueden visualizar por radiomarcaje metabólico o una variedad de métodos de tinción, para la posterior identificación y estudios de comparación cuantitativa (Rosengren *et al.*, 2003; Wittmann-Liebold *et al.*, 2006).

Tal enfoque proteómico típicamente requiere el análisis cuantitativo de numerosos geles para revelar la expresión diferencial de proteínas en diferentes plántulas. Como los experimentos resultan en grandes cantidades de datos, un uso eficiente de la técnica 2-D se basa en análisis de datos potentes y fáciles de usar por medio de algoritmos informáticos. Un análisis asistido por computadora estándar de geles 2-D incluye al menos los siguientes tres pasos básicos: (I) detección de manchas de proteínas, (II) cuantificación de puntos, y (III) adaptación de manchas de gel a gel. En la práctica, existen muchas fuentes de variaciones sistemáticas y aleatorias inherentes a los experimentos de 2-D, que afectan la eficacia de los algoritmos para hacer frente a la tarea de análisis (Rosengren *et al.*, 2003).

En el pasado reciente se han desarrollado varios paquetes de programas para facilitar el análisis rápido, preciso y objetivo de geles en 2-D (Appel *et al.*, 1997). Los enfoques iniciales de la proteómica computarizada se remontan a fines de la década de 1970, seguidos por una serie de publicaciones que describen los detalles técnicos de varios algoritmos informáticos. La mayoría de los sistemas informáticos originales han terminado en programas comerciales, incluidos Delta 2-D, GELLAB II, Melanie, Phoretix 2-D Advanced, Progenesis, AlphaMatch 2-D, Z3 y **PDQuest** (Rosengren *et al.*, 2003).

2.15.2. PDQuest

El programa PDQuest es un paquete de análisis de 2-D ampliamente utilizado en los estudios del proteoma de hoy en día. Se basa en el flujo de trabajo de análisis de gel estándar introducido ya en el sistema QUEST (Garrels, 1989). Genera y analiza imágenes para poder identificar proteínas en las bases de datos. Es uno de los

paquetes más antiguos con informes iniciales que datan de 1979. Se ha ido refinando continuamente a lo largo de los años. Una vez que se ha escaneado un gel, existen algoritmos avanzados para eliminar el ruido de fondo, los artefactos de gel y las rayas horizontales o verticales de la imagen. PDQuest utiliza una instalación de segmentación puntual para detectar y cuantificar puntos de proteína. Específicamente, la serie de pasos necesarios para la evaluación adecuada del gel se puede resumir de la siguiente manera: (I) adquisición de la imagen, (II) tamaño y orientación de la imagen, (III) detección automatizada de puntos, (IV) edición manual de los geles (V) coincidencia de perfiles de proteínas y (VI) análisis de datos.

- I) PDQuest puede adquirir imágenes de geles utilizando densitómetros, cámaras de imágenes de fósforo de almacenamiento y sistemas de imágenes basados en cámara. La imagen mostrada en PDQuest está lista para su análisis.
- II) En este paso, se ajusta el tamaño y la orientación de la imagen, para facilitar su análisis.
- III) Este paso es crucial para la ideal identificación de las manchas proteicas. Un asistente de detección de puntos te guía a través de este proceso. Primero se selecciona el punto más débil en el escaneo (esto establecerá los parámetros de sensibilidad y de valor máximo mínimo) y luego el punto más pequeño (esto establecerá el parámetro de escala de tamaño); después de eso, se selecciona el punto más grande en la imagen que uno quiere detectar. Una vez que se ha creado la imagen del gel (es decir, a cada píxel de un escaneo 2-D se le asigna originalmente un ID), el programa ayuda a realizar varios pasos, que consisten en suavizado inicial, sustracción del fondo y suavizado final (necesario para eliminar puntos en o cerca del nivel de fondo), ubicando puntos en la imagen del gel (es decir, ubicando el centro y la posición de cada punto reconocible), ajustando y cuantificando puntos (este paso se adapta a distribuciones gaussianas ideales para detectar

centros). Como producto final, se obtienen tres imágenes separadas: el escaneado 2-D en bruto original, que permanece inalterado; la imagen filtrada, que es una copia del escaneo original que se ha filtrado y procesado, y la imagen gaussiana, que es una imagen sintética que contiene los puntos gaussianos. En la Fig. 12, se muestra una representación de un escaneado 2D en bruto, una imagen filtrada, y una imagen gaussiana.

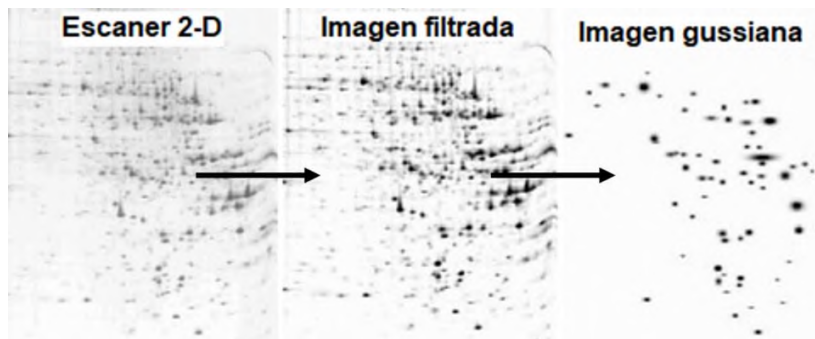


Fig. 12. Imágenes creadas durante la detección de manchas proteicas por el programa PDQuest.

- IV) Cuando se comparan geles en un conjunto de combinaciones, a menudo hay algunos puntos que dan falsos positivos, esto ser causada por varios factores, incluyendo errores de pipeteo durante la preparación y carga de la muestra, variaciones en la densidad de la muestra, inconsistencias en la tinción, etc. Para comparar con precisión las cantidades puntuales entre geles, se deben realizar una edición manual para compensar estas variaciones y poder realizar un análisis con mayor precisión.
- V) Los grupos de geles se pueden editar y combinar entre sí, para poder conocer la igualación de los puntos y comparar sus cantidades. Para hacer coincidir las mismas manchas de proteína entre diferentes geles se necesitan puntos de referencia. Los puntos de referencia son utilizados por PDQuest para alinear, posicionar y compensar ligeras diferencias y distorsiones en los geles de una sola muestra. Cómo se combinan las manchas de proteína de dos geles con PDQuest se muestra esquemáticamente en la Fig. 13.

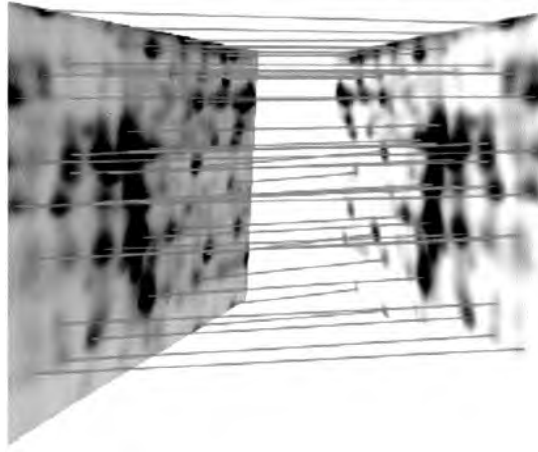


Fig. 13. Diagrama esquemático de cómo las manchas proteicas de dos geles se combinan con PDQuest (Tomado de Marengo *et al.*, 2005).

- VI) PDQuest proporciona una variedad de herramientas analíticas para determinar qué puntos tienen significado estadístico y científico. Puede normalizar las cantidades de puntos en diferentes geles para una comparación más precisa. Puede definir grupos duplicados en los geles. Puede crear grupos de puntos que sean cuantitativa, cualitativa y estadísticamente significativos utilizando conjuntos de análisis, y así tener un resultado más preciso. Cuando se complete su análisis, se pueden imprimir los datos experimentales o exportarlos a otro sistema para un análisis posterior.

2.15.3. Identificación y caracterización de las proteínas por el método de MALDI-TOF

El punto final de cualquier expresión proteómica es identificar y caracterizar las proteínas. La degradación de Edman fue el método estándar para la secuenciación de proteínas durante los últimos 25 años (Shively, 2000). Otros enfoques tradicionales para la identificación de proteínas incluyen el uso de anticuerpos para realizar transferencias Western blot. Sin embargo, este método tiene un uso restringido debido a la unión no específica de anticuerpos y la disponibilidad de anticuerpos contra todas las proteínas (Lin *et al.*, 2003).

En la actualidad, el desarrollo de métodos de espectrometría de masas para la identificación de proteínas ha ganado popularidad. Una de ellas es la espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS, por las siglas en inglés) (Patterson & Aebersold, 1995; Jurinke *et al.*, 2004; Zhou & Veenstra, 2008), que junto con el desarrollo de programas para la búsqueda en bases de datos de fragmentos proteolíticos de proteínas ha incrementado el uso de esta técnica para la identificación a gran escala de proteínas (Clauser *et al.*, 1999). La identificación de proteínas a través de MALDI-TOF MS se lleva a cabo en forma de análisis de péptidos producidos enzimática o químicamente. Hasta la fecha, uno de los métodos más comunes para identificar proteínas es a través de huellas dactilares peptídicas (Dhingra *et al.*, 2005). Esta es una de sus aplicaciones más útiles, en donde las proteínas que se han separado en geles de una o dos dimensiones se extirpan y se digieren con una enzima proteolítica, como la tripsina, para producir un conjunto de fragmentos trípticos únicos para cada proteína (Shevchenko *et al.*, 1996). Este procedimiento combina el muy alto poder de resolución de la electroforesis en gel con la sensibilidad de la espectrometría de masas. Los iones peptídicos detectados por espectrometría de masas MALDI-TOF son principalmente de carga única, posiblemente debido a la desprotonización por los iones de la matriz que se produce durante el proceso de ionización (Hale *et al.*, 2000; Karas *et al.*, 2000).

Los fundamentos de esta técnica consisten en que el espectrómetro de masas produce, separa y detecta iones en fase gaseosa (Abonnenc *et al.*, 2010). Los elementos principales que forman un espectrómetro de masas son tres: una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector. Los tres elementos se mantienen en una atmósfera de vacío (Jordana-Lluch *et al.*, 2012).

En la Fig. 14, se esquematizan los componentes de un espectrómetro de masas MALDI-TOF.

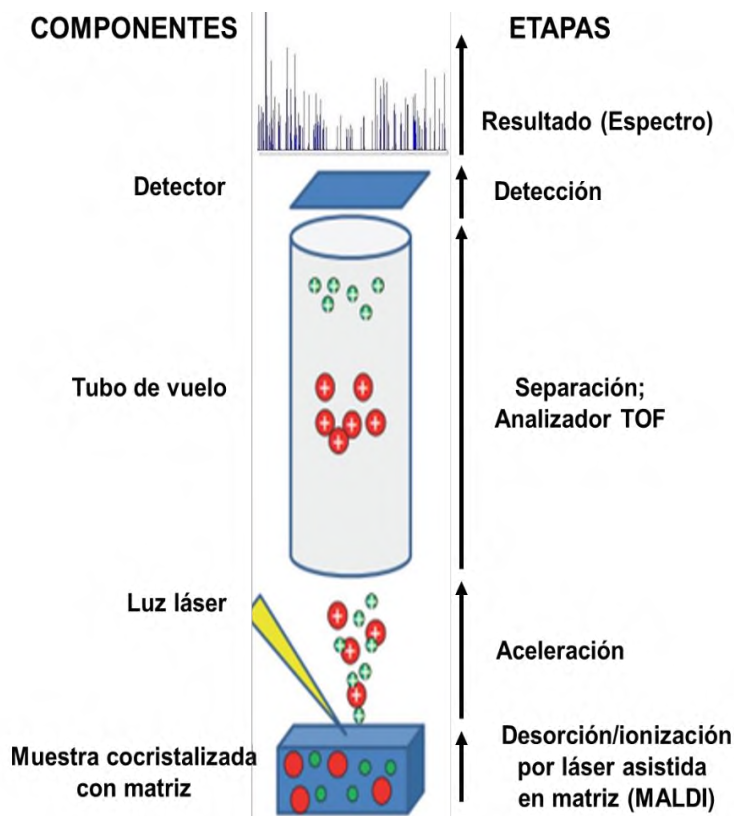


Fig. 14. Descripción de la técnica de desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (Modificada de Croxatto *et al.*, 2012).

El resultado de aplicar una fuente de ionización sobre una molécula es la formación de iones, generados por exceso o pérdida de electrones, por lo que dichas moléculas estarán cargadas eléctricamente (Lay & Holland, 2000). En el caso del MALDI, la muestra es embebida en una matriz orgánica, la cual se cristaliza en contacto con el aire. Esta mezcla se deposita en una tarjeta de un material conductor y es irradiada por un láser (generalmente a 337 nm). La energía del láser causa la desestructuración de la matriz cristalizada generando una nube de partículas. Los iones de dicha nube se extraen al ser sometidos a un campo eléctrico, a través del cual estos son acelerados debido a su carga. Los iones obtenidos son dirigidos hacia el analizador de masas y, posteriormente, al detector. El papel de la matriz es fundamental para los procesos electroquímicos que se producen. Generalmente se trata de sustancias orgánicas que absorben la energía del láser. Algunas de las matrices más utilizadas son el ácido α -ciano-4-hidroxi-trans cinámico, el ácido 2,5-dihidrobenzoico, o el ácido sinapínico (Krüger *et al.*, 2001; Jordana-Lluch *et al.*, 2012).

En cuanto al analizador de masas se trata del componente principal del espectrómetro. A pesar de existir diferentes analizadores, el más utilizado en las aplicaciones de la proteómica es el analizador de tipo TOF. La estructura delimita una zona de vuelo a través de la cual los iones son acelerados adquiriendo una elevada energía cinética, y durante este trayecto se separarán según su ratio masa/carga (m/z). La mayor parte de iones generados poseen una sola carga ($z = 1$), por lo que la ratio m/z equivale a m . El periodo de tiempo que tarda cada ion en llegar hasta el detector es denominado tiempo de vuelo y depende de dicha ratio (Lay & Holland, 2000; Abonnenc *et al.*, 2010).

Al final de la zona de vuelo los iones impactan en el detector. En muchos casos, antes del detector encontramos un cuarto elemento, el reflector, cuyo objetivo es compensar las velocidades cinéticas antes de que los iones impacten contra el detector. Con ello se obtiene un aumento en la resolución (Aebersold & Mann, 2003; Sauer & Kliem, 2010). A partir de la información recogida por el detector, se genera el espectro de masas en el cual se muestra la masa de los diferentes iones de la muestra calculada a partir del tiempo de vuelo. En el eje de las X del espectro de masas se representan los valores de la ratio m/z , mientras que en el eje de las Y se representa la intensidad, es decir, el número de iones de una determinada ratio m/z que ha impactado contra el detector. En el caso del MALDI-TOF, la ratio m/z es equivalente a la masa molecular (m) del analito, por lo que en el espectro típico de MALDI-TOF se observa un solo pico predominante, correspondiente a dicha masa (Jordana-Lluch *et al.*, 2012).

Muchos estudios proteómicos se han centrado directamente en los cloroplastos o las fracciones de cloroplastos, proporcionando una visión significativa del metabolismo de la clorofila, la fotosíntesis o la respuesta de los cloroplastos al estrés ambiental (Peltier *et al.*, 2001; Zolla *et al.*, 2002; Ferro *et al.*, 2003; Joyard *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2011). Chen *et al.*, (2007), analizaron las proteínas de la membrana tilacoide de una planta de arroz (*Oryza sativa* L.) transformada y silvestre, sugiriendo que la reducción de clorofila b afecta el complejo de recolección de luz I (LHC-I) más severamente que el LHC-II. Zhou *et al.*, (2015), identificaron dos patrones de color de botones florales en un melocotón ornamental (*Prunus persica* L.) y estudiaron la expresión diferencial de

proteínas, lo que proporcionó información importante sobre el mecanismo molecular de la coloración del pétalo floral. Por otro lado, Wang *et al.*, (2016), realizaron análisis transcriptómicos y proteómicos de una planta de té (*Camellia sinensis* L.) deficiente en clorofila y sugirió un enfoque complementario para comprender mejor los mecanismos responsables del fenotipo de la clorina. Por lo tanto, el análisis de la expresión diferencial de proteínas entre plantas transformadas y silvestres puede proporcionar nuevos conocimientos sobre el mecanismo regulador responsable de las rutas metabólicas de plantas transformadas.

Existen pocos antecedentes de análisis proteómico en *S. rebaudiana*, uno de ellos es el realizado por Karaköse, (2015), quien realizó un perfil proteómico de hojas de *S. rebaudiana* y encontró que 11 manchas proteicas se sobreexpresaban en dicha planta, y que la número 8 tenía una cobertura del 45% sobre la secuencia de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RuBisCO). Por otro lado, como antecedente del equipo de trabajo, Montes-Palmeros, (2017), analizó el perfil proteómico diferencial de plántulas *in vitro* silvestres de *S. rebaudiana*, bajo condiciones de estrés con MeJa, logrando que en las plántulas elicidadas se expresaron 34 proteínas diferentes, en comparación a las plántulas no elicidadas, de donde el análisis informático permitió sugerir que, 8 proteínas pudieran estar involucradas en la ruta de biosíntesis de GEs (1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa, 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa 2, 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa 1, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa, geranilgeranil pirofosfato sintasa, 2-4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol kinasa y UDP-glucosiltransferasa 85C2, 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa).

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas siempre han sido vitales para el hombre, supliendo necesidades básicas como alimento y medicina. Por esta razón se han estudiado desde hace años, demostrando que poseen actividad biológica que ayuda a la salud humana (Raskyn *et al.*, 2002). Actualmente la demanda de productos naturales con actividades biológicas ha ido en aumento, como lo son: los glucósidos de esteviol, fenoles y flavonoides que produce *Stevia rebaudiana*. En base a esto, se ha visto en la necesidad de utilizar nuevas técnicas biotecnológicas para aumentar la producción de dichos metabolitos, como es la transformación genética. En este trabajo se midieron los parámetros de crecimiento, producción de metabolitos secundarios y perfil proteómico en una línea de plántulas silvestres y la otra de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana* bajo condiciones *in vitro*, para poder conocer las diferencias que existen entre ambas líneas.

4. HIPÓTESIS

Las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana* serán diferentes fisiológicamente y con una mayor producción de glucósidos de esteviol en comparación a la silvestre.

Las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana* sobreexpresarán diferencialmente proteínas involucradas con la ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol en comparación con las plántulas silvestres.

5. OBJETIVOS

5.1. General

- Comparar los parámetros de crecimiento, producción de metabolitos secundarios y el perfil proteómico de cultivos *in vitro* de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y silvestres de *Stevia rebaudiana*.

5.2. Específicos

- Verificar la transformación genética de las plántulas presuntamente transformadas (pCAMsrDXS) de *S. rebaudiana*.
- Evaluar y comparar parámetros de crecimiento entre las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y silvestres de *S. rebaudiana*.
- Determinar el contenido de metabolitos secundarios como glucósidos de esteviol, fenoles y flavonoides totales, en plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *S. rebaudiana*.
- Analizar el perfil proteómico diferencial de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) vs silvestres de *S. rebaudiana*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado fue:

Plántulas silvestres de *S. rebaudiana*, establecidas por Montes-Palmeros, (2017), en el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Tuxtepec Oaxaca. Para el establecimiento del cultivo *in vitro* se utilizaron explantes foliares obtenidos de plantas de 2 meses de edad cultivadas en invernadero.

Plántulas transformadas (pCAMsrDXS) de *S. rebaudiana*, fueron establecidas por Jiménez-Brigada, (2018). La transformación genética se llevó a cabo por agrotransformación con la ayuda de *A. rhizogenes* (cepa K599), insertándole un plásmido binario pCAMsrDXS, que contiene una secuencia del gen DXS modificada (Ver anexo 1). Los explantes de hipocótilo se infectaron por inmersión en una suspensión de *A. rhizogenes*, posteriormente fueron colocados en medio MS 1/2 suplementado con sacarosa, vitaminas y sin reguladores de crecimiento, hasta la aparición de raíces pilosas. Después de 17 días las raíces presentaron generación espontánea de plántulas presuntamente transformadas (pCAMsrDXS), con hojas más grandes y tallo más grueso comparado con plántulas silvestres.

6.2. Micropropagación

Para la generación de los brotes silvestres y transformados de *S. rebaudiana*, se tomaron 10 explantes de hojas y se colocaron en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) a la mitad, suplementado con 20 g/L de sacarosa, y como fitorreguladores: 1 mg/L de bencil amino purina (BAP) y 0.5 mg/L de ácido indolacético (IAA). El pH del medio se ajustó con 1 M de hidróxido de sodio (NaOH) entre 5.8-6 y se solidificó con

8 g/L de agar. Posteriormente, el medio se hirvió en un horno de microondas (Daewoo KOR-6L7B) y se vació en frascos de vidrio con volúmenes de operación de aproximadamente 25 mL. Por último, los frascos con el medio se esterilizaron en una autoclave vertical (LabTech loading steam sterilizer LAC-S & LAC-P) a 121 °C por 15 min.

Una vez que ambos tipos de brotes alcanzaron un tamaño de entre 3-4 cm, se pasaron a medios diferentes para poder enraizar. Para los brotes silvestres se utilizó medio MS 1/2, suplementado con 20 g/L de sacarosa, 0.5 mg/L de ácido indolbutírico (IBA como fitorregulador) y solidificado con 8 g/L de agar. Para los brotes transformados se utilizó medio MS 1/2, suplementado con 20 g/L de sacarosa, sin fitorreguladores y solidificado con 2.2 g/L de fitagel.

Todos los cultivos se incubaron en fotoperiodo 16/8 de luz/oscuridad a 25 ± 2 °C, bajo una irradiación de $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y se realizaron micropropagaciones cada 25 días para el mantenimiento de ambas líneas (Jiménez-Brigada, 2018; Montes-Palmeros, 2017).

6.3. Verificación de la transformación genética

6.3.1. Extracción de ADN genómico

El método para verificar la transformación fue la reacción en cadena de la polimerasa, (PCR, por sus siglas en inglés), donde en primera instancia se realizó una extracción de ADN genómico (ADNg), la cual se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo descrito por Edwards *et al.*, (1991), con algunas modificaciones. Posteriormente, 200 mg de plántula se trituraron en un mortero estéril agregando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se le añadieron 500 μL de amortiguador de extracción (SDS 0.5%, NaCl 250 mM, Tris-HCl pH 8 1M, EDTA 0.5 M). El material vegetal se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL incubándolo por 30 minutos a 65 °C en una incubadora con agitación (Excella E24 incubator shaker), transcurrido ese tiempo se le agregaron 500

μL de cloroformo isoamílico (grado reactivo) en una proporción 24:1; toda la mezcla se homogenizo en un vortex (DAIGGER® Scientific Genie® 2 Laboratory Mixers) por 30 seg y se centrifugo a 13,300 rpm por 10 min a temperatura ambiente (Ta) (Microcentrífuga Thermo Scientific™ Heraeus™ Pico™ 17). Se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril y se añadió un volumen igual de isopropanol (grado reactivo), se mezcló por inversión y se incubo por 30 min a Ta, subsiguientemente, se centrifugo a 13,300 rpm por 15 min a Ta, se decantó el isopropanol y se agregaron 750 μL de etanol (grado reactivo) al 70%, luego se homogenizó en un vortex para posteriormente centrifugar a 13,300 rpm por 7 min. Se retiró el etanol y se dejó secando el exceso de etanol a Ta durante aproximadamente 2 h. La pastilla una vez que quedo libre de etanol, se resuspendió en 50 μL de agua desionizada estéril y se almaceno a 4 °C para su uso inmediato.

6.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa

El ADNg se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm en un NanoDrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000) y su pureza con respecto a proteínas fue calculada por la relación de absorbancia 260 / 280 nm, esto con la finalidad de que se haya extraído ADNg de buena calidad y pureza. Posteriormente, se amplificó un fragmento del promotor 35S (250 pb) presente en el ADN-T del vector binario, utilizando iniciadores de ADN diseñados por el grupo de trabajo con la siguiente secuencia: oligo directo (5'-gaactcgccgtaaagactgg-3') y oligo reverso (5'-agccaccttcttctttccact-3').

Se realizó la PCR en un termociclador (Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler 9901), donde las condiciones fueron las siguientes; primeramente, la desnaturalización fase 1, fue a 94 °C por 10 min, seguida de una segunda desnaturalización por 35 ciclos de 15 s a 94 °C. Para el alineamiento se realizó un gradiente de temperaturas a 60, 62, 64 y 66 °C por 15 seg; la primera fase de elongación fue a 72 °C por 15 seg, para terminar con la extensión final por 10 min a 72 °C. Se utilizó ADN plásmidico del vector binario y ADNg de plántulas no transformadas como control positivo y negativo, respectivamente.

Los componentes que se utilizaron en las mezclas de reacción para la PCR se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes de la PCR.

Kit Taq Master mix	Final []	20 µl reacción PCR
Master mix (5x)	5 x	4 µL
Cebadores directo y reverso (10 µM)	0.2 µM	1 µL
ADN	500 ng/µL	1 + 1 µL
Agua	---	13 µL
Total, Rx	---	20 µL

6.3.3. Análisis electroforéticos

Para revisar la integridad del ADN y evaluar el producto de PCR se realizaron geles de agarosa de 0.8 y 2% (p/v), respectivamente. Se utilizó un amortiguador de corrida TAE 1X, de carga azul de bromofenol y las muestras se corrieron a 80 Volts (fuente de poder PowerPac Universal Power Supply Bio-Rad) en una cámara electroforética horizontal Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) por 1 hora.

Para el revelado se utilizó una concentración de 0.5 µg/mL de bromuro de etidio por 5 min. El exceso de bromuro se retiró haciendo enjuagues con agua desionizada. Por último, se observó el gel en un fotodocumentador (Syngene InGenius LHR) acoplado a una computadora y por medio del programa (Genetools) se logró observar el gel exponiéndolo a luz media UV.

6.4. Comparación de los parámetros fisiológicos

Para realizar las comparaciones de los parámetros fisiológicos de ambas líneas, se tomaron muestras a los días 15, 20, 25, 30 y 35, después de enraizadas las plántulas. Los parámetros de crecimiento que se tomaron en cuenta fueron:

- Peso fresco (P_F) de las raíces y plántulas, el cual se obtuvo usando una balanza analítica (ADAM PW254).
- Biomasa (P_S) de las plántulas, donde las plántulas se liofilizaron hasta obtener el peso constante (Liofilizadora LABCONCO Cascade Benchtop Freeze Dry System).
- Porcentaje de humedad, se consiguió de la resta del P_F menos el P_S .
- Longitud de tallo, se calculó midiéndolo con una regla.
- Diámetro del tallo, se consiguió con la ayuda de un vernier digital (Stainless Hardened 6 Pul).
- Número de hojas y raíces, se logró cuantificando una por una manualmente.
- Área foliar. Se seccionaron las plántulas por zonas: parte baja, intermedia y meristemo apical, de donde se tomaron 10 hojas de la parte baja, 10 de la parte intermedia y 10 del meristemo apical. Las imágenes se procesaron en el programa ImageJ (bundled with Java 1.8.0_112), para así tener un número representativo de cada toma de muestra (Ver anexo 2 y 3).

6.5. Extracción y cuantificación de metabolitos secundarios

6.5.1. Extracción de glucósidos de esteviol

La extracción de GEs se realizó liofilizando las muestras de parte aérea de las plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *S. rebaudiana* hasta alcanzar su peso constante, posteriormente se les adicionó una mezcla de acetonitrilo-agua al 30% (v/v), seguido de un pretratamiento de sonicación por 30 min a Ta (ULTRASONIC CLEANER SB-3200DTN). Durante la extracción se conservó una proporción biomasa-solvente del 20% (p/v). El extracto obtenido se centrifugo a 14,000 rpm por 10 min (Centrifuga Universal 320 R, Hettich Lab Technology) y el sobrenadante se colocó en tubos limpios y se guardó en refrigeración hasta su posterior uso.

6.5.2. Extracción de fenoles y flavonoides totales

Para la extracción de fenoles y flavonoides se liofilizaron las muestras (parte aérea) hasta obtener su peso constante. Posteriormente, se maceraron con etanol al 80% (v/v), por 24 h. Durante la extracción se mantuvo una proporción biomasa-solvente del 10% (p/v). Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min (Centrifuga Universal 320 R, Hettich Lab Technology), el sobrenadante se recuperó en viales limpios y se llevaron a sequedad en un horno de vacío (SHEL LAB 1408) a 60 °C, hasta alcanzar el peso constante, y una vez obtenidos los extractos se guardaron en refrigeración hasta su análisis.

6.5.3. Cromatografía en capa fina

La detección de los metabolitos secundarios se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), utilizando diferentes estándares y fases móviles. Los extractos obtenidos se resuspendieron en 100 µL de etanol. Posteriormente, se aplicaron 5 µL en la placa de cromatografía (sílica gel 60 F₂₅₄). Para los GEs se utilizaron como estándares el Est (S3572 Sigma-Aldrich) y Reb A (1432 Sigma-Aldrich), utilizando una fase móvil que consistió en acetato de etilo: etanol: acetona: H₂O (15: 3: 6: 6, v/v/v/v) (Londhe & Nanaware, 2013). Las placas se revelaron con una solución de orcinol al 0.5%, el cual se preparará en metanol: ácido sulfúrico (95: 5, v/v), posteriormente se calentaron ligeramente en una plancha de calentamiento (Witeg WiseStir MSH-20A) hasta observar las bandas correspondientes a los GEs (Reis *et al.*, 2011).

Para la detección de los fenoles y flavonoides se utilizaron como estándares ácido gálico, clorogénico, ferúlico, 4-(hidroximetil) benzoico, 2 y 3 hidroxicinámico y catequina. Para la separación de las muestras se probaron dos fases móviles que consistieron en (S1): acetato de etilo: metanol: H₂O (100: 13.5: 10 v/v/v) y (S3): acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: H₂O (100: 11: 11: 26 v/v/v/v). Las placas obtenidas de las diferentes fases se revelaron con cloruro férrico al 1%.

La identificación de GEs, fenoles y flavonoides se realizó por comparación con los estándares empleados y su factor de retención (Rf). Para determinar el Rf se utilizó la siguiente ecuación:

$$Rf = \frac{Lc}{Ls}$$

Donde:

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

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

6.5.4. Cuantificación de glucósidos de esteviol

La determinación de Est y Reb A se realizó mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC-DAD, por sus siglas en ingles), el cual es un sistema cromatográfico equipado con bomba cuaternaria, desgasificador, automuestreador, horno de columna y acoplado a un detector de arreglo de diodos (ACQUITY Arc™ System Waters), siguiendo las indicaciones reportadas por Tada *et al.*, (2013). Los extractos se resuspendieron en una mezcla de 500 µL acetonitrilo: H₂O (70:30) y se sonicaron por 5 min a 35 W (ULTRASONIC CLEANER SB-3200DTN), posteriormente, las muestras se filtraron con acrodiscos de nylon de 0.45 µm (Acrodisc® Syringe Filters with Nylon Membrane) y se colocaron en viales de 2 mL. Se inyectaron 10 µL del extracto en una columna C-18 fase reversa (Luna 5 µm C18 (2) 100 Å, 250 x 4.6 mm), donde la elución se llevó a cabo con una mezcla de acetonitrilo: H₂O (32: 68) y 10 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 2.6), con un flujo isocrático de 1 mL/min a 40 °C y un tiempo de corrida de 10 min. La identificación de los GEs se llevó a cabo comparando el espectro de absorción UV a 210 nm y el tiempo de retención (TR) de los estándares, Est (S3572 Sigma-Aldrich) y Reb A (1432 Sigma-Aldrich).

Por otro lado, la concentración de los GEs se calculó en base a las curvas de calibración de los estándares, las cuales se realizaron por triplicado con concentraciones de 25, 50, 100, 250, 350 y 500 µg/mL (Ver anexo 4).

6.5.5. Cuantificación de fenoles totales

Para determinar el contenido de fenoles totales (FT) se siguió la metodología descrita por López-Laredo *et al.*, (2009). Los extractos se resuspendieron en etanol: H₂O (80:20 v/v) teniendo una concentración final de 50 mg/mL. La mezcla de reacción (Rx) consistió en 100 µL de extracto, 0.1 mL de Folin-Ciocalteu al 1 N (F9252 Sigma-Aldrich) y 500 µL de carbonato de sodio al 20% (Na₂CO₃ / 230952 Sigma-Aldrich). La mezcla de Rx se incubó por 30 min a Ta y la absorbancia se leyó a 760 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS Optizen pop). Se incluyó un blanco de Rx para considerar la absorbancia de los reactivos y un blanco de los extractos para considerar la absorbancia propia de cada extracto. Se realizó una curva de calibración, utilizando una solución madre de ácido gálico (C1251 Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.650 mg/mL (Ver anexo 5) y la concentración de FT, se expresó en miligramos equivalentes de ácido gálico por miligramos de extracto (mg_{EAG}/mg_{Ext}). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

6.5.6. Identificación de fenoles por UHPLC-DAD

La identificación de los fenoles se realizó por UHPLC-DAD. Los análisis cromatográficos se realizaron de acuerdo con la metodología descrita por Ferreres *et al.*, (2011), con algunas modificaciones. La separación se llevó a cabo en una columna luna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Phenomenex). La fase móvil consistió en dos solventes: ácido acético al 1% (A) y metanol (B), iniciando con 20% B y usando un gradiente hasta obtener 50% a los 18 min, 80% a los 19 min y 20% a los 20 min. Se utilizó un flujo de 0.21 mL/min con una temperatura de 40 °C y un volumen de inyección de 10 µL. Los análisis UHPLC-DAD se llevaron a cabo en un equipo

cromatográfico equipado con bomba cuaternaria, desgasificador, automuestreador, horno de columna y acoplado a un detector de arreglo de diodos (ACQUITY Arc™ System Waters). El sistema UHPLC-DAD fue controlado por el programa Empower 3 (Waters). La identificación de los fenoles se llevó a cabo comparando el espectro de absorción UV a 340 nm y TR de los estándares: ácido protocatecuico, 4-(hidroximetil) benzoico, clorogénico, 2 hidroxicinámico, siríngico, ferúlico, 3 hidroxicinámico y cinámico.

6.5.7. Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se evaluó de acuerdo con la metodología descrita por Dewanto *et al.*, 2002. Los extractos fueron resuspendidos en etanol: H₂O (80: 20 v/v) consiguiendo una concentración final de 50 mg/mL. La mezcla de reacción consistió en 125 µL de extracto, 375 µL de etanol al 95%, 25 µL de cloruro de aluminio al 10% (AlCl₃ / 237078 Sigma-Aldrich), 25 µL de acetato de potasio a 1 M (CH₃CO₂K / P3542 Sigma-Aldrich) y 700 µL de H₂O. La mezcla se incubó por 30 min en oscuridad en una estufa de cultivo (DHP9162) y la absorbancia fue leída a 415 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS Optizen pop). Se utilizó un blanco de Rx y un blanco de extracto para considerar la absorbancia propia de cada extracto analizado.

Se realizó una curva de calibración, utilizando una solución madre de rutina (78095 Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.5 mg/mL (Ver anexo 6). Las concentraciones de flavonoides se expresaron en miligramos equivalentes de rutina por miligramo de extracto (mg_{RE}/mg_{Ext}). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

6.6. Extracción y cuantificación de clorofilas y carotenoides

La extracción y cuantificación de clorofilas A, B, clorofilas totales y carotenoides, se realizó de acuerdo con el método descrito por Lichtenthaler & Wellburn, (1983), que consistió en triturar en nitrógeno líquido 200 mg de tejido fresco y homogenizar con 3

mL de etanol al 96% (v/v), posteriormente la mezcla se sonicó durante 10 min a Ta (ULTRASONIC CLEANER SB-3200DTN), protegiéndola de la luz y se centrifugó durante 10 min a 4,000 rpm (Centrifuga Universal 320 R, Hettich Lab Technology). Posteriormente, el sobrenadante se aforó a 5 mL con etanol al 96% (v/v) y se leyó la absorbancia a 665 (clorofila A), 649 (clorofila B), 652 (clorofilas totales) y 470 (carotenoides) nm en un espectro (UV/VIS Optizen pop).

La concentración (mg L^{-1}) de las clorofilas A, B, A+B y carotenoides se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila A} = 13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{649}$$

$$\text{Clorofila B} = 24.96 \times A_{649} - 7.32 \times A_{665}$$

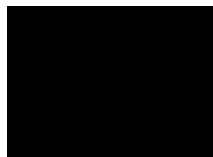
$$\text{Clorofilas totales} = \text{A+B} = 27.8 \times A_{652}$$

$$\text{Carotenoides} = 1000 \times A_{470} - 2.05 \times \text{CA} - 114.8 \times \text{CB} / 245$$

Donde:

A = la absorbancia a la longitud de onda indicada.

La concentración también se calculó en mg/g de peso fresco con la siguiente ecuación:



Donde:

C = Concentración (mg L^{-1}).

V = Volumen aforado (mL).

P = Peso de la muestra (g).

6.7. Proteómica diferencial

6.7.1. Extracción de proteína total soluble

La extracción de proteína se realizó por el método de TRI reagent, donde se partió de 50 mg de muestra previamente liofilizada, se le adicionó 1 mL de TRI reagent (93289 Sigma-aldrich); la mezcla se incubó por 10 min a Ta para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 g por 10 min (Centrifuga Labnet Spectrafuge™ 24D Digital), la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionaron 0.2 mL de cloroformo (grado HPLC) por cada mL de TRI reagent utilizado para la homogenización. Se mezcló en un vortex durante 20 seg (Vortex Labnet S0200 VX-200 Mixer) y se centrifugó a 12,000 g por 15 min. Se eliminó la fase acuosa y se le añadieron 0.3 mL de etanol (grado reactivo) al 100%, se mezcló por inversión brevemente y se incubó por 3 min a Ta. En seguida, se centrifugó a 2,000 g por 5 min, al sobrenadante se le añadieron 1.5 mL de isopropanol (grado reactivo) por mL de reactivo de TRI reagent, incubándolo por 10 min a Ta y se centrifugó a 12,000 g por 15 min; el sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó 3 veces con etanol al 100%, después la muestra se mezcló en el vortex y se centrifugó a 7,500 g por 5 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla se dejó secar durante 3 h, aproximadamente. Finalmente, se resuspendieron las pastillas en 20 µL de amortiguador de rehidratación del Kit Ready Prep™ 2-D, añadiéndole 2 M de tiourea. Una vez resuspendidas las pastillas, algunas muestras se pasaron por columnas Micro Bio-Spin® Bio-Gel® P-30 (Bio-Rad) con la finalidad de limpiarlas de pequeñas moléculas, sales u otros compuestos que pudieran interferir con la cuantificación, evitado así, una sobreestimación de la concentración de las proteínas.

6.7.2. Cuantificación de proteína total soluble

La cuantificación de la proteína total soluble se realizó siguiendo el protocolo 2-D Quant Kit - (GE Healthcare Life Sciences). Se tomaron 7 µL de extracto y se le agregaron 500 µL de precipitante; se mezcló en un vortex (Vortex Labnet S0200 VX-

200 Mixer) y se incubó por 2-3 min en hielo. Transcurrido ese tiempo, se le adicionó 500 μ L de co-precipitante, se mezcló en vortex y se centrifugó a 10,000 g por 5 min (Centrifuga Labnet Spectrafuge™ 24D Digital). Se decantó el sobrenadante y se volvió a centrifugar para poder retirar todo el líquido. Seguido de esto, se le agregaron 100 μ L de solución de cobre y 400 μ L de agua desionizada estéril, mezclándolo en un vortex hasta disolver la pastilla. Finalmente, se le agregó 1 mL de solución de trabajo (compuesta por reactivo A y B, 100: 1, respectivamente), y se mezcló por inversión. La mezcla se dejó incubar por 15-20 min y la absorbancia fue leída a 480 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 10-vis 355900P).

Se realizó una curva de calibración, utilizando una solución madre de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 2 mg/mL (Ver anexo 7). La concentración de proteína se expresó en μ g de proteína/ μ L de extracto. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

6.7.3. Análisis bidimensional de las proteínas

La electroforesis bidimensional consta de la separación de las proteínas en una dimensión en base a su punto isoeléctrico (pI) por isoelectroenfoque (IEF) y en una segunda dimensión en base a su peso molecular (PM) en electroforesis SDS-PAGE (O'Farell, 1975). Una vez determinada la concentración de proteína, se toma una cantidad de extracto adecuada para el análisis por electroforesis bidimensional. Se realiza el IEF, se equilibran las tiras y se corren en geles SDS-PAGE al 12% para una segunda dimensión.

6.7.4. Isoelectroenfoque

El IEF permitió la separación de las proteínas con base en su carga neta. Se utilizó el equipo PROTEAN® i12™ IEF System (Bio-Rad) y tiras de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 4-7 y de 3-10, de 7 cm (SERVA). Se llevó a

cabo una rehidratación pasiva por 12 h a una temperatura de 20 °C, donde se colocaron las muestras de proteína (169 µg, en 125 µL de amortiguador de rehidratación) en cada sarcófago; enseguida se colocaron las tiras IPG en contacto con la muestra evitando la formación de burbujas para no realizar una mala separación y, posteriormente, se adicionaron 2 mL de aceite mineral (163-2129 Bio-Rad) para evitar la evaporación de la muestra y cristalización de la urea. Para el isoelectroenfoque de las proteínas se utilizó el programa 1 (Tabla 6). Todo el IEF se realizó a una temperatura de 20 °C debido, a que a temperaturas mayores de 37 °C pueden producir la carbamilación de las proteínas y, por otro lado, temperaturas menores a 10 °C pueden ocasionar la cristalización de la urea. El paso de primera a segunda dimensión involucra dos etapas, la reducción y la alquilación de los grupos sulfhídricos. Las IPG se equilibraron adicionando 2 mL de amortiguador de equilibrio I (6 M urea, SDS 2%, amortiguador Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, glicerol 20% y DTT 2%) durante 20 min en agitación, para reducir los grupos sulfhídricos. Posteriormente, se decantó y se adiciono el amortiguador de equilibrio II compuesto de urea 6 M, SDS 2%, amortiguador Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, glicerol 20% e iodoacetamida 2.5%, para alquilar los grupos sulfhídricos. Se agitaron las tiras durante 15 min y posteriormente se enjuagaron en amortiguador de corrida para realizar la segunda dimensión.

Tabla 6. Condiciones de operación del isoelectroenfoque.

Programa			
Paso 1	Voltios constantes	150 V	1 h
Paso 1	Voltios constantes	300 V	1 h
Paso 3	Gradiente de voltios	1000 V	2 h
Paso 4	Gradiente de voltios	3000 / 6000 V	2 h
Paso 5	Voltios constantes	3000 / 6000 V	1 h
Duración Vh / Tiempo total		~10 Vh	7 h

6.7.5. Separación de las proteínas en segunda dimensión

Una vez equilibradas las tiras IPG, fueron colocadas en geles SDS-PAGE para una segunda dimensión, en los cuales las proteínas se separarán por su masa molecular de forma perpendicular a la primera dimensión. El análisis electroforético se realizó en una cámara vertical Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad), en geles SDS-PAGE al 12% (Laemmli, 1970) a Ta. Se corrieron por 45 min a 200 A, en amortiguador de corrida 1X (25 mM Tris pH 8.8; 192 mM glicina; SDS 0.1%). Una vez finalizada la corrida, los geles fueron teñidos con azul de coomassie (QC Colloidal Coomassie Stain #1610803) según las instrucciones del fabricante.

6.7.6. Análisis de los geles 2-D SDS-PAGE

El análisis en gel bidimensional fue realizado por el programa PDQuest™ (Bio-Rad), versión 8.0. Los geles se documentaron mediante un densitómetro GS-900™ (Bio-Rad). Una vez obtenidas las imágenes, se creó una carpeta en el programa para el experimento analizado. Se seleccionaron 3 imágenes de los geles por cada muestra, silvestre y transformada (pCAMsrDXS), posteriormente, se editaron las imágenes para así eliminar los bordes donde se podrían dar falsos positivos. Los parámetros de análisis fueron los siguientes: (I) se seleccionó el punto más tenue dentro del gel (esto estableció los parámetros de sensibilidad y de valor máximo mínimo), (II) luego el punto más pequeño (esto estableció el parámetro de escala de tamaño), y después de eso, (III) se selecciona el punto más grande en la imagen. Cuando se obtuvieron las imágenes de los geles con las marcas de las manchas proteicas, se realizó una edición manual, ya que el programa dio algunos falsos positivos (en las manchas del marcador del PM, en las orillas y esquinas de los geles). Finalmente, se insertaron los parámetros del PM y el pl.

Las manchas proteicas resueltas se identificaron en las bases de datos www.uniprot.org y www.ncbi.nlm.nih.gov, así como, www.bioinformatics.org y www.isoelectric.org, según su PM y pl indicado por su ubicación dentro del gel. Para tener un resultado más exacto se cuidó que el PM teórico / experimental fuera igual o ± 5 kDa y que el pl fuera igual o ± 0.05 pH.

6.7.7. Preparación de las proteínas para su análisis por MALDI-TOF

Para el análisis de las proteínas por la técnica de MALDI-TOF, primero se extrajeron las manchas proteicas que se sobreexpresaban en los geles de ambas plántulas (silvestres y transformadas pCAMsrDXS) y se colocaron en un tubo eppendorf de 2 mL. Después, se destiñeron añadiéndole 1 mL de solución para desteñir (acetonitrilo al 50% en bicarbonato de amonio 2.5 mM), lo cual se realizó dos veces durante 2 h. Una vez que el gel se volvió transparentes, se deshidrataron con 1 mL de acetonitrilo puro (2 veces por 10 min). Posteriormente, se redujeron y alquilaron las proteínas, adicionando 30 μ L de ditiotreitól (DTT) 15 mM (2.3 mg en 1 mL de amonio a 50 mM) e incubándolas durante 45 min a 56 °C. Trascorrido ese tiempo se eliminó el sobrenadante, y se agregaron 30 μ L de iodoacetamida (100 mM) e incubándolas por media hora a Ta. Pasado ese tiempo se extrajo y desechó el sobrenadante. Luego, se le adicionaron 100 μ L de acetonitrilo con el objetivo de deshidratar el gel (5 min a Ta); este último paso se realizó dos veces, hasta que el gel se observara opaco y de un menor tamaño. Una vez que el gel estuviera totalmente deshidratado, se prosiguió a la realizar la digestión proteica; se le agregaron 10 μ L de una solución de tripsina a cada muestra (20 μ g de tripsina disuelta con 100 μ L de HCl 1 mM y 150 μ L de amonio 5 mM), y se dejaron reposar en hielo por 30 min. Se eliminó el sobrenadante y se le añadieron 15 μ L de bicarbonato de amonio 5 mM, finalmente las muestras se dejaron incubando durante toda la noche a 37 °C.

Para la extracción de las proteínas del gel, se le adicionó 30 μ L de bicarbonato de amonio 5 mM, se vortexeo por 1 min (Vortex Labnet S0200 VX-200 Mixer) y se incubaron durante 10 min a Ta. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 3,000 g durante 30 seg (Centrifuga Labnet Spectrafuge™ 24D Digital), se colectó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo, subsiguientemente, se le agregaron 30 μ L de amortiguador de extracción (10 mL de acetonitrilo, 5 mL de H₂O y 1 mL de ácido fórmico), se vortexeo por 1 min y se incubaron durante 10 min a Ta. Después, se centrifugaron las muestras a 3,000 g durante 30 seg y el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, este paso se realizó dos veces. Para desalar las proteínas, las muestras

se pasaron por puntas ZipTip® Pipette Tips (Millipore C18 Zip tip), las cuales se prepararon pasando en primera instancia 20 µL de acetonitrilo, después se pasaron dos veces 20 µL de amortiguador A (0.1% ácido trifluoroacético, TFA), y, por último, se pasaron 10 µL de extracto. Para poder recuperar todos los péptidos se pasó un volumen de 40 µL del amortiguador A y finalmente para eluir las muestras se pasaron 20 µL de amortiguador B (50% de acetonitrilo: 50% de H₂O: 0.1% de TFA) y se colocaron en placas Biotaper para su análisis en MALDI-TOF.

6.7.8. Análisis por MALDI-TOF

Para la identificación de proteínas se realizó el análisis de huella peptídica y de espectros de fragmentación de péptidos (MALDI-fingerprinting-MS/MS). Se analizaron las proteínas que se sobreexpresaban diferencialmente en ambas muestras (silvestres y transformadas pCAMsrDXS). Los datos se examinaron utilizando BioTools 3.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) en combinación con el algoritmo de búsqueda Mascot (versión 2.6.2.1) contra la base de datos de plantas verdes (*Viridiplantae*).

Los espectros MALDI-TOF/TOF se adquirieron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF Autoflex II (Bruker Daltonics) equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm. El instrumento se operó en el modo reflector: fuente, 19.00 kV, lente, 8.95 kV, reflector, 20 kV, y usando un tiempo de retardo de extracción de iones optimizado de 80 ns. La frecuencia del láser se estableció en 25 Hz con 50 disparos láser por adquisición y la resistencia del láser se mantuvo aproximadamente a un 50% por encima del umbral para obtener una relación señal/ruido óptima. Los espectros se obtuvieron sumando, en promedio, 500 disparos de láser, y se adquirieron en el rango de masa de 300-7500. El instrumento se calibró externamente en el modo de calibración cuadrática mejorada antes de la adquisición, usando una muestra de mezcla de sintonización de péptidos (Bruker Daltonics).

Para tener una mayor certeza de que las proteínas identificadas fueran las correctas, se buscó que:

- El PM y pl fueran lo más parecido posible.
- El número de péptidos fuera mayor o igual a 2.
- El porcentaje de cobertura fuera mayor a 5%.
- Identidad del 100%.

6.8. Análisis estadístico

Los análisis de varianza para todos los factores evaluados se realizaron aplicando el modelo lineal general y subsecuentes pruebas de comparación múltiple de medias de Tukey, con 95% de confianza para ambos análisis; en el programa Minitab 16.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Mantenimiento y subcultivo de *Stevia rebaudiana*

7.1.1. Inducción de brotes

Para la generación de brotes silvestres de *S. rebaudiana*, se partió de explantes de hojas de plántulas *in vitro* establecidas por Montes-Palmeros, (2017). En la Fig. 15 A, se muestran los brotes generados en medio MS ½ (20 g/L de sacarosa, 1 g/L de BAP y 0.5 g/L de IAA). Donde, después de los 20 días de cultivo se observó la respuesta máxima de producción, generando ~8 brotes por cada explante, dando un total aproximado de 80 brotes de 3-4 cm.

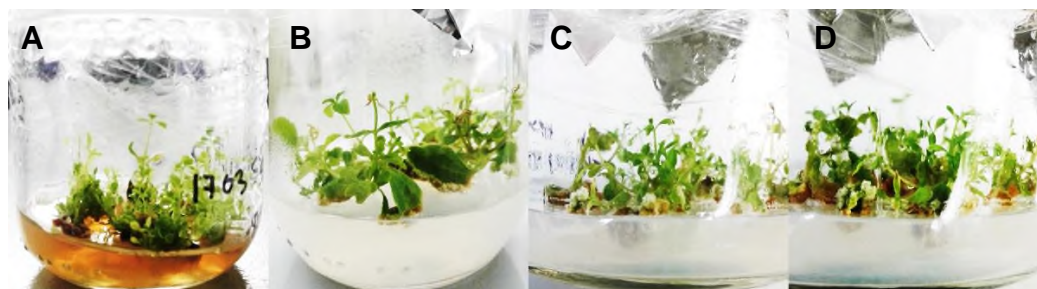


Fig. 15. Brotes de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana* con 20 días de cultivo. A: silvestres, B: transformados con fitorreguladores, C: transformados con la mitad de la concentración de los fitorreguladores y D: transformados sin fitorreguladores.

Anbazhagan *et al.*, (2010), observaron una mayor inducción de brotes (16 por explante) con la misma combinación y concentración de fitorreguladores (BAP 1 mg/L + IAA 0.5 mg/L), utilizando ápices del tallo como explantes. Por otro lado, Sivaram & Mukundan, (2003), reportaron que con la combinación de 1 mg/L de BAP + 0.65 mg/L de IAA, tenían como resultado el mayor número de brotes generados a partir de ápices del tallo (11 por explante). Así mismo, Laribi *et al.*, (2012), reportaron que con la combinación de 1 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de IBA, obtuvieron la mayor producción de brotes por explante nodal (2 por explante). De la misma forma, Debnath, (2008), descubrió que se estaban desarrollando múltiples brotes desde el ápice del tallo

cuando se cultivaron con 2 mg/L de BAP y 1.13 mg/L de IAA, dando como resultado alrededor de 39 brotes en total. Finalmente, Mitra & Pal, (2007), reportaron que una concentración de 10 mg/L de kinetina (KIN) + 1 mg/L de IAA, resultó en la mayor producción de brotes (10 por explante), utilizando explantes nodales.

Por lo tanto, nuestros resultados mostraron que una mayor concentración de citoquininas en combinación con una baja concentración de auxinas resultó ser la más efectiva para la producción de brotes, al igual que lo reportado por diferentes autores; esto se debe a que un balance alto de citoquininas en el medio ayuda a la división celular y promueve la proliferación y el desarrollo de brotes a partir de diferentes explantes (Mok & Mok, 2001). Por otro lado, las diferencias que existen en el número de los brotes, entre los explantes de hojas, nodales o de ápice del tallo, se debe a la naturaleza juvenil y meristemática de cada explante (Hussain *et al.*, 2005), y se sugiere que también se deba al tiempo de cultivo.

Para la generación de los brotes transformados se probaron tres condiciones: 1: la misma concentración de fitorreguladores utilizados para los brotes silvestres, 2: la mitad de los fitorreguladores utilizados y por último 3: sin fitorreguladores. Partiendo de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) establecidas por Jiménez-Brigada, (2018), se observó, que en cualquiera de las tres condiciones se generaban aproximadamente 50 brotes de 4-5 cm.

Los explantes de las plántulas silvestres lograron regenerar ~80 brotes en 20 días de cultivo, sin embargo, en comparación con los brotes transformados, éstos eran más pequeños, de tallo más delgado y de hojas angostas (Fig. 15 B, C y D). Por otro lado, Khan *et al.*, (2014), reportaron que para generar brotes transformados mediante agrotransformación (cepa EHA105 de *A. tumefaciens* que alberga el promotor constitutivo pCAMBIA-1304-CaMV35S), era necesaria la adición de 0.5 mg/L de ácido α -naftalén acético (NAA). Así mismo, Khan *et al.*, (2016), requirieron una concentración mínima de 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de NAA, para poder generar brotes transformados (Transformación física - radiación gamma y química - MSE). Finalmente, Mubarak *et*

al., (2015), reportaron que para la obtención de brotes transformados (pCGP1258, biobalística), se requería una concentración mínima de 0.5 mg/L de IBA.

Nuestros resultados mostraron que las plántulas de *S. rebaudiana* transformadas por *A. rhizogenes*, con la inserción del plásmido pCAMsrDXS, fueron más efectivas comparadas con las plántulas transformadas por otro método (Transformación física, química o biobalística), al no necesitar de fitorreguladores para la generación de brotes. Esto se puede deber a que la inserción del plásmido con el gen DXS conlleva a una mayor producción de fitohormonas como ABA y giberelinas, las cuales están implicadas en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

7.1.2. Inducción de raíces y obtención de plántulas

Una vez que los brotes silvestres y transformados alcanzaron un tamaño adecuado (5 cm), se tomaron y se colocaron en medio de enraizamiento (Sección 6.2).

Las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) comenzaron a generar raíces a partir del día 8 y sin la necesidad de fitorreguladores (Fig. 16 A y B), dando un total de 17 ± 0.71 raíces por plántula a los 35 días, siendo mejores que las plántulas silvestres, quienes comenzaron su generación de raíces hasta el día 15, con un total de 15.5 ± 0.35 raíces (Fig. 16 C). Por otro lado, las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) se veían más grandes, de tallo más grueso, mayor número de hojas y más verdes (Fig. 17 A y B).

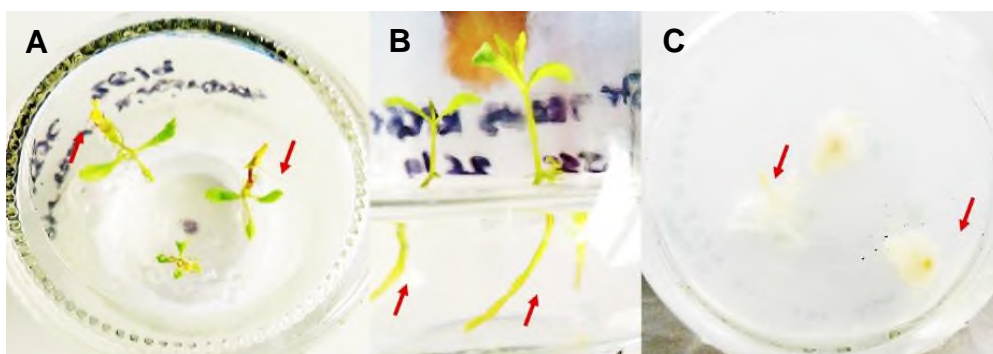


Fig. 16. Generación de raíces en plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*. A/B: plántulas transformadas (pCAMsrDXS) de 8 días y **C:** plántulas silvestres de 15 días.

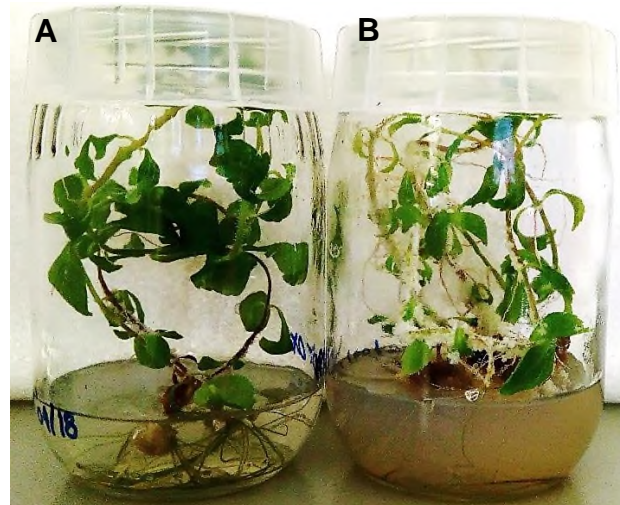


Fig. 17. Plántulas *in vitro* de *Stevia rebaudiana*. A: transformadas (pCAMsrDXS) y B: silvestres, a los 30 días de cultivo.

Resultados similares en plántulas silvestres de *S. rebaudiana*, fueron reportados por Preethi *et al.*, (2011), quienes utilizaron la misma concentración de IBA (0.5 mg/L), alcanzando la mejor respuesta de enraizamiento (27 ± 0.57). Por otro lado, Rafiq *et al.*, (2007), reportaron que una concentración de 0.5 mg/L de IAA, causó la formación máxima de raíces (6.2 ± 0.02). Así mismo, Zavoya *et al.*, (2013), consiguieron la mayor producción de raíces (4 ± 0.42) añadiendo 0.1 mg/L de IBA al medio de cultivo. En contraste, Nower, (2014), observó que una concentración de 0.2 mg/L de IAA, dio lugar al número máximo de raíces (10.33 ± 0.23). Por último, Razak *et al.*, (2014); obtuvieron la mayor inducción de raíces (30.12 ± 0.61) con la adición de 1 mg/L de IBA.

Ya que las auxinas influyen tanto la división, como el crecimiento y diferenciación celular, están involucradas en muchos procesos del desarrollo, uno de ellos es la generación de raíces, por lo tanto, IBA e IAA, resultaron ser las mejores auxinas para la generación de raíces en este trabajo y en los ya reportados de *S. rebaudiana*.

La obtención de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y la generación de raíces (17 ± 0.71) se logró sin ningún tipo de fitorregulador, siendo más eficaz en comparación a lo reportado por otros autores, como: Khan *et al.*, (2014, 2016), los cuales utilizaron una concentración de 0.5 mg/L de NAA para generar raíces. Del mismo modo,

Mubarak *et al.*, (2015), utilizaron una concentración de 0.5 mg/L de IBA para la generación de raíces.

Particularmente, en el caso de regeneración de plantas completas a partir de raíces transformadas, se ha reportado que la integración del ADN-T, presente en los plásmidos silvestres inductores de raíces (Ri) y en vectores binarios de expresión, favorece la correcta diferenciación celular (David *et al.*, 1984); a menudo sin la necesidad de reguladores de crecimiento vegetal exógenos, como en el presente estudio (Fig. 17 A), y con menor prevalencia de fenotipos aberrantes frecuentemente observados en eventos de regeneración a partir de *A. tumefaciens* y otros procesos de mutagénesis.

7.2. Comprobación de la transformación genética

Las plántulas de *S. rebaudiana* presuntamente transformadas (pCAMsrDXS) fueron analizadas por PCR para confirmar la transformación genética mediante la búsqueda del promotor 35S (transferido por *Agrobacterium rhizogenes*) en el ADNg. El análisis de amplificación se realizó sobre las plántulas originales (genotipo silvestre) y sobre plántulas presuntamente transformadas (pCAMsrDXS). En la Fig. 18, se muestra un ejemplo del resultado de amplificación recurrente para las plántulas analizadas.

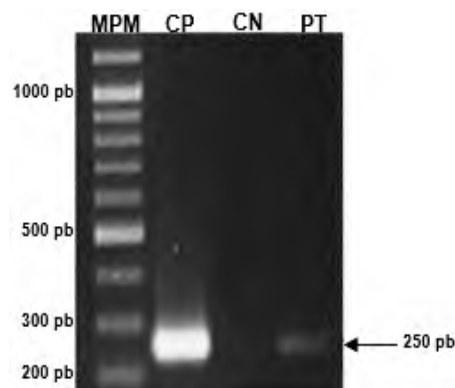


Fig. 18. Análisis de PCR en ADN genómico de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*. MPM: Marcador de peso molecular, **CP:** Control positivo (ADN plasmídico del vector binario), **CN:** Control negativo (ADN genómico de plántulas silvestres), **PT:** ADN genómico de plantas transformadas (fragmento del promotor 35S). **La flecha indica el tamaño esperado de amplificado.**

Los resultados muestran la amplificación de una banda de 250 pb, que coincide con el tamaño esperado de acuerdo con el control positivo utilizado, lo cual evidencia la inserción del ADN-T del vector binario y consecuentemente la transformación genética; además se observa ausencia de amplificación sobre ADNg de plántulas silvestres.

Las raíces de *S. rebaudiana* infectadas por *A. rhizogenes* regeneraron espontáneamente brotes adventicios a los 15 días (Jiménez-Brigada, 2018), que después se propagaron para el establecimiento de la línea de plántulas transformadas (pCAMsrDXS); las cuales mostraron mayor altura (14% más) y un número mayor de hojas (19% más) en comparación a las plántulas silvestres. Y de acuerdo con lo reportado por Choi *et al.*, (2004) y Zhou *et al.*, (2011), mantienen su estabilidad genética durante subcultivos continuos y son consideradas homogéneas o no-quiméricas pues provienen de raíces que se originaron de un solo evento de transformación. La regeneración de plantas a partir de raíces transformadas ha sido observada previamente en diferentes especies, por ejemplo: *Panax ginseng* (Yang & Choi, 2000), *Spinacia oleracea* (Ishizaki *et al.*, 2002), *Catharanthus roseus* (Choi *et al.*, 2004) y *Solidago nemoralis* (Gunjam *et al.*, 2013); donde se han encontrado plantas con fenotipos normales o mejorados comparados con el fenotipo silvestre. Lo que es similar con las plantas regeneradas en este trabajo (Fig. 17 A y B). Hasta el momento el efecto antes descrito no había sido reportado en *S. rebaudiana*, aunque existen reportes de regeneración directa e indirecta a partir de explantes y callos transformados con *A. tumefaciens* (Khan *et al.*, 2014), y aplicación de agentes mutagénicos (MSE) y dosis de radiación gamma, directamente sobre hojas (Khan *et al.*, 2016).

7.3. Comparación de los parámetros fisiológicos

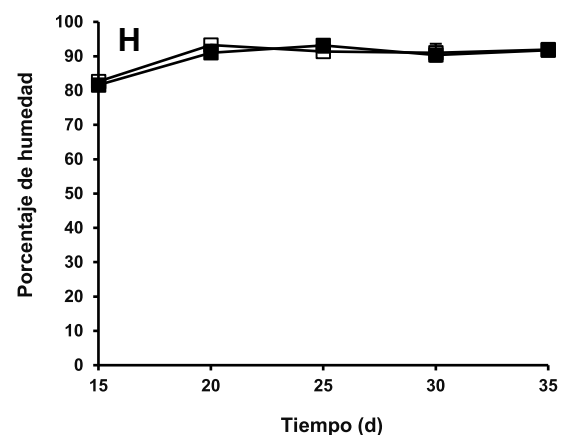
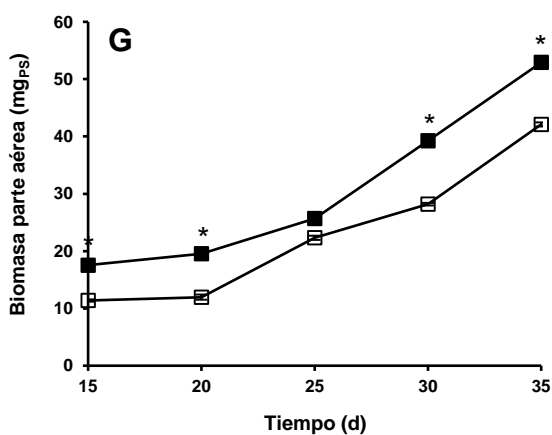
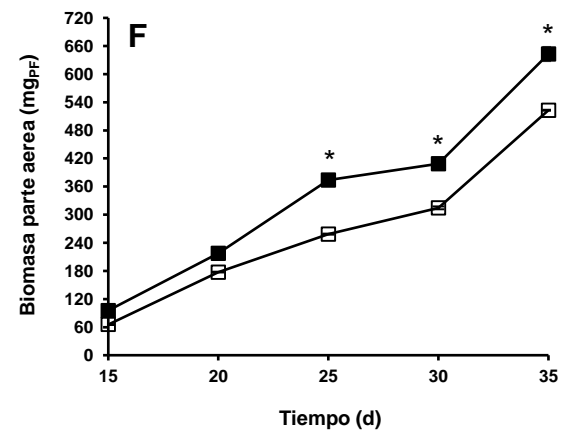
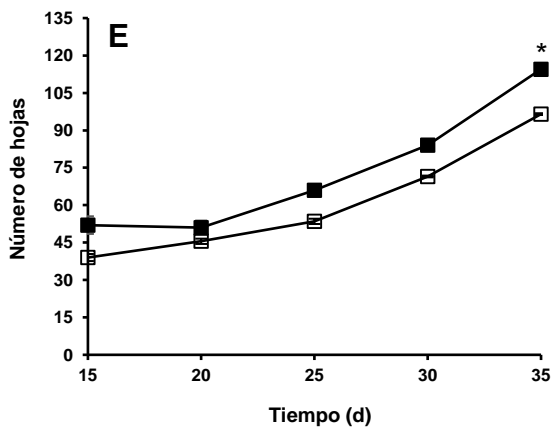
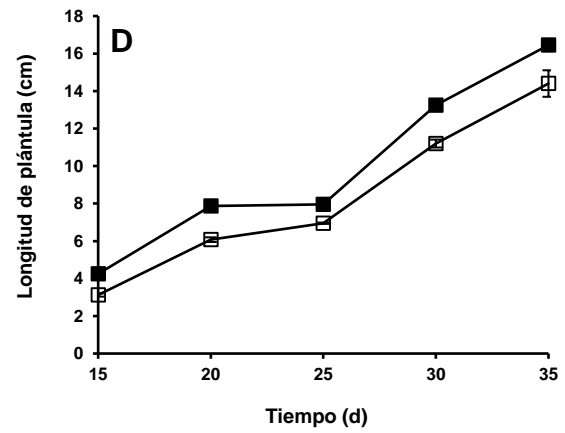
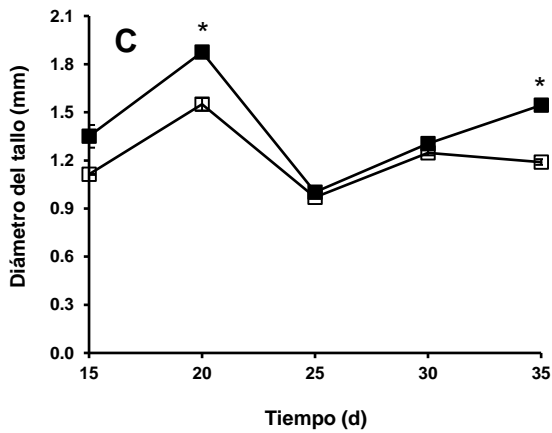
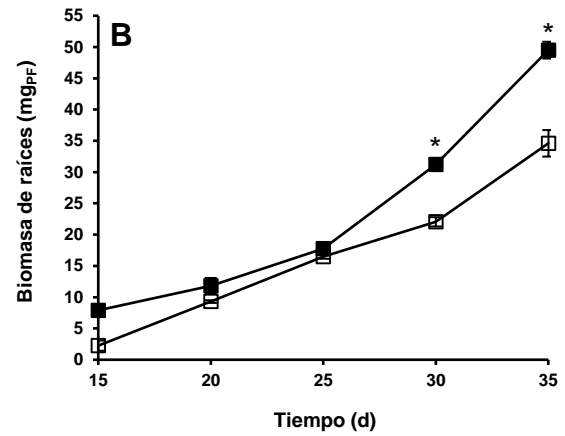
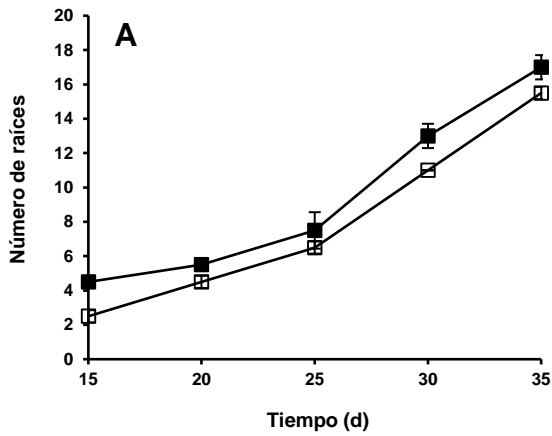
Con la finalidad de conocer las diferencias fenotípicas que existen entre las plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *S. rebaudiana*, se evaluaron muestras de ambas plántulas tomadas a los días (d) 15, 20, 25, 30 y 35 después de ser propagadas.

Los resultados de todas las cinéticas se presentan en la Fig. 19; y los resultados del día 35, se detallan a continuación.

Las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) no requirieron ningún tipo de fitorregulador, en comparación a las silvestres. El proceso de la generación de raíces en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) fue más rápido y directo (Fig. 17 A y B), además, fueron capaces de producir 10% más raíces (Fig. 19 A), ser más largas y acumular 43% más de biomasa (PF) que las silvestres (Fig. 19 B). Por otro lado, el diámetro del tallo (mm) de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) fue 30% más grueso (Fig. 19 C), fueron 14% más largas (Fig. 19 D) y tuvieron un mayor número de hojas 114.5 ± 3.54 , que las plántulas silvestres (Fig. 19 E).

En cuanto a la acumulación de biomasa de la parte aérea, las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) alcanzaron 642.9 ± 30.2 mg_{PF} y 52.9 ± 1.13 mg_{PS}; lo que significó un incremento del 23 y 26%, en comparación a las plántulas silvestres (Fig. 19 F y G); el porcentaje de humedad fue similar en ambas plántulas, con 91.77 ± 0.27 para las transformadas (pCAMsrDXS) y 91.95 ± 0.25 para las silvestres (Fig. 19 H). El área foliar (cm²) se determinó por zonas; parte baja, intermedia y del meristemo apical, observando que, el área de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) fue 24, 34 y 25% mayor, respectivamente, en comparación a las hojas de las plántulas silvestres (Fig. 19 I, J y K).

También se observó que las hojas y los tallos de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) eran de un color verde más intenso, en comparación a las silvestres (Fig. 17 A y B), lo que resultó en 18% más de clorofila a, 40% más de clorofila b y 37% más de carotenoides (Fig. 19 L, M y N). Cabe mencionar que las todas las diferencias entre ambos tipos de plántulas se observaron desde los primeros días de cultivo (Fig. 20 A, B, C, D, E, F, G, I y J). Los análisis estadísticos mostraron que los resultados de los parámetros fisiológicos evaluados en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS), (con la excepción del porcentaje de humedad) fueron significativamente superiores en comparación a las plántulas silvestres (Ver anexo 8).



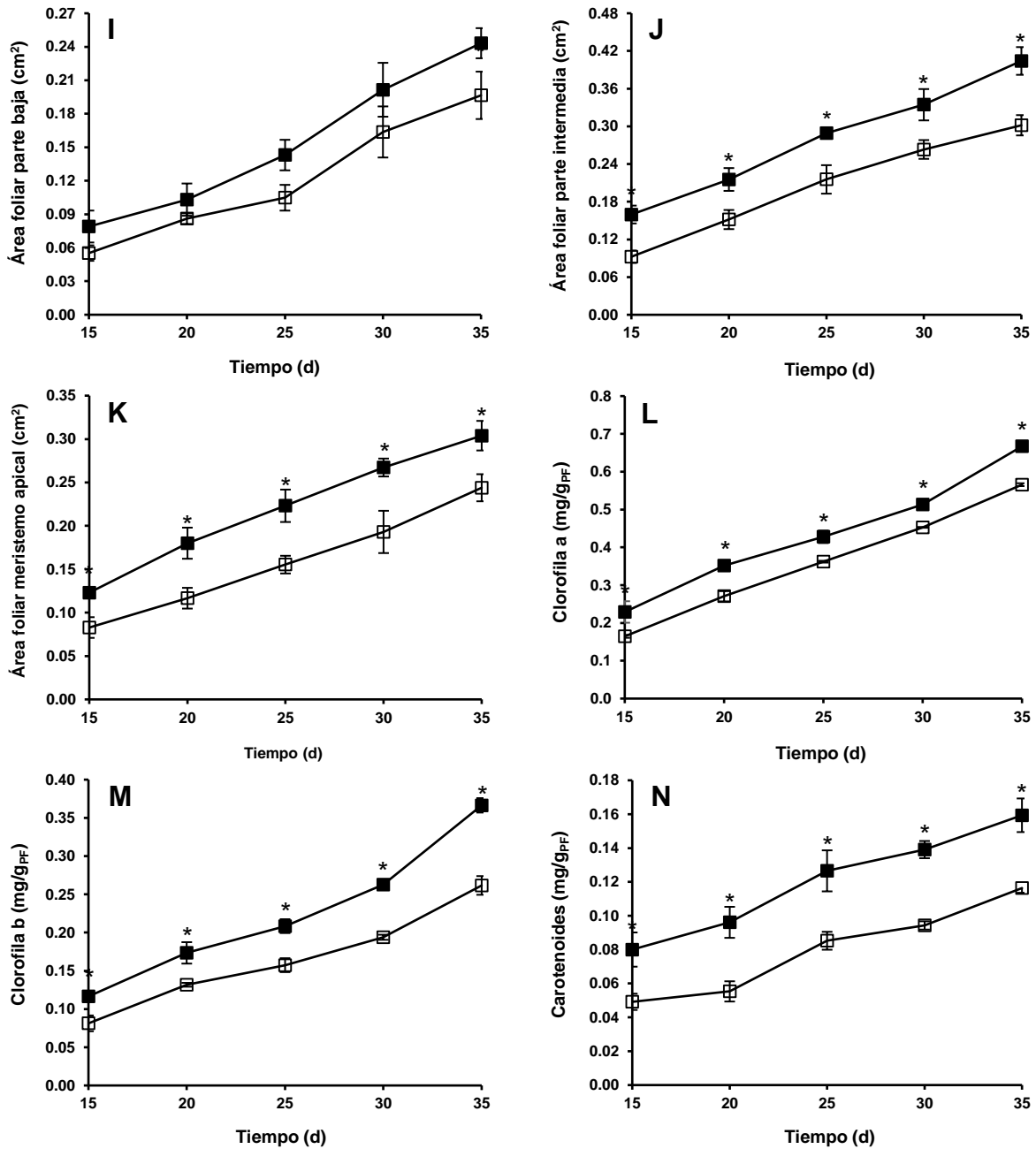


Fig. 19. Comparación de los cambios fisiológicos de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) (■) vs silvestres (□) de *Stevia rebaudiana* durante los 20 días de cinética. A: número de raíces, B: biomasa de raíces en peso fresco, C: diámetro del tallo, D: longitud de plántula, E: número de hojas, F: biomasa de parte aérea en peso fresco G: y seco, H: porcentaje de humedad, I: área foliar de la parte baja, J: intermedia y K: del meristemo apical, L: clorofila a, M: b y N: carotenoides. Los asteriscos (*) indican diferencia significativa con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

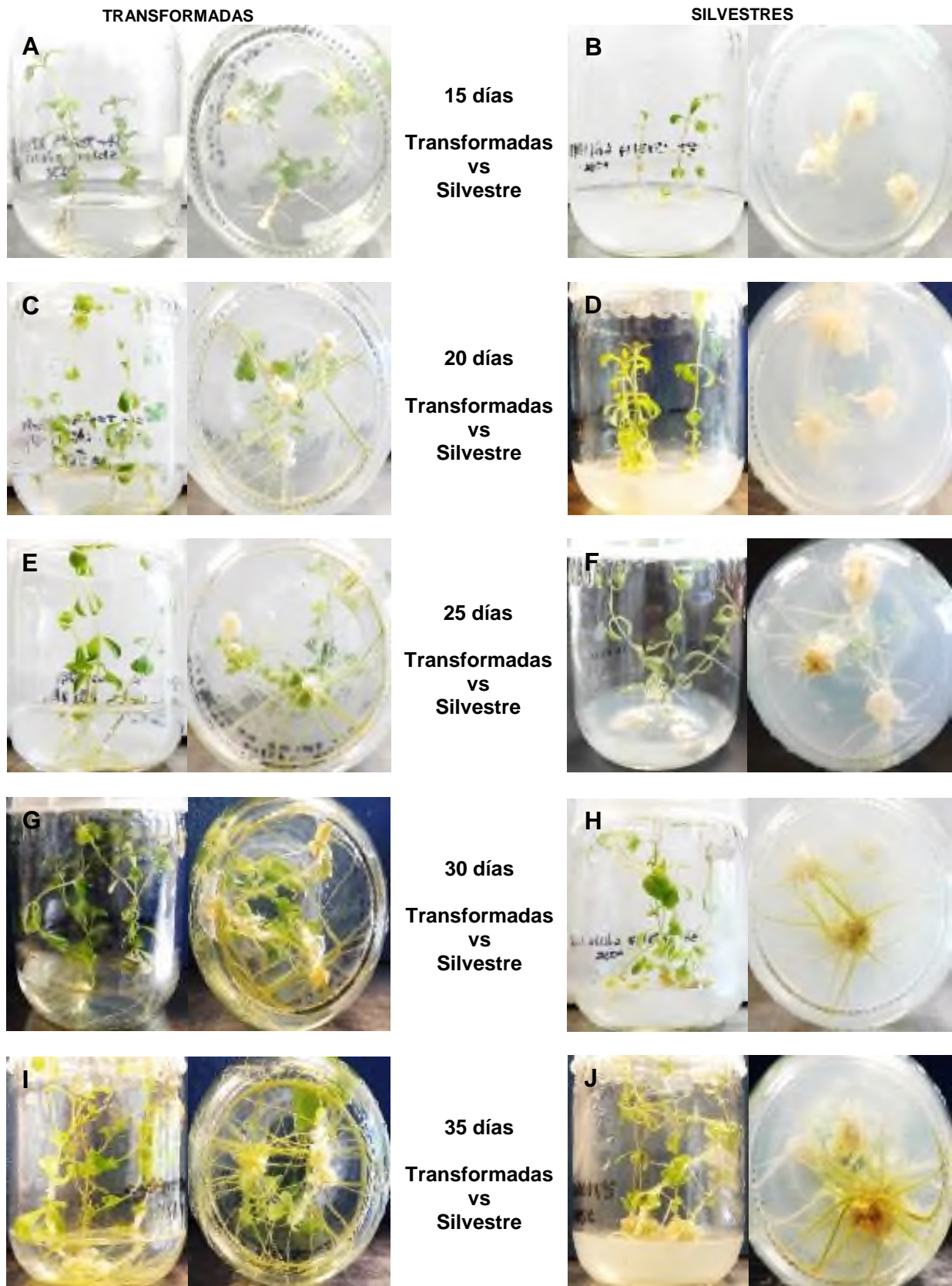


Fig. 20. Comparación de los cambios fisiológicos de las plantas transformadas (pCAMsrDXS) vs silvestres de *Stevia rebaudiana*.

A diferencia del fenotipo normal observado en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) regeneradas en el presente estudio, los fenotipos de *S. rebaudiana* reportados por Khan *et al.*, (2016), de plantas expuestas a MSE mostraron una altura reducida y con hojas anchas en comparación a las silvestres, y en el caso de exposición a radiación gamma resultaron ser más largas que las modificadas con MSE, pero con hojas angostas, en comparación a las silvestres. Por otro lado, plántulas de *Arabidopsis thaliana* modificadas genéticamente por *A. tumefaciens*, con la inserción del plásmido pCAMBIA1302-SrUGT85C2, resultaron ser 33% menor en la longitud de tallo, y de color verde pálido en comparación con la textura verde oscuro de las plantas silvestres, resultando en una disminución del 17% en el contenido de clorofila a. Además, la biomasa en peso fresco y seco disminuyó en un 54 y 21%, respectivamente, en los transgénicos en comparación a las silvestres. Finalmente, el área foliar también disminuyó en los transgénicos, observando una reducción del 56% con respecto a las plantas silvestres (Guleria *et al.*, 2014). Por otra parte, en plántulas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresaban el gen DXS, mostraron aumentos en el contenido total de clorofila, con niveles que fueron del 134 al 142%, así mismo el contenido de carotenoides totales, aumentando entre 112 y 131%, en relación con los niveles del tipo silvestre (Estévez *et al.*, 2001).

Es posible que los cambios fisiológicos observados se deban a que la agrotransformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes* es seguida por la transferencia, integración y expresión del ADN de transferencia y del plásmido Ri, junto con ello se realiza la inserción de los genes, *rol* A, B, C y D, a quienes en combinación o por separados se le pueden atribuir los cambios fisiológicos (Nilsson & Olsson, 1997; Christey, 2001). Otras de las razones posibles de los cambios fisiológicos, puede ser que al haber utilizado el plásmido binario pCAMsrDXS para la agrotransformación, este poseía una secuencia del gen DXS de *S. rebaudiana* modificado, y como ya se ha mencionado anteriormente, la enzima DXS regula el 82% de la ruta MEP, la cual lleva a la producción de diferentes isoprenoides, como clorofilas, carotenoides, ABA y giberelinas, quienes podrían ser responsables de los cambios fisiológicos.

Para descartar que las diferencias fenotípicas entre ambas plántulas (silvestres y transformadas pCAMsrDXS) fuera por el tipo del medio, se realizó un experimento, donde se sembraron las plántulas silvestres en medio de las plántulas transformadas (Fig. 21 A); y las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) en medio de las silvestres (Fig. 21 B). Después de 30 días de cultivo se observó que las plántulas silvestres no crecían ni se desarrollaban adecuadamente en el medio de las transformadas y de igual manera les sucedía a las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) en el medio de las silvestres; esto puede deberse a que las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) produzcan sus propias auxinas y citoquininas, en un balance adecuado al que lo necesitan para poder desarrollarse de la mejor manera, y al querer propagarlas en un medio con fitorreguladores, estos tiendan a ocasionar un desbalance y perjudicar el desarrollo de las plántulas. De forma similar podría pasar con las plántulas silvestres, éstas en contraste, al querer propagarlas en un medio sin fitorreguladores, no tuvieron la capacidad de poder desarrollarse de la mejor manera. Concluyendo que las diferencias fenotípicas no eran causadas por el tipo de medio, sino probablemente por efectos asociados a la transformación genética.

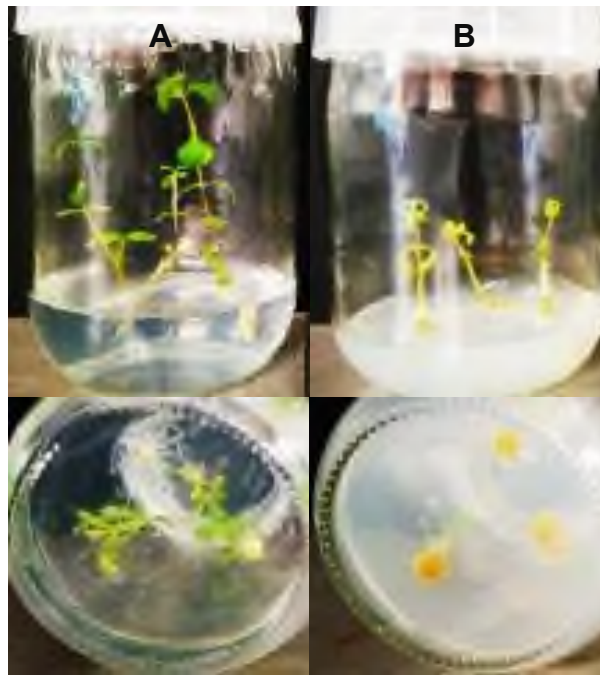


Fig. 21. Plántulas A: silvestres crecidas en medio de plántulas transformadas y B: transformadas (pCAMsrDXS) crecidas en medio de plántulas silvestres de *Stevia rebaudiana* a los 30 días de cultivo.

7.4. Cuantificación de los metabolitos secundarios

7.4.1. Glucósidos de esteviol

Se realizó la cromatografía de capa fina (sílica gel 60 F₂₅₄) de los extractos de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *S. rebaudiana* (a los 35 d), obteniendo como resultado que la banda de Est y Reb A (Rf = 0.43 y 0.34, respectivamente) de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS), fueron más intensas en comparación a las plántulas silvestres (Fig. 22), indicando cualitativamente que la producción de estos GEs fue mayor en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS).

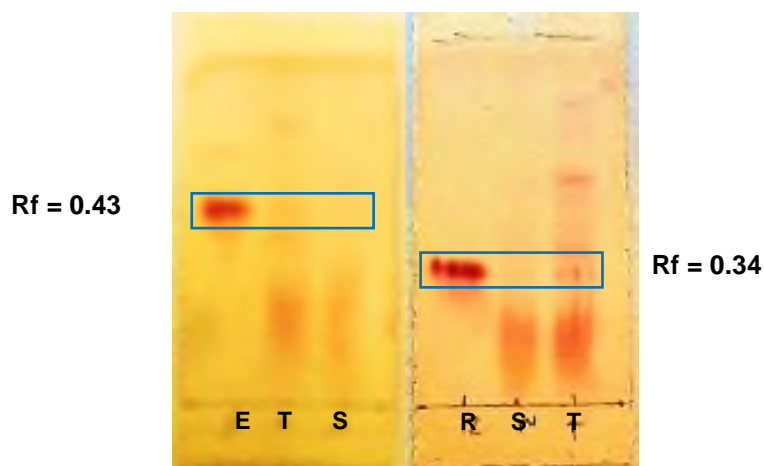


Fig. 22. Cromatografía en capa fina de **E:** esteviósido y **R:** rebaudiósido A de plántulas **S:** silvestres y **T:** transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*.

Por otro lado, los análisis por UHPLC mostraron que el contenido de Est y Reb A en plántulas transformadas (pCAMsrDXS) de 35 d, fue mayor en comparación a las plántulas silvestres (Ver anexo 9), lo que resultó en 4.95 ± 0.03 mg Est/g_{PS} y 4.83 ± 0.04 mg Reb A/g_{PS} (Fig. 23 A y B), siendo 1.6 y 1.1 veces más en relación a las plántulas silvestres, respectivamente. El análisis estadístico demostró que la producción de GEs en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) fue significativamente diferente al de las plántulas silvestres (Ver anexo 10).

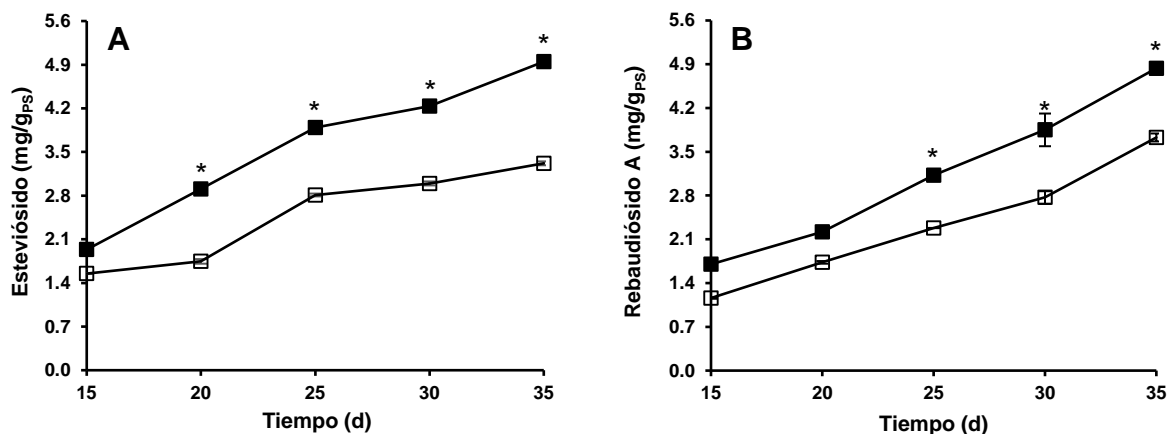


Fig. 23. Producción de **A:** esteviósido y **B:** rebaudiósido A de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) (■) y silvestres (□) de *Stevia rebaudiana*. Los asteriscos (*) indican diferencia significativa con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Un estudio realizado por Khan *et al.*, (2014), quienes utilizaron plántulas de *S. rebaudiana* transformadas por *A. tumefaciens* (pCAMBIA 1304), demostraron que las plántulas generadas por organogénesis directa incrementaron el contenido de Est y esteviol, y que las clonas generadas por organogénesis indirecta (S2) fueron capaces de acumular mayor cantidad de Est, el resto de las clonas mantuvo un perfil similar a la planta control. En contraste, en el caso de las plántulas regeneradas en este trabajo (*A. rhizogenes* pCAMsrDXS) (Fig. 17 A), se observó que el perfil de producción de Est y Reb A, fue similar en todas las plántulas y mantuvo la proporción de especies (Reb A/Est) durante el tiempo evaluado (Fig. 24); estos resultados sugieren que la línea de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) analizadas en este estudio, presentan estabilidad de producción, haciéndolas un recurso interesante en el estudio de alternativas de obtención de GEs.

Existen reportes de plántulas modificadas con la inserción del gen DXS para evaluar el efecto de su sobreexpresión; por ejemplo: Muñoz-Bertomeu *et al.*, (2006); transformaron plántulas de *Lavandula latifolia* con la cepa C58 de *A. tumefaciens*, que contiene el plásmido pLBI1DXSBS1, para obtener aceites esenciales (isoprenoides de interés comercial); observando que su producción se incrementaba de un 12.2 a 74.1%; por otro lado, Estévez *et al.*, (2001), modificaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* con la ayuda de *A. tumefaciens*, insertándole el vector binario pBin19 que

contenía el gen *CLA1*, el cual es la versión funcional de DXS en *Arabidopsis*. Ellos evaluaron el papel de DXS en la regulación de los niveles de isoprenoides plastídicos, observando que los niveles de los isoprenoides como, la clorofila, carotenoides, ABA y giberelinas, aumentaron o disminuyeron dependiendo de los niveles de DXS; proponiendo que DXS es la enzima limitante en la ruta del MEP para la producción de isoprenoides. Nuestros resultados son similares a los ya reportados en distintas plántulas, ya que la producción de carotenoides, clorofilas, Est y Reb A, fue mayor en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) en comparación a las silvestres, además de que probablemente la producción de giberelinas sea mayor por compartir la misma ruta y por las diferencias observadas en los parámetros fisiológicos evaluados.

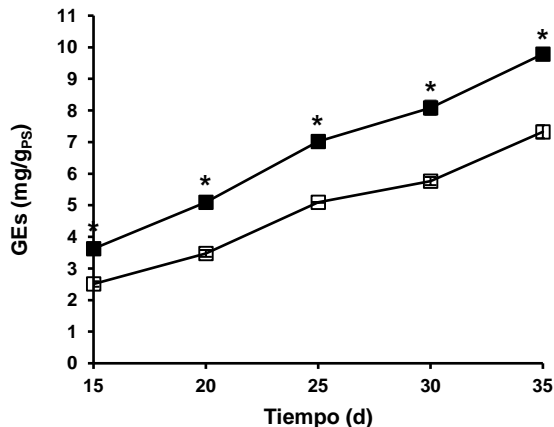


Fig. 24. Producción rebaudiósido A/esteviósido en plántulas transformadas (pCAMsrDXS) (■) y silvestres (□) de *Stevia rebaudiana*. Los asteriscos (*) indican diferencia significativa con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Es probable que otras enzimas co-limitantes para cada isoprenoide específico estén presentes en la vía MEP de la planta o hacia los pasos finales de la biosíntesis, sin embargo, las plántulas utilizadas en este estudio dieron como resultado mayor producción de GEs, indicando que probablemente la sobreexpresión de DXS fue favorable para la acumulación de dicho metabolitos. Recientemente, la ruta del MEP se ha estudiado intensamente en bacterias donde se encontró que DXS también es una enzima limitante. Esta conclusión también es apoyada por otros trabajos, como lo reportado por Lois *et al.*, (2000), quienes encontraron que DXS era limitante para la producción de carotenoides. Ellos supusieron que DXS estaba limitando la cantidad

de IPP disponible para la síntesis de carotenoides porque el contenido de los carotenoides no incrementaba sin incrementos de niveles de DXS. La evidencia acumulada indica que DXS es una enzima limitante en la ruta de MEP de las plantas de *Stevia rebaudiana*.

7.4.2. Fenoles y flavonoides totales

La producción de FT no fue estadísticamente diferente en ambos tipos de plántulas, consiguiendo una producción de $25.31 \pm 0.05 \mu\text{g}_{\text{EAG}}/\text{mg}_{\text{PS}}$ para las transformadas (pCAMsrDXS) y de $26.08 \pm 0.28 \mu\text{g}_{\text{EAG}}/\text{mg}_{\text{PS}}$ para las plántulas silvestres (Fig. 25, Ver anexo 11).

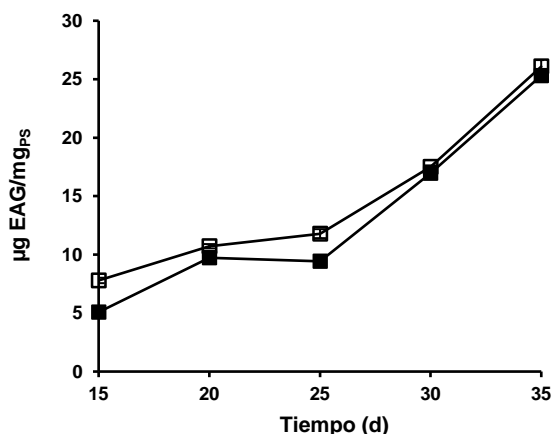


Fig. 25. Producción de fenoles totales en plántulas transformadas (pCAMsrDXS) (■) y silvestres (□) de *Stevia rebaudiana*. No existió diferencia significativa con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Los compuestos fenólicos se encuentran comúnmente en plantas comestibles y no comestibles, y se ha informado que tienen múltiples efectos biológicos, incluida la actividad antioxidante (Kähkönen *et al.*, 1999). Existen diversos reportes que demuestran la producción de estos metabolitos secundarios en plantas de *S. rebaudiana* por el método de Folin-Ciocalteu, como lo reportaron, Tadhani *et al.*, (2007), quienes evaluaron el contenido de FT de plántulas con genotipo silvestre de *S. rebaudiana*, reportando una acumulación de $25.18 \pm 0.24 \mu\text{g}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{PS}}$. Así mismo, Muanda *et al.*, (2011), obtuvieron una concentración de $25.25 \pm 0.21 \mu\text{g}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{PS}}$ en

extractos metanol-H₂O de hojas de *S. rebaudiana*. Por otro lado, Montes-Palmeros, (2017), determino la concentración de FT, en plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana* (genotipo silvestre) de 45 días de cultivo, alcanzando una concentración de $14.97 \pm 0.19 \mu\text{g}_{\text{EC}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$. En contraste, Kim *et al.*, (2011), evaluaron extractos acuosos de hojas de *S. rebaudiana* mostrando, observando una concentración de $130.76 \pm 2.23 \mu\text{g}_{\text{EC}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$. Finalmente, Shukla *et al.*, (2009), evaluaron el contenido total de fenoles de hojas de *S. rebaudiana*; ellos obtuvieron una concentración de $61.5 \mu\text{g}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{PS}}$.

Cabe señalar que el método de Folin-Ciocalteu se puede considerar como un método adicional para la determinación de la capacidad antioxidante. En este ensayo, una heteropolianión molibdatofosfórica reduce los fenoles, produciendo un producto coloreado. Este método no es muy específico debido a una gran cantidad de sustancias interferentes, que incluyen, en el caso de la *S. rebaudiana*, por ejemplo, azúcares, iones metálicos y ácidos orgánicos. Además, la influencia del agente de extracción no es despreciable (Prior *et al.*, 2005; Wölwer-Rieck, 2012). Por lo tanto, no es sorprendente que los resultados del contenido de FT en *S. rebaudiana* difieran significativamente cuando se utiliza el ensayo de Folin-Ciocalteu.

Por otro lado, se realizó la cuantificación de flavonoides totales de ambas plántulas (silvestres y transformadas pCAMsrDXS), sin embargo, no se logró determinar su concentración, por lo que se sugiere, que la producción de estos metabolitos dentro de estas plántulas pueda ser muy baja, es por ello por lo que no se siguió realizando experimentos para determinar la producción de dichos metabolitos.

Para la identificación de fenoles se realizó la cromatografía de capa fina (sílica gel 60 F₂₅₄) de los extractos de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *S. rebaudiana*; se comparó el R_f de las bandas de los extractos con el de cada estándar (Sección 6.5.4). Se observó que ninguna banda de los extractos tuvo coincidencia con los estándares utilizados, sin embargo, en ambos extractos se alcanzaron a apreciar 2 bandas en las placas corridas con la fase S1 y una sola banda más intensa con la fase S3 (Fig. 26).

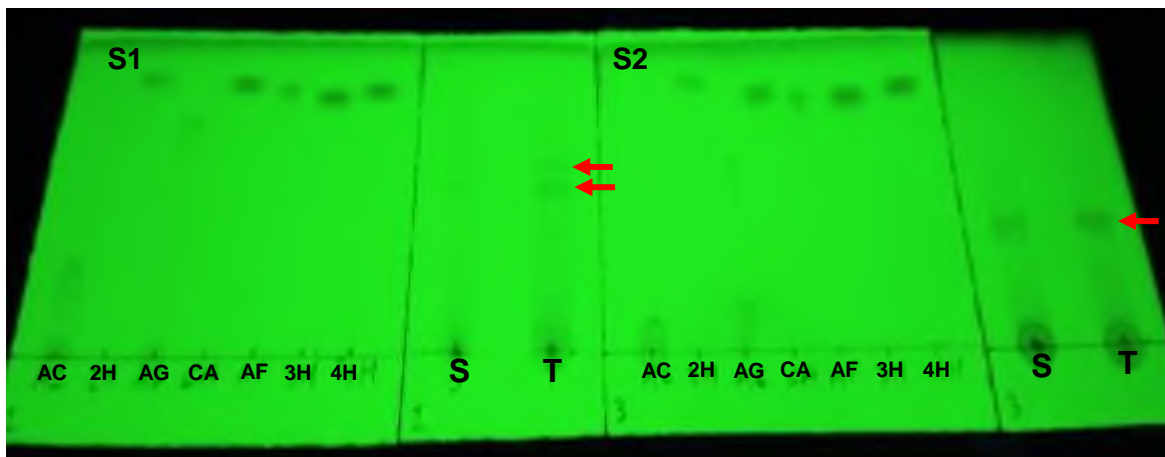


Fig. 26. Identificación de fenoles en extractos de plántulas S: silvestres y T: transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*. AC: ácido clorogénico, 2H: 2 hidroxicinámico, AG: ácido gálico, CA: catequina, AF: ácido ferúlico, 3H: 3 hidroxicinámico y 4H: 4- (hidroximetil) benzoico. Fase de corrida S1: acetato de etilo: metanol: H₂O (100: 13.5: 10 v/v/v) y S3: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: H₂O (100: 11: 11: 26 v/v/v/v). UV 245 nanómetros.

Los análisis por UHPLC mostraron que ambos tipos de plántulas tuvieron los mismos perfiles de compuestos fenólicos, sin embargo, en las plántulas silvestres la producción fue superior comparada con las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) (Fig. 27). La identificación de dichos metabolitos se realizó comparando el TR de los estándares utilizados (Sección 6.5.7.) con el de los compuestos obtenidos, donde únicamente se pudo identificar como fenólico al ácido clorogénico, ya que el TR y el pico característico del ácido clorogénico fue similar al obtenido en ambos extractos (Fig. 28 y 29).

Karaköse *et al.*, (2015), lograron identificar 5 compuestos fenólicos por resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas de alta resolución por electro spray (HR-ESI-MS), el ácido vanílico 4-β-D-glucopiranosido, protocatecuico, cafeico, clorogénico y criptoclorógeno. Por otra parte, Yu *et al.*, (2017), reportaron que sus muestras de *Stevia rebaudiana* contenían hasta 29 derivados de ácido clorogénico. Estos resultados sugieren que es necesaria la utilización de otras técnicas y otros equipos más sensibles (RMN y HR-ESI-MS), que permitan identificar y cuantificar otros fenoles presentes en las plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana* del presente estudio.

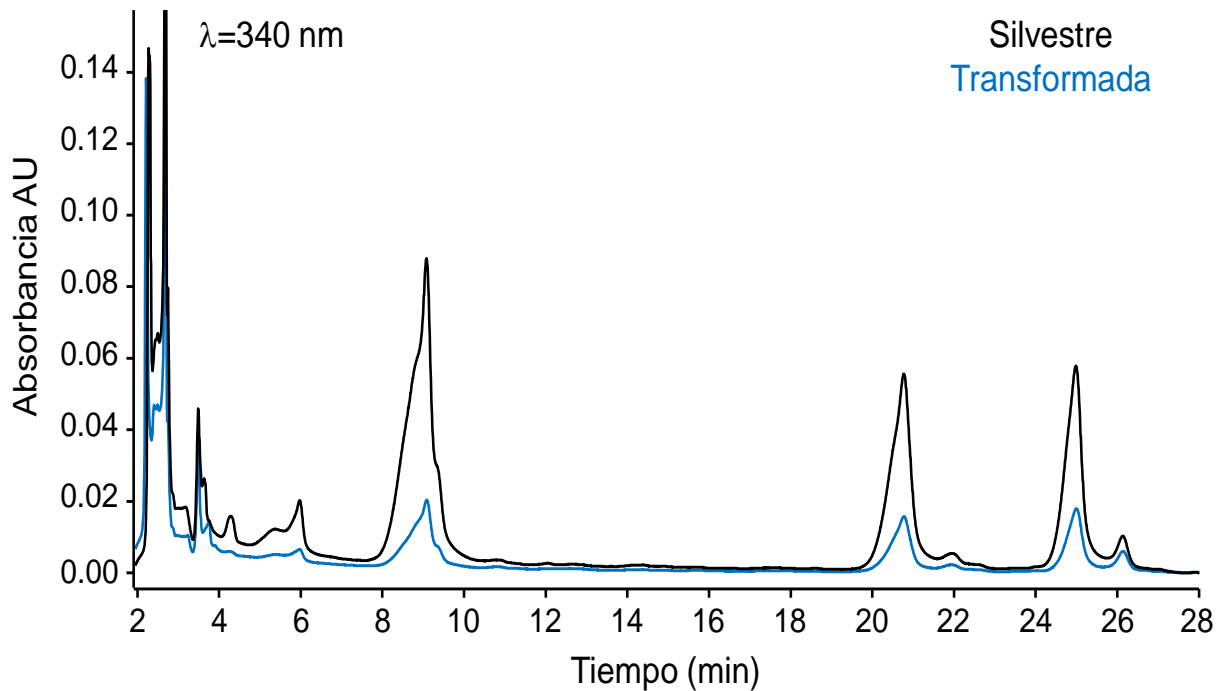


Fig. 27. Cromatograma del perfil de producción de fenoles en plántulas silvestres (--) y transformadas (pCAMsrDXS) (--) de *Stevia rebaudiana* a los 35 días de cultivo.

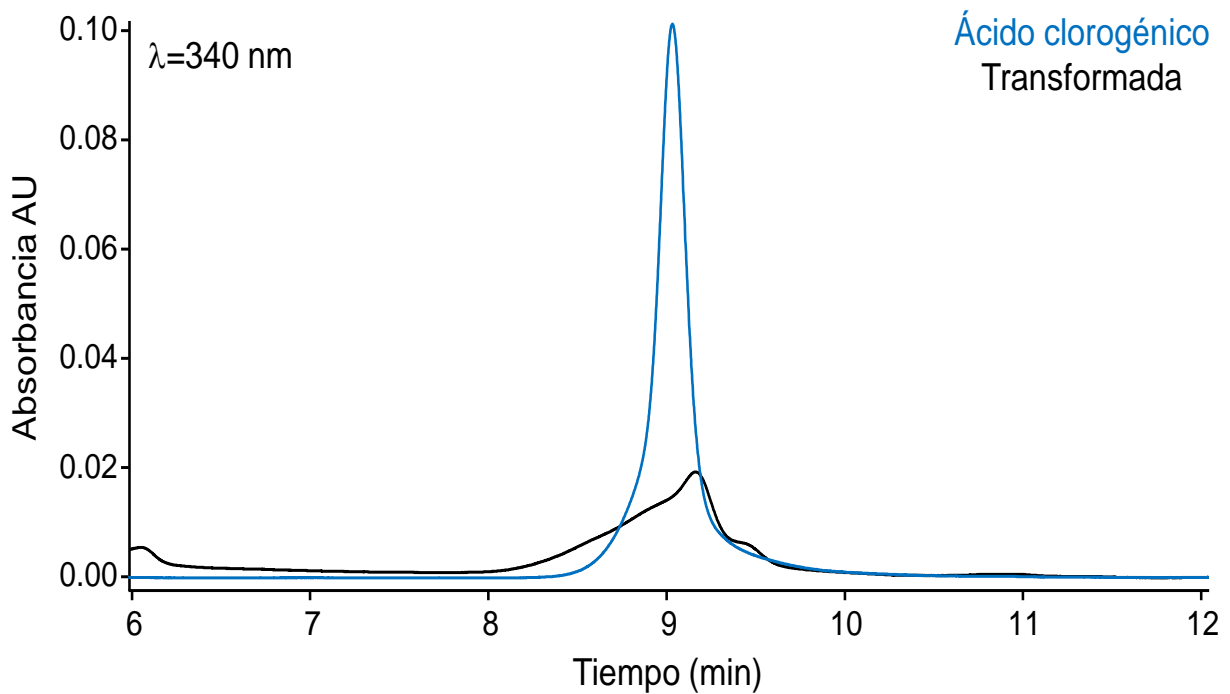


Fig. 28. Cromatograma del extracto de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana* (--) a los 35 días de cultivo, comparado con el ácido clorogénico (--).

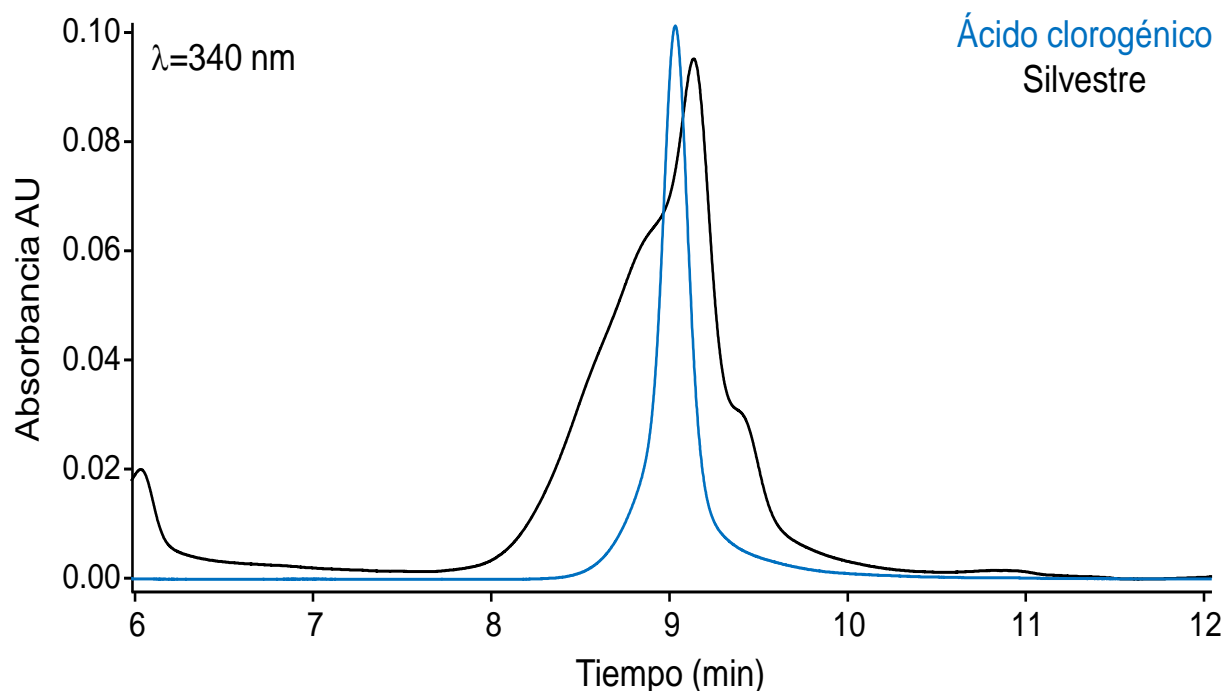


Fig. 29. Cromatograma del extracto de plántulas silvestres de *Stevia rebaudiana* (--) a los 35 días de cultivo, comparado con el ácido clorogénico (--).

Existe diferencia entre la cuantificación de fenoles totales (Fig. 25) y el perfil de producción de estos metabolitos (Fig. 27), esto se puede deber a que la cuantificación de fenoles totales no es específica (Prior *et al.*, 2005; Wölwer-Rieck, 2012), pudiendo dar resultados que solo sean una aproximación y no los reales, y al compararlo con la identificación en UHPLC, sea evidente la diferencia, ya que esta técnica es específica dando resultados que solo correspondan a compuestos fenólicos.

7.5. Proteómica diferencial

7.5.1. Extracción y cuantificación de las proteínas

Después de los 35 días de trasplante de las plántulas *in vitro*, silvestres y transformadas (pCAMsrDXS), se tomó muestra para la extracción de proteína total soluble. Se utilizó la metodología de TRI Reagent, partiendo de 50 mg de material vegetal; una vez obtenidas las pastillas de proteínas, se resuspendieron en

amortiguador de rehidratación (Sección 6.7.1), procedimiento descrito por Montes-Palmeros, 2017. Además, algunas muestras se pasaron por columnas Micro Bio-Spin® Bio-Gel® P-30 (Bio-Rad), con la finalidad de limpiarlas de pequeñas moléculas, sales, etc., que pudieran interferir con la cuantificación.

Una vez obtenidos los extractos proteicos, se realizaron geles en primera dimensión (SDS-PAGE), para verificar la calidad y pureza de las proteínas; observando que las muestras que se pasaron por las columnas de ambos tipos de plántulas (silvestres y transformadas pCAMsrDXS), se obtuvieron 8 bandas proteicas bien definidas de aproximadamente 250, 150, 125, 100, 75, 50, 37 y 25 kDa (Fig. 30). Por otro lado, en las muestras que no se pasaron por las columnas solo se resolvieron 3 bandas proteicas no bien definidas de aproximadamente 125, 75 y 25 kDa, para ambas muestras (silvestres y transformadas pCAMsrDXS, Fig. 30).

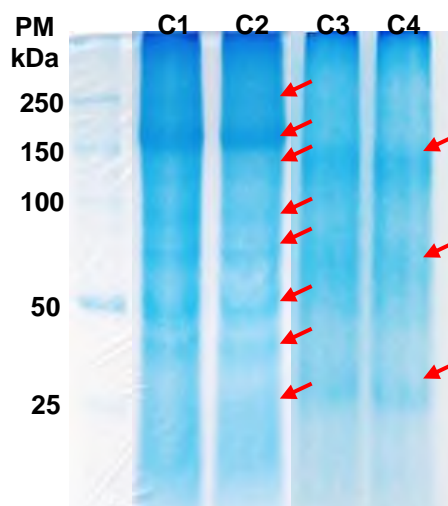


Fig. 30. Gel SDS PAGE al 12% con proteína total soluble de plántulas de *Stevia rebaudiana*. C1: muestras de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y **C2:** silvestres pasadas por columnas Micro Bio-Spin® Bio-Gel® P-30 (Bio-Rad) y **C3:** muestras de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y **C4:** silvestres sin pasar por columnas.

La concentración de proteínas de las muestras sin pasar por las columnas fue de 8.83 y 8.22 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y silvestres, respectivamente; resultando mayor a la concentración de las muestras pasadas por las columnas, 7.74 y 7.65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y silvestres, respectivamente.

Cabe señalar que la concentración de proteína fue mayor en las muestras de ambas plántulas que no se pasaron por las columnas, pero esto puede deberse a compuestos interferentes dentro del extracto proteico que fueron removidas una vez que se utilizó la columna. Cuando se realizó la separación en segunda dimensión (2-D SDS-PAGE), los geles de las muestras sin pasar por columna quedaron de muy mala resolución y las proteínas no se separaron de la mejor manera (Fig. 31 A y B), en comparación con las muestras que se pasaron por las columnas (Fig. 31 C y D), concluyendo que este último paso (limpieza de proteína por columnas), resultó ser fundamental para la buena separación de las proteínas.

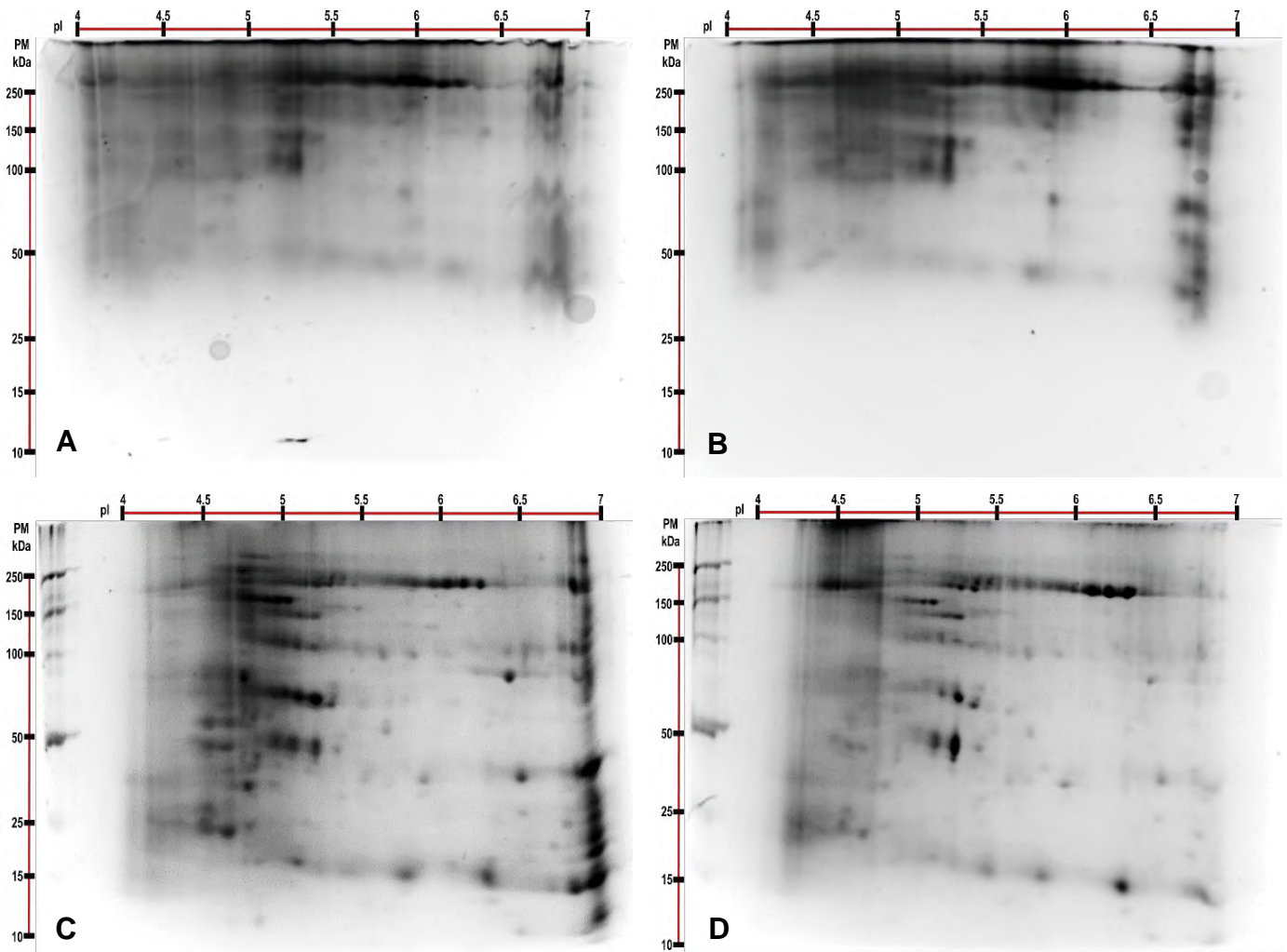
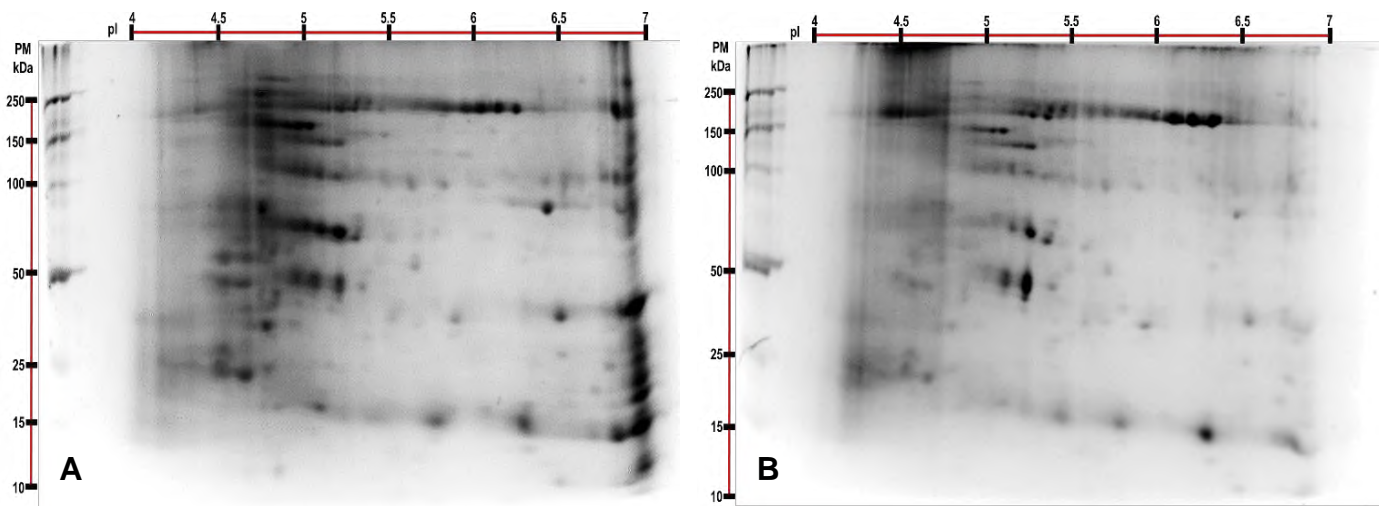


Fig. 31. Geles 2-D SDS PAGE al 12% con proteína total soluble de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*. A: muestras de la plántula silvestre y **B:** transformadas (pCAMsrDXS) sin pasar por las columnas; **C:** muestras de la plántula silvestre y **D:** transformadas (pCAMsrDXS) pasadas por las columnas Micro Bio-Spin® Bio-Gel® P-30 (Bio-Rad).

7.5.2. Distribución y separación de las proteínas dentro del gel 2-D

Para la separación de las proteínas en primera dimensión, se evaluaron tiras con dos gradientes de pH inmovilizado (IPG), de 4-7 y de 3-10 de 7 cm de longitud. Los geles en 2-D revelaron que las tiras de pH 4-7 presentaban una mejor separación y distribución de las proteínas de ambas plántulas (Fig. 32 A y B), en comparación con las de pH 3-10 (Fig. 32 C y D), por lo que se decidió realizar el isoelectroenfoque de las tiras de IPG de pH 4-7, con las muestras de proteínas de ambos tipos de plántulas. Resultados similares fueron reportados por Brandão *et al.* (2010). Ellos realizaron un análisis de proteómica diferencial en semillas de soya, silvestre y transformada; donde evaluaron la distribución y separación de las proteínas en tiras de IPG de 3-10 y de 4-7, observando que el mejor resultado lo encontraron en tiras de 4-7; separándose 369 proteínas para los transgénicos y 375 para semillas no transgénicas. Por otra parte, la separación 2-DE de las proteínas de semilla de arroz mostró que las tiras con pH 4-7 tenían mayor resolución que aquellas con pH 3-10. En este estudio, analizaron proteomas de semilla de diferentes líneas de arroz usando 2D-DIGE con pH 4-7 tiras, detectando aproximadamente 2250 manchas proteicas en cada imagen (Gong *et al.*, 2012).



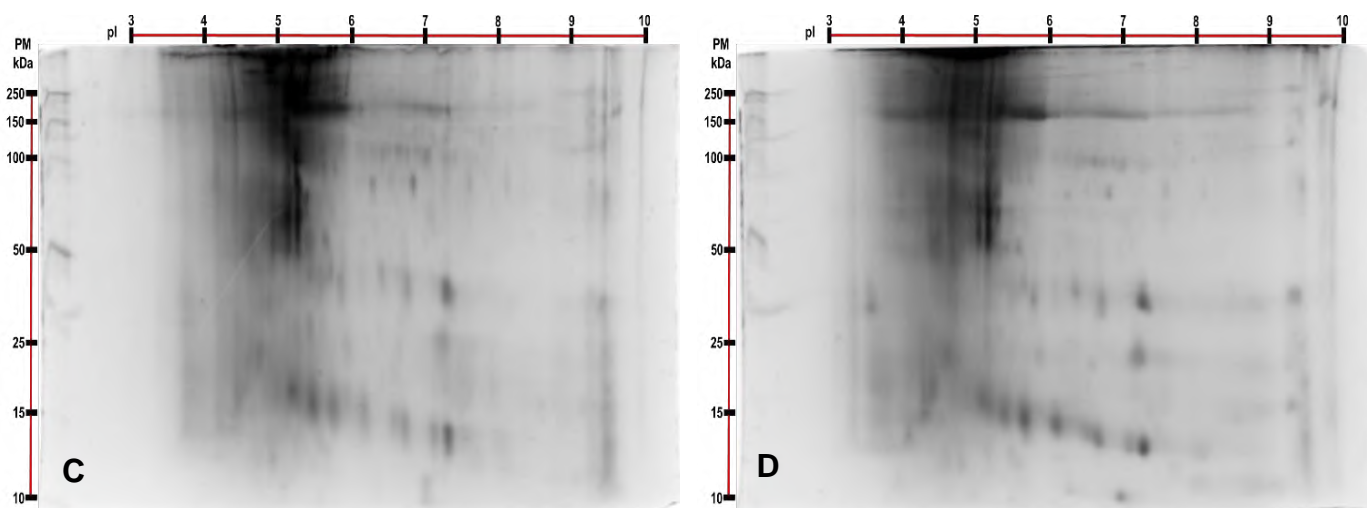


Fig. 32. Geles 2-D SDS PAGE al 12% con proteína total soluble de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana* utilizando dos diferentes gradientes de pH inmovilizado. A: muestras de plántulas silvestres y B: transformadas (pCAMsrDXS) utilizando tiras de pH 4-7; C muestras de plántulas silvestres y D: transformadas (pCAMsrDXS) utilizando tiras de pH de 3-10.

7.5.3. Detección y selección de las proteínas

Para realizar el análisis de proteómica diferencial entre ambas plántulas (silvestres y transformadas pCAMsrDXS), los geles fueron escaneados en un densitómetro GS-900™ (Bio-Rad), posteriormente, las imágenes se convirtieron en formato TIFF y analizados en el programa PDQuest™. Para poder comparar la abundancia proteica entre las diferentes plántulas, los geles fueron traslapados, dicho proceso se realiza ya que los geles analizados no son iguales, representando uno de los puntos cruciales del análisis de proteómica diferencial.

En algunos casos las manchas proteicas no son identificadas correctamente por el programa, por lo que es necesario su edición manual. En este proceso se eliminaron todas aquellas manchas que daban falsos positivos y que no cumplían con las características necesarias; por ejemplo, se eliminaron las manchas que estaban fuera del área ocupada por la tira de IPG, las manchas que el programa detectó en el marcador de peso molecular y las que estaban en los bordes de los geles. Su edición fue mínima, solo en las manchas falsas obvias detectadas (Fig. 33 A, B, C y D). Este

procedimiento señala la extrema importancia de editar las imágenes para evitar interpretaciones erróneas de la cantidad de manchas detectadas.

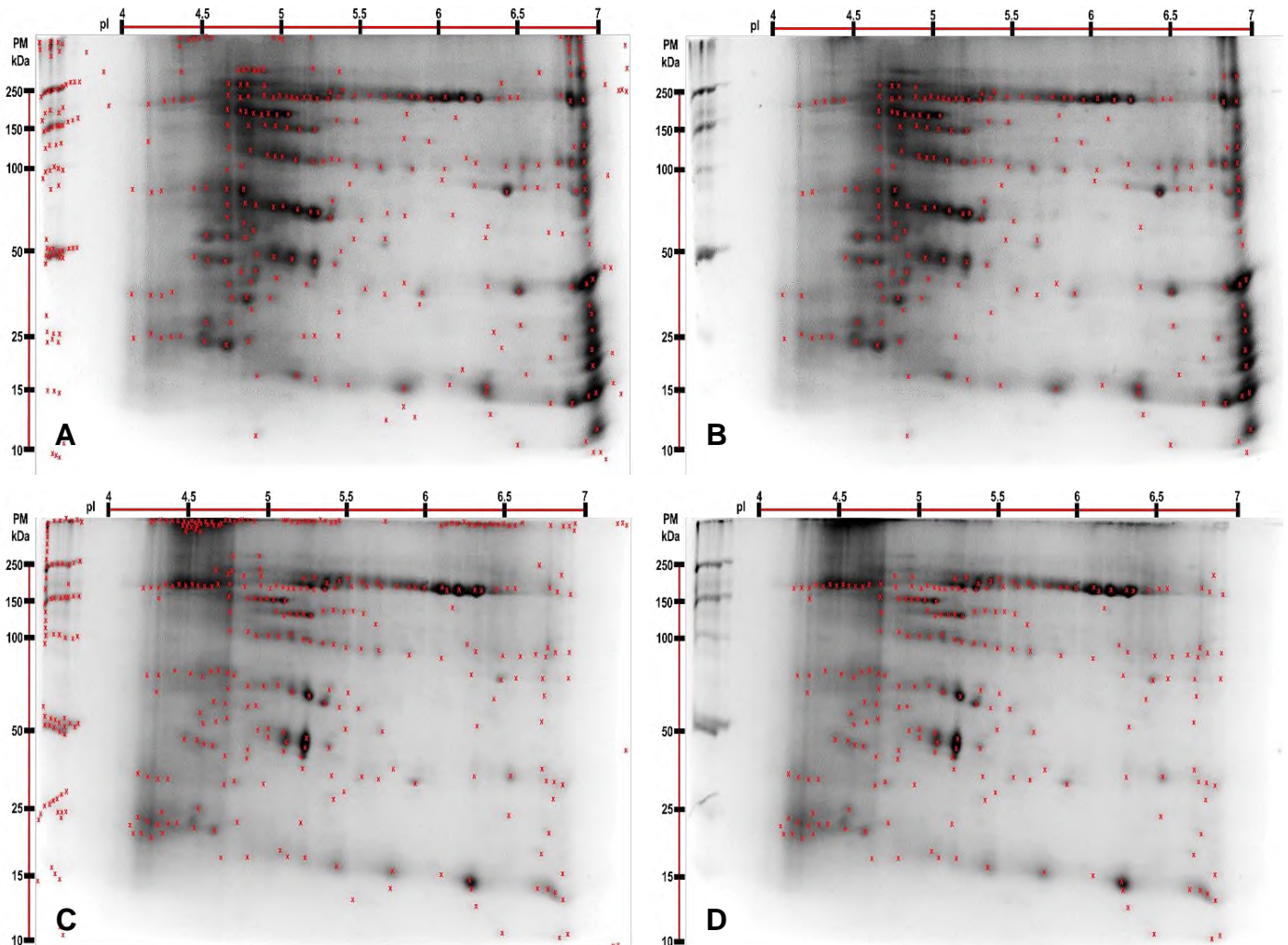


Fig. 33. Corrección en la identificación de manchas proteicas en los geles 2-D SDS PAGE de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*. Identificación de las manchas proteicas por el programa PDQuest en el gel de **A**: plántulas silvestres y **C**: transformadas (pCAMsrDXS); corrección manual de las manchas proteicas en el gel de **B**: plántulas silvestres y **D**: transformadas (pCAMsrDXS).

Una vez terminada la edición, se realiza el análisis en el programa para que se le asigne un número de identificación a cada mancha proteica. En la Fig. 34 A y B, se muestran los geles de ambos tipos de plántulas (silvestre y transformada pCAMsrDXS), con el número asignado a cada mancha proteica; donde los números

azules son las proteínas que se expresan diferencialmente en cada plántula y los números en rojo representan las proteínas que se expresan en ambas plántulas.

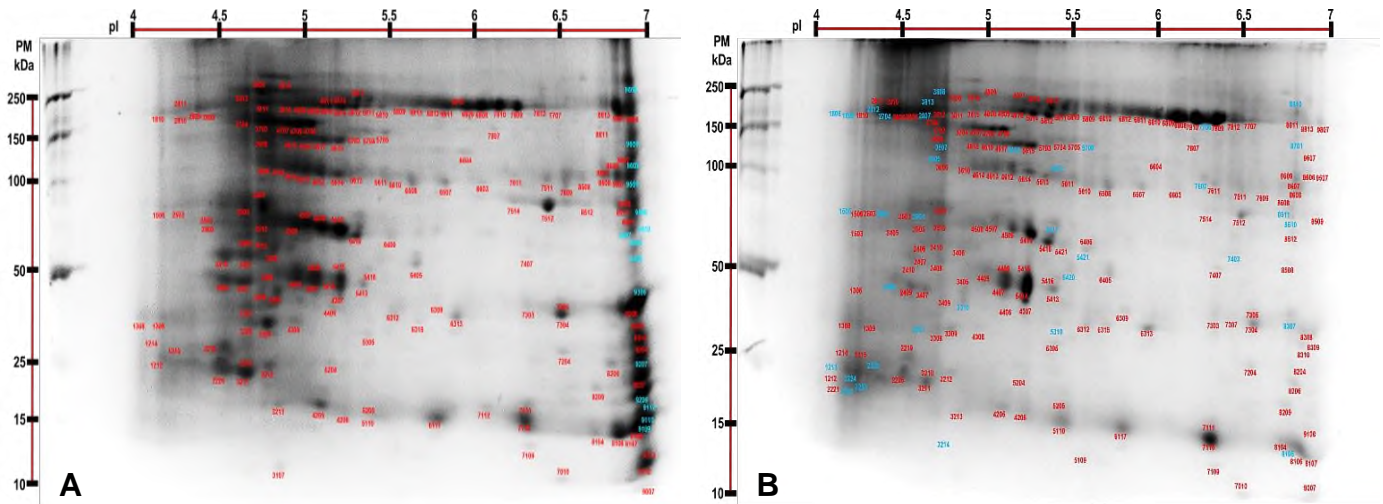


Fig. 34. Comparación de la expresión de proteínas en los geles 2-D SDS PAGE de plántulas **A:** silvestres y **B:** transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*.

Los geles de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) presentaron mayor número de manchas proteicas con 190, de las cuales, 27 se expresaron diferencialmente con respecto a las silvestres, y en los geles de las plántulas silvestres se expresaron 17 manchas proteicas que no se expresaron en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS), dando un total de 180 manchas proteicas (Fig. 35).

Los resultados que se observaron de las plántulas silvestres del presente estudio son superiores a los reportados por Montes-Palmeros, (2017), quien obtuvo una cantidad de 116 manchas proteicas en plántulas silvestres. Del mismo modo, son superiores a lo reportado por Karaköse, (2015), quien realizó un perfil proteómico de hojas de *S. rebaudiana* y encontró que 11 manchas proteicas se sobreexpresaban en dicha planta. A partir de estas observaciones, se concluye que el último paso realizado en la extracción de proteínas en nuestro experimento (limpieza por columna), permite una mejor resolución, separación, distribución y por lo tanto una mejor identificación de las proteínas.

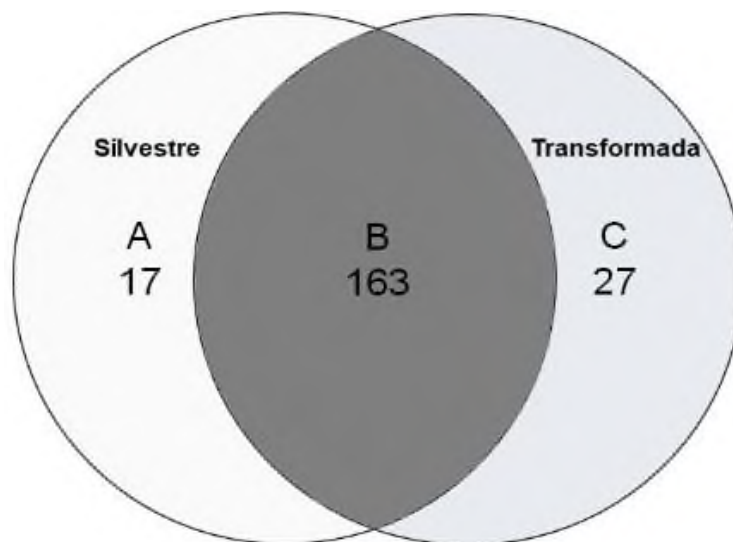


Fig. 35. Diagrama de Venn. Número de manchas proteicas detectadas en los geles de 2-D SDS PAGE de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*. A: manchas proteicas expresadas diferencialmente en las plántulas silvestres, **B:** manchas proteicas expresadas en ambos geles y **C:** manchas proteicas expresadas diferencialmente en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS).

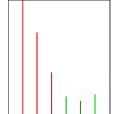
Existen pocos antecedentes en cuanto a la comparación del análisis proteómico entre plántulas silvestres y transformadas, un ejemplo de ello es lo reportado por Wang *et al.*, (2015), quienes realizaron un análisis proteómico diferencial de plántulas silvestres y transformadas de algodón, observando que en las plántulas transformadas expresaron 23 manchas proteicas diferencialmente en comparación con las silvestres, las cuales estaban involucradas principalmente en la fijación de carbono y la fotosíntesis, la ruta del metabolismo del glioxilato y el dicarboxilato y la ruta oxidativa de la pentosa fosfato. Así mismo, Gong *et al.*, (2012), realizaron un experimento de proteómica diferencial en semilla de arroz transgénicas y silvestres, encontrando que en las dos líneas de semillas transgénicas evaluadas (Baar68-1 / 2036-1a) se expresaban diferencialmente 12 y 17 proteínas, respectivamente, con respecto a las silvestres. Lo descrito anteriormente concuerda con los resultados obtenidos en nuestros experimentos, donde las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) resultaron con un mayor número de manchas proteicas, en comparación con las silvestres. Lo que sugiere que la manipulación o alteración del genoma de las plantas con genotipo silvestre, hace que se induzcan diferentes proteínas involucradas en diversos procesos fisiológicos y/o bioquímicos dentro de las plantas transformadas.

7.5.4. Identificación de proteínas mediante bioinformática

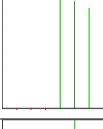
Las manchas proteicas resueltas en los geles 2-D SDS-PAGE de ambos tipos de plántulas (silvestres y transformadas pCAMsrDXS), se identificaron en las bases de datos www.uniprot.org y www.ncbi.nlm.nih.gov, así como, www.bioinformatics.org y www.isoelectric.org, según su PM y pl indicado por su ubicación dentro del gel; también fueron comparadas con las proteínas reportadas en los análisis de proteómica realizados por, Chen *et al.*, (2007), Chen *et al.*, (2011), Fan *et al.*, (2011), Liu *et al.*, (2011), Maserti *et al.*, (2011), Manaa *et al.*, (2011), Ruiz-May *et al.*, (2011), Yu *et al.*, (2011), Yu *et al.*, (2013), Li *et al.*, (2015), Nouri *et al.*, (2015), Rasool *et al.*, (2015), Wang *et al.*, (2015), Zhang *et al.*, (2016), Hua *et al.*, (2016) y Liu *et al.*, (2016). Además, con el fin de tener un resultado más exacto, se cuidó que el PM teórico / experimental fuera igual o ± 5 kDa y que el pl teórico / experimental fuera igual o ± 0.05 pH.

En total se lograron identificar 70 proteínas involucradas en diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos (Tabla 7).

Tabla 7. Posible identificación de proteínas en plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana* mediante bioinformática.

No. Mancha ^A	No. Acceso/Referencia ^B	PM (kDa) Teó/Exp ^C	pl Teó/Exp ^D	Nombre ^E	Función biológica ^F	Especie ^G	LC ^H	Intensidad de mancha (S/T) ^I
FOTOSÍNTESIS								
3406	Q43088	55.11/56.68	4.72/4.75	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa	Cataliza el paso inicial y más significativo del ciclo de Calvin, en concreto la fijación del dióxido de carbono a una forma orgánica.	<i>Pisum sativum</i>	Clo	

5612	A0A1S3YXA5	95.46/95.97	5.37/5.34	Piruvato, fosfato diquinasa	Proteína clave en la gluconeogénesis y en la fotosíntesis, y es responsable de la reacción inversa que cataliza la piruvato quinasa en la glucólisis.	<i>Nicotiana tabacum</i>	Clo	
8310	Q9S720	27.49/27.36	6.80/6.75	Proteína 3 que contiene el dominio PsbP	Función molecular Unión de iones de calcio y esencial para la fotosíntesis.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
6406	D3PFC2	52.05/56.59	5.58/5.53	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa de cadena larga	Esta enzima cataliza la etapa de carboxilación en el ciclo de Calvin, acompaña el proceso que almacena la energía atrapada por la fotosíntesis y también cataliza la etapa de oxigenación en la fotorrespiración, durante la cual una cantidad considerable de la energía almacenada se convierte en calor.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	
5305	P04778	28.24/27.82	5.35/5.34	Proteína de unión a la clorofila a/b 1	El complejo de recolección de luz (LHC) funciona como un receptor de luz, captura y entrega energía de excitación a fotosistemas con los que está estrechamente asociado.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
6405	P10896	51.98/49.71	5.69/5.69	Ribulosa bisfosfato carboxilasa / oxigenasa activasa	La activación de RuBisCO implica la carboxilación dependiente de ATP del grupo epsilon-amino de lisina que conduce a una estructura de carbamato.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
6312	P23322	34.94/34.57	5.61/5.59	Proteína potenciadora de la evolución del oxígeno 1	Estabiliza el grupo de manganeso que es el sitio principal de división de agua.	<i>Solanum lycopersicum</i>	Clo	
4308	Q1W2P5	26.64/31.59	4.92/4.94	Fotosistema II	Estas moléculas son capaces de captar la energía lumínica procedente del Sol y transformarla en energía útil.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	
5413	Q9SAJ4	42.13/44.86	5.35/5.29	Fosfoglicerato quinasa	Esta proteína está implicada en el paso 2 de la vía secundaria que sintetiza piruvato a partir de D-gliceraldehído 3-fosfato.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	
9207	Liu et al., 2011	25.01/25.05	6.92/6.93	Tilacoide lumenal proteína 19 kDa	Unión de iones de calcio y está involucrada en la fotosíntesis.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	

9408	P00876	52.89/57.63	6.87/6.91	Ribulosa bisfosfato carboxilasa subunidad larga	Cataliza dos reacciones: la carboxilación de D-ribulosa 1,5-bisfosfato, el evento principal en la fijación de dióxido de carbono, así como la fragmentación oxidativa del sustrato de pentosa en el proceso de fotorrespiración.	<i>Nicotiana tabacum</i>	Clo	
5415	P19366	53.93/48.92	5.27/5.22	ATP sintasa subunidad beta	Produce ATP de ADP en presencia de un gradiente de protones a través de la membrana. Los sitios catalíticos están alojados principalmente por las subunidades beta.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
4408	P56757	55.32/50.71	5.11/5.06	ATP sintasa subunidad alfa	Produce ATP de ADP en presencia de un gradiente de protones a través de la membrana. La cadena alfa es una subunidad reguladora.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
5511	Liu et al., 2011	75.01/70.12	5.37/5.33	Metaloproteasa de zinc dependiente de ATP FTSH 5 (VAR1)	Parte de un complejo que funciona como una metalopeptidasa de zinc dependiente de ATP. Involucrado en la formación de tilacoides y en la eliminación de D1 dañado en el fotosistema II.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
8309	Liu et al., 2016	27.2/27.14	6.76/6.81	FeSOD	Protección contra estrés fotooxidativo.	<i>Ginkgo biloba</i>	Clo	
4307	Chen et al., 2011	37.1/33.26	5.13/5.12	Proteína de unión a la clorofila a-b 1, cloroplástica	El complejo de recolección de luz (LHC) funciona como un receptor de luz, captura y entrega energía de excitación a fotosistemas con los que está estrechamente asociado.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
6313	L8GFB0	33.65/32.54	5.77/5.82	Proteína similar a 4-nitrofenilfosfatasa	Función molecular. Actividad fosfatasa, esencial en la fotosíntesis.	<i>Acanthamoeba castellanii str. Neff</i>	Clo	
7809	Q9T0P4	177.77/172.54	6.23/6.26	Glutamato sintasa dependiente de ferredoxina 2	Jugar un papel importante en la asimilación primaria de nitrógeno en las raíces, y podría proporcionar un nivel constitutivo de glutamato para mantener un nivel basal de síntesis de proteínas.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
7811	Q9ZNZ7	176.75/178.59	5.77/5.82	Glutamato sintasa dependiente de ferredoxina 1	Participa en la biosíntesis de glutamato en la hoja. Requerido para la reasimilación de iones de amonio generados durante la fotorrespiración y está involucrada en el metabolismo del nitrógeno.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo y Mit	

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

5610	Q8W0A1	91.54/91.67	5.59/5.54	Beta-galactosidasa 2	Hidrólisis de residuos de beta-D-galactosa no reductores terminales en beta-D-galactósidos.	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	Reg. Ext.	
9207	Q45NH4	24.17/25.05	6.95/6.93	Alfa-glucosidasa	Función molecular Enlace de carbohidratos.	<i>Medicago sativa</i>	Otros	
7303	Q7FAH2	36.77/36.67	6.32/6.27	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2	Enzima clave en la glucólisis que cataliza el primer paso de la ruta mediante la conversión de D-gliceraldehído 3-fosfato en 3-fosfo-D-gliceroil fosfato. Esencial para el mantenimiento de los niveles celulares de ATP y del metabolismo de los carbohidratos.	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	Cyt	
9306	P25856	42.49/44.78	6.99/6.99	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Esta proteína está involucrada en la ruta del ciclo de Calvin y glucólisis, que es parte de la biosíntesis de carbohidratos.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
7403	Q9M5K2	53.98/52.13	6.26/6.31	Dihidrolipoil deshidrogenasa 2	Esta proteína probablemente se incorpora en complejos de alfa-cetoácido deshidrogenasa. En las plantas, está asociada a la glucólisis y el ciclo de ácido tricarbóxico.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mit	
9406	Q9FLW9	63.52/63.47	7.04/6.99	Plastidial piruvato quinasa 2	Esta sub-ruta es parte de la ruta glucólisis, que es en sí misma parte de la degradación de carbohidratos.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mit y Clo	

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

7609	O50008	84.35/85.67	6.47/6.51	5-metiltetrahydropterotriglutamato – homocisteína metiltransferasa 1	Cataliza la transferencia de un grupo metilo de 5-metiltetrahydrofolato a homocisteína, dando como resultado la formación de metionina.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cito	
------	--------	-------------	-----------	----------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------	------	--

5414	P23686	43.15/41.91	5.31/5.26	S-adenosilmetionina sintasa 1	Cataliza la formación de S-adenosilmetionina a partir de metionina y ATP. La reacción comprende dos pasos que son ambos catalizados por la misma enzima: formación de S-adenosilmetionina y trifosfato.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	
5511	Q9SE60	66.28/70.12	5.38/5.33	Metilentetrahidrofolato reductasa 1	La probable reversibilidad de la reacción de MTHFR en las plantas sugiere que pueden metabolizar el grupo metilo de 5,10-metilentetrahidrofolato a serina, azúcares y almidón.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cito	
6313	P46637	37.34/32.54	5.85/5.82	Arginasa 1, mitocondrial	Cataliza la hidrólisis de L-arginina a urea y L-ornitina. Este último puede utilizarse en el ciclo de la urea o como un precursor para la síntesis tanto de poliaminas como de prolina. Posee actividad agmatinasa. Cataliza la formación de putrescina a partir de agmatina.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mit	
8512	Q9S7B5	57.77/62.13	6.61/6.66	Treonina sintasa 1	Esta proteína está implicada en el paso 5 de la vía secundaria que sintetiza L-treonina a partir de L-aspartato.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	

METABOLISMO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

7407	Q9LEB4	45.24/46.76	6.25/6.27	Proteína de unión a poliadenilato RBP45	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea en una proteína que se une a la cola de poli (A) del ARNm y que probablemente participe en algunos pasos de la maduración previa al ARNm.	<i>Nicotiana glauca</i>	Nuc	
4406	Q43349	36.00/32.83	4.98/5.01	Ribonucleoproteína de 29 kDa, cloroplástica	Estabiliza los ARNm de cloroplastos específicos. Requerido para el desarrollo normal de cloroplastos bajo condiciones de estrés por frío mediante la estabilización de transcripciones de numerosos ARNm en estas condiciones.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
2409	A0A076KXA0	41.10/43.57	4.41/4.45	Proteína de reparación de ADN supuesta proteína similar a RAD23-3	Función molecular Enlace de ADN dañado.	<i>Nicotiana glauca</i>	Nuc	

4616	H6UJ40	134.99/132.59	4.99/4.96	Proteína tipo espliceosomal	Función molecular Enlace de ácidos nucleicos.	<i>Camellia sinensis</i>	Nuc	
8813	O04716	146.79/148.11	6.79/6.78	Proteína de reparación del desajuste de ADN MSH6	Componente del sistema de reparación de desemparejamiento de ADN post-replicativo. Forma el heterodímero MutS alfa, que se une a las incompatibilidades de ADN iniciando la reparación del ADN.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc	
5705	Q8H0U8	133.03/132.75	5.54/5.49	Helicasa de ARN DEAD box	Se requiere helicasa para el empalme previo al ARNm, la regulación génica sensible al frío y la tolerancia al frío.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc	
4307	Q5JK90	28.17/33.26	5.07/5.12	Ribonucleasa 3	Fragmenta el ARN bicatenario (ARNds).	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	Nuc	

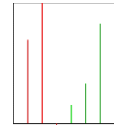
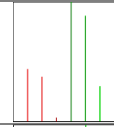
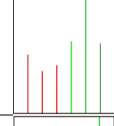
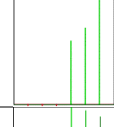
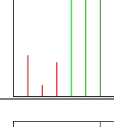
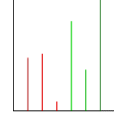
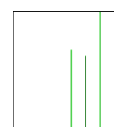
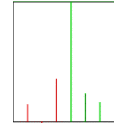
METABOLISMO DE LÍPIDOS

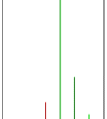
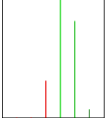
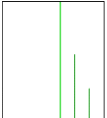
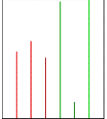
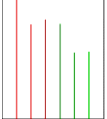
4308	Q6K439	33.92/31.59	4.98/4.94	Probable proteína asociada a lípidos de plástidos 2	Función molecular Unión de iones de calcio.	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	Clo	
5611	Q9LD43	85.31/90.98	5.46/5.41	Subunidad alfa de la acetil-coenzima A carboxilasa carboxiltransferasa	Componente del complejo acetil coenzima A carboxilasa. Primero, la biotina carboxilasa cataliza la carboxilación de la biotina en su proteína transportadora y luego el grupo CO ₂ es transferido por la carboxiltransferasa a acetil-CoA para formar malonil-CoA.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
8509	O65202	74.30/74.96	6.84/6.83	Acil-CoA oxidasa 1	Cataliza la desaturación de acil-CoA de cadena tanto larga como media a 2-trans-enoil-CoAs.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Per	
5613	Q38882	91.85/94.37	5.32/5.27	Fosfolipasa D alfa 1	Hidroliza glicerol-fosfolípidos en el enlace fosfodiéster terminal para generar ácidos fosfatídicos. Juega un papel importante en diversos procesos celulares, incluida la acción de las fitohormonas y la respuesta al estrés.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mem, Vac, RE y Mit	

6508	Q9SSQ9	91.59/89.96	5.57/5.62	Fosfolipasa D alfa 2	Hidroliza glicerol-fosfolípidos para generar ácidos fosfatídicos. Juega un papel importante en la acción de las fitohormonas y la respuesta al estrés, caracterizada por la acidificación de la célula.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Vac	
7607	P58766	93.36/94.38	6.06/6.11	Fosfolipasa D alfa 3	Hidroliza glicerol-fosfolípidos para generar ácidos fosfatídicos. Positivamente media las respuestas de la planta a las tensiones hiperosmóticas y promueve el crecimiento de la raíz, la floración y la evitación del estrés.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cyt	
8607	Q9C888	86.77/91.84	6.74/6.71	Fosfolipasa D alfa 4	Hidroliza glicerol-fosfolípidos terminal para generar ácidos fosfatídicos. Promueve el crecimiento y desempeña un papel en la señalización del nitrógeno.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mem	
8701	Q9LRZ5	124.51/129.25	6.72/6.71	Fosfolipasa D zeta 1	Hidroliza glicerol-fosfolípidos para generar ácidos fosfatídicos. Regula la morfogénesis del cabello radicular. Involucrado en la elongación de la raíz durante la limitación de fosfato.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	

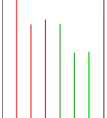
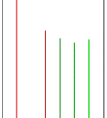
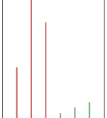
METABOLISMO DE PROTEÍNAS

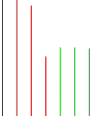
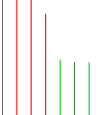
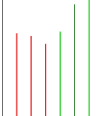
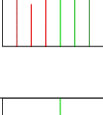
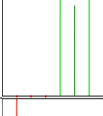
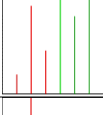
7109	D2IX34	10.64/10.89	6.23/6.22	Proteína tipo disulfuro isomerasa	Función molecular Actividad isomerasa.	<i>Gloeospermu blakeanum</i>	Otros	
6604	P31542	102.24/103.54	5.94/5.89	Subclase de unión a ATP de la proteasa Clp dependiente de ATP Clp A	Puede interactuar con una proteasa de tipo ClpP implicada en la degradación de proteínas desnaturalizadas en el cloroplasto.	<i>Solanum lycopersicum</i>	Clo	
5615	Q8VY06	121.13/121.81	5.14/5.15	Presecuencia de proteasa 2, cloroplástica / mitocondrial	Proteasa independiente de ATP que degrada los péptidos de tránsito tanto mitocondriales como cloroplásticos después de su escisión.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo y Mit	
5204	Q9XI91	17.36/19.06	5.2/5.16	Factor de iniciación de traducción eucariótico 5A-1	El F-5A 1 puede funcionar como una proteína bimodular capaz de unirse tanto al ARN como a las proteínas. Involucrada en la xilogénesis.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	

5205	Q93VP3	17.14/16.5	5.32/5.33	Factor de iniciación de traducción eucariótico 5A-2	Regula la especificación de protoxilema de raíz mediada por citoquinina y reprime de forma específica la expresión de AHP6. Regula la inducción de muerte celular programada causada por infección con un agente patógeno virulento.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc	
5110	Q9C505	17.21/16.38	5.33/5.38	Factor de iniciación de traducción eucariótico 5A-3	Se encuentra involucrado en apoyar el crecimiento y juega un papel regulador en la respuesta al estrés osmótico y nutricional subletal.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	
3610	Q9SZD6	103/98.73	4.88/4.83	Factor de elongación TU mitocondrial	Se asocia con el complejo EF-TU.GDP e induce el intercambio de GDP a GTP.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mit	
2225	P48006	25.13/22.97	4.33/4.28	Factor de elongación 1-delta 1	EF-1-beta y EF-1-delta estimulan el intercambio de GDP unido a EF-1-alfa a GTP.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	
4808	A8MS85	185.03/181.49	4.97/4.92	Transcripción de factor de alargamiento SPT6 homólogo	Factor de elongación de la transcripción que mejora la elongación de la transcripción por la ARN polimerasa II.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc	
7812	A0A178U9P2	161.89/160.10	6.31/6.34	Factor de traducción homólogo de GUF1, mitocondrial	Promueve la síntesis de proteínas mitocondriales. Puede actuar como un factor de fidelidad de la reacción de traducción, al catalizar una translocación hacia atrás de un codón de ARNs en ribosomas translocados incorrectamente.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mit	
5706	Q8L785	119.77/124.79	5.51/5.51	Glicina - ARNt ligasa, cloroplástica / mitocondrial 2	Cataliza la unión de glicina a ARNt También es capaz de producir diadenosina tetrafosfato, una molécula de señalización pleiotrópica universal necesaria para las vías de regulación celular, por condensación directa de 2 ATP.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mit y Clo	
3308	Q0V7X4	35.52/31.89	4.48/4.43	Factor de transcripción inducida por deficiencia de hierro	Regula FRO2 en el nivel de acumulación de ARNm e IRT1 en el nivel de acumulación de proteínas. Confiere respuestas de movilización de hierro mejoradas con bajo suministro de hierro.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc	

4811	Q9SGH2	240.43/235.86	5.09/5.09	Proteína que contiene el dominio de unión a metil-CpG 9	Probable regulador transcripcional que actúa como histona acetiltransferasa. Media la acetilación de la histona H3 y H4 de los loci diana.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc	
3213	Q9SLG0	15.18/16.11	4.77/4.74	Subunidad Y del factor de transcripción nuclear B-1	Componente del complejo factor de transcripción NF-Y / HAP. El complejo NF-Y estimula la transcripción de varios genes reconociendo y uniéndose a un motivo CCAAT en promotores.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc	
3813	Q9SIV5	195.05/200.86	4.60/4.58	Proteína que contiene el dominio CCCH del dedo de zinc 19	Juega un papel central en la integración del silenciamiento del ARN y las señales de la cromatina en la metilación del ADN dependiente de ARNip de 21 nt en la ruta de la citosina que conduce al silenciamiento génico transcripcional de secuencias específicas.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc	
5418	Liu et al., 2011	59/63.52	5.25/5.24	Chaperoninas	Las chaperoninas son proteínas que proporcionan condiciones favorables para el plegamiento correcto de otras proteínas, evitando así la agregación.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
4508	Q8VZ40	69.39/69.11	4.81/4.82	Proteína que contiene el dominio U-box 14	Funciona como una ubiquitina ligasa E3 con enzimas específicas de conjugación de ubiquitina E2. Se somete a la ubiquitinación automática.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc	

RELACIONADAS CON EL TRANSPORTE

4508	Q56WK6	64.05/69.11	4.77/4.82	Patellin 1	Proteína portadora que puede estar involucrada en eventos de tráfico de membrana asociados con la formación de la placa celular durante la citocinesis.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	
3510	Q94C59	61.18/66.89	4.51/4.56	Patellin 4	Proteína portadora que puede estar involucrada en eventos de tráfico de membrana asociados con la formación de la placa celular durante la citocinesis.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	
3509	Q9M0R2	75.75/79.56	4.61/4.66	Patellin 5	Proteína portadora que puede estar involucrada en eventos de tráfico de membrana asociados con la formación de la placa celular durante la citocinesis.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	

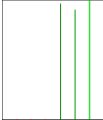
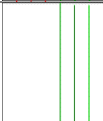
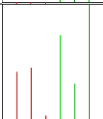
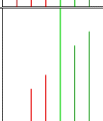
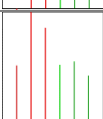
6117	F4I600	10.44/14.83	5.73/5.68	Vacuolar ATP sintasa relacionada con la subunidad catalítica	Componente esencial de la bomba de protones vacuolar, que cataliza la translocación de protones a través de las membranas.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Vac	
4506	Q9SM09	68.68/73.37	5.09/5.08	Subunidad catalítica A del protón ATPasa de tipo V	La ATPasa vacuolar V-ATPasa es responsable de acidificar una variedad de compartimentos intracelulares en células eucarióticas.	<i>Citrus unshiu</i>	Otros	
4408	P56757	55.32/50.71	5.11/5.06	ATP sintasa subunidad alfa	Proteína relacionada al transporte de electrones.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
5415	P19366	53.93/48.92	5.27/5.22	ATP sintasa subunidad beta	Proteína relacionada al transporte de electrones.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
8309	P41916	25.28/27.14	6.86/6.81	Proteína nuclear de unión al GTP Ran-1	Proteína de unión a GTP implicada en el transporte nucleocitoplasmático. Requerido para la importación de proteínas en el núcleo y también para la exportación de ARN. Involucrada en muchos procesos fisiológicos, como crecimiento, interferencia cruzada de señales de hormonas vegetales y respuesta al estrés.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc	
2704	O81283	160.81/165.58	4.33/4.33	Translocasa de cloroplasto 159	Parece reconocer las proteínas precursoras destinadas al cloroplasto y regular su presentación al canal de translocación a través de la hidrólisis de GTP.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
3608	Q9SLF3	132.28/138.11	4.67/4.62	Translocasa de cloroplasto 132	Parece reconocer las proteínas precursoras destinadas al cloroplasto y regular su presentación al canal de translocación a través de la hidrólisis de GTP.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
2219	P93829	19.32/24.19	4.47/4.44	Proteína D de la familia PRA1	Puede estar involucrado en el tráfico intracelular secretora y endocítica en los compartimentos endosomal / prevacuolar.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	End	
9608	Q9M081	116.32/121.52	7.01/6.96	Proteína de transporte de proteínas Sec24	Componente de la capa de COPII, que cubre las vesículas derivadas de RE involucradas en el transporte desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RE y AG	

ORGANIZACIÓN CELULAR

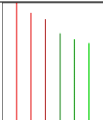
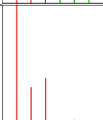
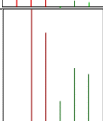
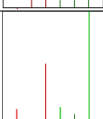
4206	Q39251	15.74/16.71	5.05/5.07	Factor despolimerizante de actina 2	Requerido para crecimiento celular normal, desarrollo de plantas, expansión de órganos celulares y floración. Esencial para la infección por nematodos del nudo de la raíz.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CiE	
3214	Q42449	14.27/13.76	4.60/4.65	Profilina 1	Se une a la actina y afecta la estructura del citoesqueleto.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CiE	
3107	Q42418	13.99/10.28	4.81/4.83	Profilina 2	Se une a la actina y afecta la estructura del citoesqueleto.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CiE	
3408	P29515	50.75/54.12	4.65/4.64	cadena de tubulina beta 7	La tubulina es el principal constituyente de los microtúbulos.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CiE	
3409	P24636	49.82/44.82	4.67/4.68	cadena de tubulina beta 4	La tubulina es el principal constituyente de los microtúbulos.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CiE	
3309	Q9SHJ6	36.12/32.57	4.71/4.71	Factor divisor peroxisomal y mitocondrial 2	Involucrado en la morfogénesis y la proliferación de mitocondrias. No está involucrado en la proliferación peroxisomal.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mit	

METABOLISMO DE HORMONAS

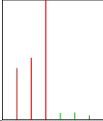
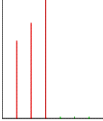
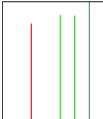
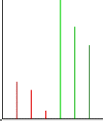
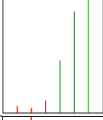
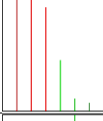
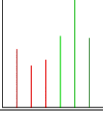
5310	O81439	34.95/35.46	5.33/5.32	Proteína asociada a lípidos plastídicos 1	Probablemente involucrado en la biosíntesis de jasmonato relacionado con el estrés luz / frío.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
2408	O82291	40.51/47.23	4.37/4.38	Proteína asociada a lípidos plastídicos 3	Probablemente involucrado en la biosíntesis de jasmonato relacionado con el estrés luz / frío.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	

8307	Q9LS02	27.74/32.37	6.75/6.70	Proteínas de óxido de aleno ciclasa 2	Involucrado en la producción de ácido 12-oxo-fitodienoico, un precursor del ácido jasmónico.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
6315	O82656	37.79/35.36	5.61/5.65	Tirosina fosfatasa	Desempeña un papel principal en la transducción de señal de las auxinas.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc y Cito	
7204	A0A1P8AXW0	20.83/21.16	6.39/6.43	Acetona-cianohidrina liasa	Proteína involucrada en el metabolismo de IAA que puede hidrolizar MeIAA en IAA.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	
6309	P32961	38.15/37.89	5.59/5.61	Nitrilasa 1	Puede convertir el indol-3-acetonitrilo en la hormona vegetal ácido indol-3-acético.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo, Cito, Reg Ext y Mem	
3212	P13689	21.97/21.47	4.71/4.68	Proteína de unión a auxina 1	Receptor para la auxina de la hormona de la planta.	<i>Zea mays (Maize)</i>	RE	

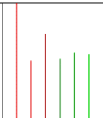
ESTRÉS Y DEFENSA

7303	O80944	34.68/36.67	6.23/6.27	Familia 4 Aldo-keto reductasa, miembro C8	Puede funcionar como enzima detoxificante al reducir una gama de aldehídos y cetonas tóxicos producidos durante el estrés.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cito	
8209	Q96305	14.21/17.63	6.61/6.63	Glutaredoxina-C7	Tiene una actividad de glutatión-disulfuro oxidoreductasa en presencia de NADPH y glutatión reductasa. Reduce disulfuros y proteínas de bajo peso molecular.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc	
1215	P27161	16.93/17.12	4.18/4.18	Calmodulina	La calmodulina media el control de un gran número de enzimas (quinasas y fosfatasa), canales iónicos y otras proteínas mediante Ca ²⁺ .	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cyt	
4614	Q9STX5	94.21/98.85	4.85/4.89	Homólogo de endoplasmina	Requerida para el meristemo apical del brote, de la raíz y la formación del meristemo floral. Involucrada en la resistencia a la tunicamicina o estrés elevado inducido por calcio.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RE	

4507	P22953	71.35/71.34	5.03/4.98	Probable mediador de la subunidad de transcripción ARN polimerasa II 37e	Proteína de choque térmico probablemente involucrada en la respuesta de defensa.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nuc	
4308	Q9M2U5	29.94/31.59	4.93/4.94	Endoquinasa EP3	Probablemente involucrado en una reacción de hipersensibilidad a la infección por <i>Xanthomonas campestris</i> .	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PCel	
2307	P25765	33.63/33.02	4.54/4.52	Quitinasa 1-2	Hidroliza la quitina y desempeña un papel en la defensa contra los patógenos fúngicos que contienen quitina.	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	Otros	
3310	P24626	33.68/38.87	4.71/4.76	Quitinasa 3	Hidroliza la quitina y desempeña un papel en la defensa contra los patógenos fúngicos que contienen quitina.	<i>Oryza sativa subsp. indica (Rice)</i>	Otros	
4406	Q9FE01	27.12/32.83	5.05/5.01	L-ascorbato peroxidasa 2, citosólica	Juega un papel clave en la eliminación de peróxido de hidrógeno	<i>Oryza sativa subsp. indica (Rice)</i>	Cito	
5204	Manaa <i>et al.</i> , 2011	19.07/19.06	5.11/5.16	Glutación peroxidasa	Respuesta al estrés oxidativo, es un componente fundamental del ciclo glutatión-ascorbato, sistema que reduce el peróxido de nitrógeno.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cyt	
9509	B7TZ47	102.25/102.35	6.85/6.89	Lipoxigenasa	Las lipoxigenasas de plantas pueden estar involucradas en una serie de diversos aspectos como la resistencia a las plagas y la senescencia o las respuestas a las heridas.	<i>Camellia sinensis</i>	Mit	
5614	Q06327	98.05/97.46	5.20/5.15	Linoleato 9S-lipoxigenasa 1	Las lipoxigenasas de plantas pueden estar involucradas en una serie de diversos aspectos como la resistencia a las plagas y la senescencia o las respuestas a las heridas.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cyt	
8508	Q96528	56.76/54.27	6.61/6.66	Catalasa 1	Se produce en casi todos los organismos de respiración aeróbica y sirve para proteger las células de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	

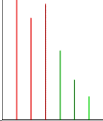
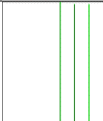
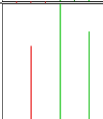
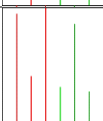
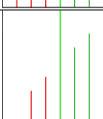
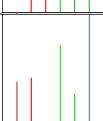
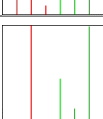
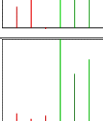
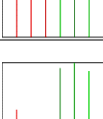
8204	Q5EEY7	22.96/22.91	6.82/6.83	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	Destruye los radicales que normalmente se producen dentro de las células y que son tóxicos para los sistemas biológicos.	<i>Lilium hybrid cultivar</i>	Mit	
9206	O78310	22.24/19.83	7.01/6.96	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] 2	Destruye los radicales que normalmente se producen dentro de las células y que son tóxicos para los sistemas biológicos. Media la tolerancia al estrés, incluido el estrés fotooxidativo.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
8609	P23312	103.97/99.37	6.71/6.69	Nitrato reductasa [NADH]	Esta enzima juega un papel clave en la síntesis de óxido nítrico (NO), una importante molécula de señalización que está involucrada en los procesos fisiológicos y de desarrollo, además, el NO juega un papel importante en las respuestas de las plantas al estrés biótico y abiótico.	<i>Spinacia oleracea</i>	Otros	
6313	P22242	33.7/32.54	5.83/5.82	Proteína relacionada con la desecación PCC13-62	Procesos biológicos con respuesta celular a la desecación y a la salinidad.	<i>Craterostigma plantagineum (Blue gem)</i>	Otros	
1212	B4FVM0	17.67/21.12	4.04/4.01	Proteína similar a la osmotina	Juegan un papel importante en el ajuste osmótico para tolerar las condiciones de sequía.	<i>Zea mays</i>	Otros	
4205	B3H4F3	19.34/17.09	5.01/4.98	Proteína de tipo MLP 28	Respuesta de defensa a estímulos bióticos.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	
4206	Q9XEX2	17.43/16.71	5.03/5.07	Peroxiirredoxina -2B	Reduce el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos de alquilo con equivalentes reductores proporcionados a través del sistema de tiorredoxina o glutaredoxina.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	

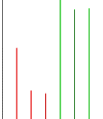
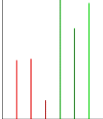
METABOLISMO SECUNDARIO

5419	O04499	60.58/65.22	5.15/5.19	2,3-bisfosfoglicerato mutasa 1	Cataliza la interconversión de 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Otros	
------	--------	-------------	-----------	--------------------------------	---------------------------------------------------------------------	-----------------------------	-------	---------------------------------------------------------------------------------------

7514	P35510	78.72/77.74	6.25/6.24	Fenilalanina amonionliasa 1	Esta es una enzima clave del metabolismo de las plantas que cataliza la primera reacción en la biosíntesis de la L-fenilalanina de una amplia variedad de productos naturales basados en el esqueleto de fenilpropano. Esencial para la biosíntesis de fenilpropanoides.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cyt	
7304	P13114	43.11/39.54	6.51/6.47	Chalcona sintasa	Esta proteína está involucrada en la vía de la biosíntesis de flavonoides, que es parte de la biosíntesis del metabolito secundario.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RE, Vac y Nuc	
4407	Li <i>et al.</i> , 2015	45.76/45.82	5.02/4.98	Flavonol sintasa	Función molecular, oxidorreductasa, unión de iones metálicos y participa en la biosíntesis de flavonoides.	<i>Camellia sinensis</i>	Otros	
6312	Q7XR84	36.84/34.57	5.61/5.59	Flavanona 3-dioxigenasa 3	Cataliza la 3-beta-hidroxilación de 2S-flavanonas a 2R, 3R-dihydroflavonoles que son intermedios en la biosíntesis de flavonoles, antocianidinas, catequinas y proantocianidinas en plantas.	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	Otros	
7407	O22886	46.25/46.76	6.32/6.27	Uroporfirinógeno descarboxilasa 1	Esta proteína está involucrada en la vía de la biosíntesis de clorofila, que es parte del metabolismo compuesto que contiene porfirina.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
8512	Q38893	61.63/62.13	6.61/6.66	Zeta-caroteno desaturasa	Juega un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Es esencial para la biosíntesis de carotenoides. Los carotenoides están involucrados en diferentes procesos fisiológicos, que incluyen coloración, fotoprotección, biosíntesis de ABA y biogénesis de cloroplastos.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
8206	F4K0D0	26.97/23.01	6.82/6.77	Quinona reductasa de tipo flavodoxina 1	Se encuentra involucrada en la respuesta de auxina, y puede proteger las células de la planta contra el estrés oxidativo inducido por IAA.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Vac y Mem	
8608	Q8L6C6	76.56/76.59	6.81/6.78	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa	Es una enzima limitante para la biosíntesis de isoprenoides plastídicos y esencial para el desarrollo de cloroplastos.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	

7512	A0A0P0DYT7	77.24/76.83	6.32/6.37	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa 1	Es una enzima limitante para la biosíntesis de isoprenoides plastídicos y esencial para el desarrollo de cloroplastos.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	
7513	A0A0P0EUA6	77.93/76.99	6.21/6.21	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa 2	Es una enzima limitante para la biosíntesis de isoprenoides plastídicos y esencial para el desarrollo de cloroplastos.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	
6507	A0A0N7I617	78.36/83.46	5.83/5.82	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa 3	Es una enzima limitante para la biosíntesis de isoprenoides plastídicos y esencial para el desarrollo de cloroplastos.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	
8511	A0A0P0DZZ8	76.66/75.96	6.56/6.61	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa 4	Es una enzima limitante para la biosíntesis de isoprenoides plastídicos y esencial para el desarrollo de cloroplastos.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	
7403	Q8L6C5	51.02/52.13	6.35/6.31	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa 1	Enzima de la ruta del plastidio esencial para la biosíntesis de isoprenoides y requerida para el desarrollo de cloroplastos.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	
5421	A0A0P0EG81	50.20/55.11	5.47/5.47	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa 2	Enzima de la ruta del plastidio esencial para la biosíntesis de isoprenoides y requerida para el desarrollo de cloroplastos.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	
9306	Q2I6J9	44.25/44.78	7.04/6.99	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol kinasa	Enzima de la ruta MEP (plástidos) requerida para la biosíntesis de isoprenoides, esencial para el desarrollo de cloroplastos.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	
8307	Q2I6K0	34.95/32.37	6.72/6.70	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa	Enzima de la ruta MEP (plástidos) requerida para la biosíntesis de isoprenoides, esencial para el desarrollo de cloroplastos y necesaria para la biosíntesis de pigmentos y giberelinas.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	
7511	Q0PUV7	82.15/86.21	6.33/6.38	(E) 4-Hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato sintasa	Función molecular Esencial para el proceso biosintético de terpenoides y el desarrollo de los cloroplastos.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	

8308	A0A0P0ELT1	33.55/30.08	6.72/6.77	Isopentenil pirofosfato: dimetilalil pirofosfato isomerasa 1	Cataliza la isomerización de DMAPP a partir de IPP. Es esencial en la ruta del MEP y MVA para crear terpenos y terpenoides.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo y Cyt	
5310	A0A0P0E551	36.60/35.46	5.34/5.32	Isopentenil pirofosfato: dimetilalil pirofosfato isomerasa 2	Cataliza la isomerización de DMAPP a partir de IPP. Es esencial en la ruta del MEP y MVA para crear terpenos y terpenoides.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo y Cyt	
5416	Q2I6K1	51.51/48.59	5.42/5.37	IPP/DMAPP sintasa	Proceso biosintético del IPP y DMAPP de la ruta MEP y MVA.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo y Cyt	
7305	A0A0P0ERP6	40.32/38.87	6.55/6.50	Geranilgeranil pirofosfato sintasa 2	Función molecular Esencial para el proceso biosintético de carotenoides.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	
6309	A0A0P0EL13	38.63/37.89	5.61/5.61	Geranilgeranil pirofosfato sintasa 3	Función molecular Esencial para el proceso biosintético de carotenoides.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Clo	
7611	Q38802	93.01/92.93	6.20/6.22	Ent-copalil difosfato sintasa	Cataliza la conversión de geranilgeranil difosfato en el precursor de giberelinas, copalil difosfato, iniciando así su biosíntesis.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clo	
4613	Q0JA83	84.14/89.76	5.00/4.99	Ent-kaureno sintasa	Cataliza la conversión de copalil difosfato a kaureno el cual es oxidado por la enzima kaureno oxidasa dando ácido kaurénico precursor de la síntesis de giberelinas y glucósidos de esteviol.	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	Clo	
8513	Q6VAB0	54.46/54.27	6.67/6.68	UDP-glucosiltransferasa 85C2	Involucrado en la biosíntesis de glucósidos de esteviol en hojas. Convierte esteviol en esteviolmonósido y el glucósido en rubusósido.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Vac	
5415	Q8LKG3	52.21/48.92	5.23/5.22	UGT-glucosiltransferasa	En <i>Stevia rebaudiana</i> , la UGT está involucrada en la producción de glucósidos de esteviol, transfiriendo un residuo de glucosa de un donante activado a una molécula aceptora. Convierte el esteviolmonósido en esteviolbiósido.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Vac	

6405	Q6VAA6	51.40/49.71	5.74/5.69	UDP-glucosiltransferasa 74G1	Involucrado en la biosíntesis de glucósidos de esteviol en hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> . Convierte el esteviolbíosido en esteviósido y el esteviol en glucósido.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Vac	
5420	Q6VAB4	52.07/49.96	5.24/5.29	UDP-glucosiltransferasa 76G1	Involucrado en la biosíntesis de glucósidos de esteviol en hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> . Convierte el esteviósido en el rebaudiósido A y B.	<i>Stevia rebaudiana</i>	Vac	

DESCONOCIDAS

4617	Q9SA26	126.78/128.79	5.01/4.98	Proteína F3O9.7	Funcionalidad molecular Fuente de enlace ATP.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cito y Nuc	
7111	P24805	17.03/14.21	6.11/6.16	Proteína TSJT1 específica del tallo	Función desconocida.	<i>Nicotiana tabacum</i>	Otros	

A: número de mancha proteica dentro del gel. **B:** número de acceso de la base de datos www.uniprot.org o referencia de artículo. **C:** peso molecular teórico/experimental en kilodaltons. **D:** punto isoeléctrico teórico/experimental. **E:** nombre de las proteínas. **F:** Función biológica que desempeñan las proteínas dentro de la planta. **G:** especie de planta donde fue encontrada la proteína. **H:** ubicación celular de las proteínas: AG = aparato de Golgi, End = endosoma, Clo = cloroplasto, Cyt = citoplasma, Cito = citosol, CiE = citoesqueleto, Nuc = núcleo, Mem = membrana plasmática, Mit = mitocondria, PCell = pared celular, Per = peroxisoma, RE = retículo endoplásmico, Reg Ext = región exterior, Vac = vacuolas, y Otros = ubicación no definida (Ver Anexo 12). **I:** patrón de expresión entre réplicas dentro del gel 2-D, cada barra representa un gel.

7.5.5. Evaluación funcional de las proteínas identificadas

Las proteínas identificadas se clasificaron en categorías de acuerdo con sus actividades biológicas. En nuestro estudio el 21% (29 manchas proteicas) de las proteínas identificadas se relacionan con el metabolismo secundario, el 15% (20 manchas proteicas) se encontraron relacionadas con el estrés y defensa, el 14% (19 manchas proteicas) con la fotosíntesis y el 12% (17 manchas proteicas) con el metabolismo de proteínas (Fig. 36).

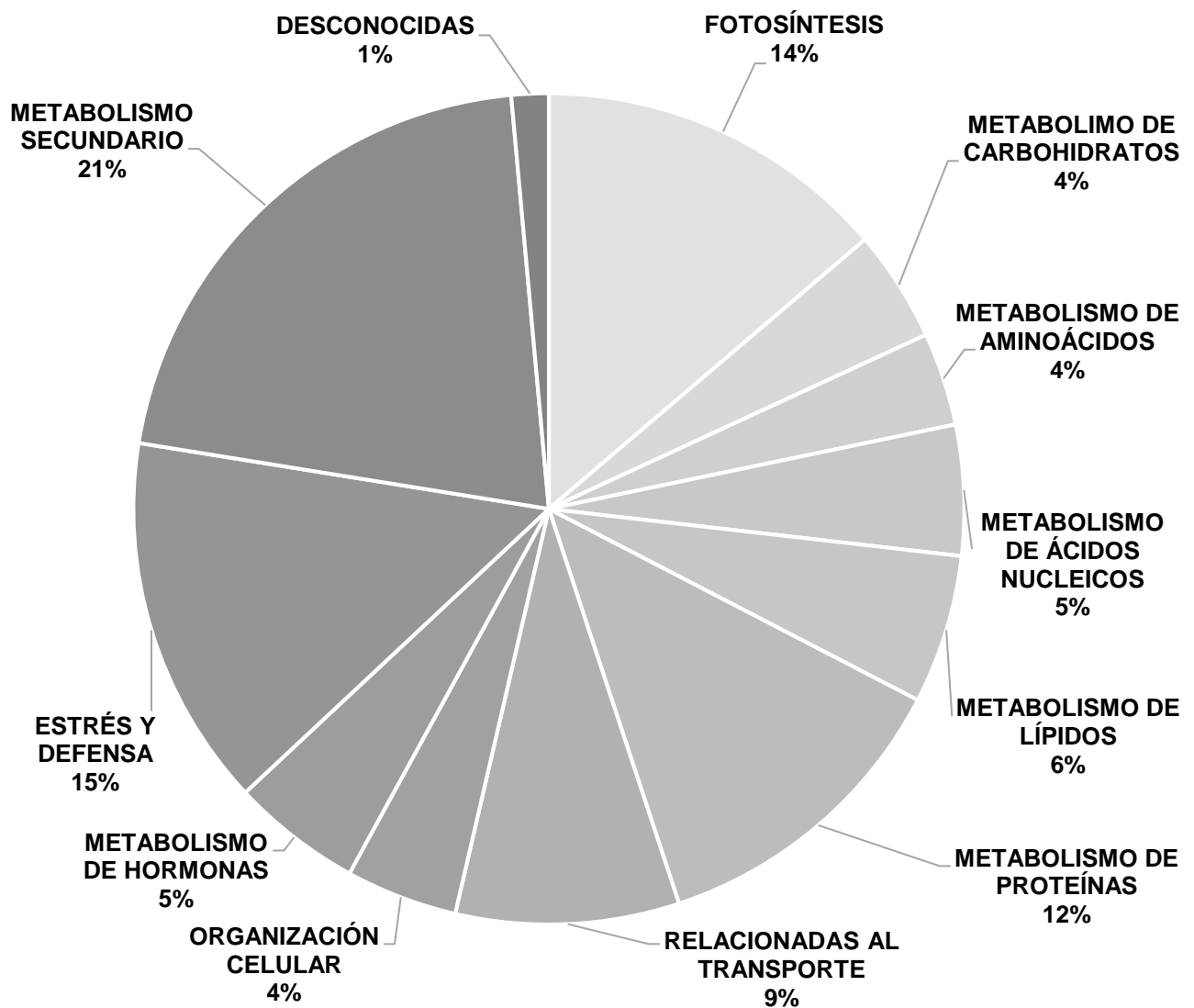


Fig. 36. Posible clasificación de proteínas expresadas diferencialmente en plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*. Considerando las 138 proteínas identificadas como el 100%.

Desde que se generó la primera planta transgénica a principios de la década de los 80's, los efectos involuntarios resultantes de la modificación genética se encuentran entre los temas clave en el procedimiento de evaluación de bioseguridad de las plantas transgénicas, especialmente en la producción de alimentos. Los genes marcadores seleccionables de resistencia a antibióticos y herbicidas se han utilizado para facilitar la generación de organismos genéticamente modificados (Ren *et al.*, 2009). En este estudio aplicamos el enfoque de proteómica para investigar las diferencias en la expresión de proteínas involucradas en diferentes procesos, entre las plántulas genéticamente modificadas (pCAMsrDXS) y plántulas con genotipo silvestre de *S. rebaudiana*. Nuestros resultados demuestran que los cambios en la expresión de proteínas entre ambos tipos de plántulas fueron significativos.

7.5.5.1. Proteínas concernientes a la fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso biológico clave en el crecimiento y desarrollo de las plantas, la cual se lleva a cabo en los cloroplastos (Li *et al.*, 2015). Basado en el análisis proteómico de *Arabidopsis thaliana*, el proteoma del cloroplasto comprende aproximadamente 4000 proteínas (Sun *et al.*, 2004). Entre ellas, 75-100 proteínas participan en el ensamblaje de complejos de múltiples subunidades, como fotosistema I, fotosistema II, citocromo b6f y la ATP sintasa en la membrana tilacoidal (Peltier *et al.*, 2004). Estos complejos crean y transfieren electrones de H₂O a NADP + y ADP, ejecutando las reacciones iniciales de conversión de energía, además también están involucrados en las rutas de fijación del carbono (Liu *et al.*, 2016). La mayoría de estas subunidades son proteínas altamente hidrófobas con un alto número de dominios transmembrana y difícilmente son detectables en IEF / SDS-PAGE estándar (Chen *et al.*, 2007). Sin embargo, en el presente estudio se lograron detectar manchas proteicas que pudieran corresponder al fotosistema II (mancha 4308) y dos subunidades de ATP sintasa, la beta (mancha 5415) y alfa (mancha 4408), las cuales se sobreexpresaron en las plántulas transformadas. Además, también se lograron identificar dos proteínas de unión a la clorofila a/b (mancha 5305 y 4307), la proteína 3 que contienen el dominio PsbP (mancha 8310), a piruvato fosfato diquinasas (mancha 5612) y a la proteína

similar a 4-nitrofenilfosfatasa (mancha 6313); todas estas proteínas son esenciales para la biosíntesis de clorofilas (Chen *et al.*, 2011), y se sobreexpresan en las plántulas transformadas; también se ha informado que las proteínas de unión a la clorofila a/b, están implicadas parcialmente en la señalización de ABA mediante la modulación de la homeostasis de especies reactivas de oxígeno (Xu *et al.*, 2011).

La ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) es la enzima de fijación de carbono inicial de la fotosíntesis y cataliza el primer paso del ciclo de Calvin para la asimilación de carbono (Spreitzer & Salvucci, 2002). Rubisco es la proteína más abundante en las hojas y constituye casi el 50% de la proteína soluble de la hoja en las plantas C3. Existen múltiples formas de esta proteína en las hojas de las plantas, y existe un equilibrio dinámico entre Rubisco y sus formas degradadas, lo que complica la determinación de la abundancia de Rubisco por 2-D (Zhao *et al.*, 2005). En este estudio, se identificaron cuatro manchas como subunidades de Rubisco, dos de las cuales (mancha 6406 y 6405) incrementaron en las plántulas transformadas y las otras (mancha 3406 y 9408) disminuyeron. También se observó que la proteína fosfoglicerato quinasa (mancha 5413), que participan en el ciclo de Calvin, aumento en abundancia en las plántulas transformadas.

La elevada asimilación de carbono y el poder reductor producido durante el proceso de la fotosíntesis podrían facilitar la eficiencia de uso de nitrógeno de la planta (Drake *et al.*, 1997). Como una nutrición crítica requerida por las plantas, el nitrógeno asimilado podría a su vez respaldar el uso de CO₂ para producir los componentes básicos de la acumulación de biomasa, como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, nucleótidos, clorofilas y muchos otros componentes metabólicos (Nunes-Nesi *et al.*, 2010). En nuestro estudio de la acumulación de biomasa, se determinó que las plántulas transformadas acumulaban una mayor cantidad en comparación a las silvestres, lo que pudiera sugerir que es a consecuencia de la sobreexpresión de las proteínas antes mencionadas. Por otro lado, también se identificaron dos manchas proteicas que se sugiere, puedan corresponder a dos glutamatos sintasas (manchas 7809 y 7811), las cuales desempeñan papeles esenciales al catalizar la condensación

de glutamato y amoníaco para formar glutamina (Hoshida *et al.*, 2000). Ambas proteínas aumentaron en abundancia en plantas transformadas, lo que sugiere que la capacidad de asimilación de nitrógeno en cloroplastos de las plántulas transformadas se mejoró en relación con las silvestres.

Estos cambios indican que las plántulas transformadas tienen una mejor capacidad de fijación de CO₂, en comparación a las silvestres, lo que acelera el proceso fotosintético soportando así las diferencias en la producción de clorofilas y carotenoides entre ambos tipos de plántulas, siendo la plántula transformada la mayor productora. Finalmente, también se ha reportado que la mejor coordinación de la asimilación de carbono y nitrógeno podría facilitar la síntesis de proteínas y otros procesos metabólicos (Nunes-Nesi *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2011); y se sugiere que por tal motivo, se observó una mayor detección de proteínas en las plántulas transformadas en comparación a las silvestres.

7.5.5.2. Proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos

El presente estudio proteómico reveló que el 4% de las proteínas identificadas estaban relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos; por ejemplo, en la glucólisis y el ciclo de ácido tricarbóxico (TCA). Dichos procesos metabólicos proporcionan no solo energía y cofactores, sino también sustratos importantes para la síntesis de metabolitos, como los fenoles y flavonoides; así como señales de retroalimentación (Gutierrez *et al.*, 2007). El análisis proteómico reveló que los niveles de 4 proteínas relacionadas con el ciclo de la glucólisis y el TCA, aumentaron en las plántulas silvestres. Tal fue el caso de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 1 y 2 (manchas 7303 y 9306), dihidrolipoil deshidrogenasa 2 (mancha 7403) y plastidial piruvato quinasa 2 (mancha 9406). Estos resultados indican que la glucólisis y el TCA aumentaron en las plántulas silvestres a diferencia de las transformadas; y se sugiere que por tal motivo, esto desencadena una mayor producción de compuestos fenólicos, como se explicó anteriormente.

7.5.5.3. Proteínas involucradas con el metabolismo de aminoácidos

Muchos aminoácidos se derivan de la ruta del metabolismo de carbohidratos, algunos de los cuales son precursores de metabolitos secundarios (Chen *et al.*, 2011). En particular, la biosíntesis de metionina, serina, prolina y treonina, podrían estar regulada positivamente en plántulas transformadas en comparación de las silvestres; ya que se detectaron 2 manchas proteicas que podrían corresponder a 5-metiltetrahydropteroyltryptophan synthase 1 (mancha 7609) y a S-adenosylmethionine synthase 1 (mancha 5414), las cuales son proteínas que se encuentran involucradas en la biosíntesis de metionina; por otro lado, la mancha 5511 podría corresponder a la proteína metilentetrahydrofolate reductase 1, que en las plantas sugiere que pueden metabolizar el grupo metilo de 5,10-metilentetrahydrofolate a serina. Así mismo, la arginase 1 mitocondrial (mancha 6313), cataliza la hidrólisis de L-arginina a urea y L-ornitina, y puede utilizarse en el ciclo de la urea o como un precursor para la síntesis de prolina. Finalmente, la mancha proteica 8512, se detectó como treonine synthase 1, esta proteína está implicada en el paso 5 de la vía secundaria que sintetiza L-treonine a partir de L-aspartate. Estos resultados sugieren que algunas proteínas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos se regularon positivamente como consecuencia de la transformación genética mediada por *A. rhizogenes*.

7.5.5.4. Proteínas afines con el metabolismo de ácidos nucleicos

Entre las proteínas relacionadas con las funcionalidades de ADN y ARN, se detectó una proteína implicada en el metabolismo del ARN mitocondrial, que también se encontró en el proteoma mitocondrial de *Arabidopsis* (Millar *et al.*, 2001). La helicasa de ARN DEAD box (mancha 5705), regulada positivamente en las plántulas transformadas, es una proteína que aún sigue sin estar clara su función, pero se predice que puede estar implicada en el despliegue de la transcripción durante, por ejemplo, los procesos de maduración o degradación del ARN. Por otro lado, también se detectó una mancha proteica (4307) que podría corresponder a una ribonuclease 3, la cual se sobreexpresó en las plántulas transformadas; esta proteína participa en

procesos como la replicación del ADN y en la transcripción, procesamiento y edición del ARN (Deshpande & Shankar, 2002).

El reconocimiento inicial de los errores de ADN se lleva a cabo mediante complejos heterodímeros conocidos como MutS α (MSH2-MSH6) y MutS β (MSH2-MSH3). MutS α reconoce los desajustes base-base y los bucles de inserción (Acharya *et al.*, 1996; Genschel *et al.*, 1998); en este estudio, se detectó una mancha proteica (8813) que se expresaba de igual manera en ambas plántulas, la cual podría corresponder a la proteína MSH6; así mismo, se detectó una proteína de reparación de ADN (mancha 2409), lo que sugiere que en la reparación de los errores del ADN no hubo diferencia entre ambos tipos de plántulas.

Por otra parte, la mancha 4616, podría corresponder a una proteína del tipo espliceomal, la cual se sobreexpresó en las plántulas transformadas; esta proteína es un conjunto de ribonucleoproteínas que realiza el empalme de ARN, el cual es un proceso post-transcripcional de maduración del ARN del cual eliminan ciertos fragmentos secuenciales. (Valadkhan & Jaladat, 2010; Will & Lührmann, 2011).

La poliadenilación es la adición de una cola de poli(A) a un ARN mensajero. La cola de poli(A) consiste en múltiples adenosín monofosfatos; en otras palabras, es un trozo de ARN formado solo de bases adenina. En plantas, la poliadenilación es parte del proceso que produce el ARNm maduro para su traducción. Por lo tanto, forma parte del proceso de expresión génica (Proudfoot *et al.*, 200). Este proceso podría estar regulado de forma positiva en plántulas transformadas ya que se reveló una mancha proteica que podría corresponder a la proteína del tipo de unión a poli(A), poliadenilato RBP45 (mancha 7407).

7.5.5.5. Proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos

Dos proteínas implicadas con la biosíntesis de lípidos podrían sobreexpresarse en las plántulas transformadas, es decir, la probable proteína asociada a lípidos de plástidos

2 (mancha 4308) y la subunidad alfa de la acetil-coenzima A carboxilasa carboxiltransferasa (mancha 5611). Por otro lado, la acil-CoA oxidasa 1 (mancha 8509), se reguló positivamente en las plántulas silvestres. Las investigaciones fisiológicas y moleculares han revelado que el metabolismo de los ácidos grasos / lípidos se puede modificar en respuesta a la sequía (Benhassaine-Kesri *et al.*, 2002; Gasulla *et al.*, 2013); y se supone que, una mayor composición de ácidos grasos insaturados en los lípidos de la membrana puede contribuir a una tolerancia superior a la deshidratación foliar (Zhong *et al.*, 2011), además de que pueden ayudar a mantener la integridad de la membrana y preservar la compartimentación celular bajo estrés hídrico (Gigon *et al.*, 2004).

Por otro lado, se detectaron 5 manchas proteicas que se sobreexpresaban en las plántulas transformadas (mancha 5613, 6508, 7607, 8607 y 8701), las cuales podrían corresponder a las fosfolipasas D alfa 1, 2, 3, 4 y zeta 1. Todas estas proteínas están implicadas en la formación del ácido fosfatídico, el cual juega un papel importante en diversos procesos celulares, incluida la acción de las fitohormonas y la respuesta al estrés, caracterizada por la acidificación de la célula (Wang *et al.*, 2000; Qin & Wang, 2002; Hong *et al.*, 2008a). Además, puede estar involucrado en la remodelación lipídica de la membrana (Zien *et al.*, 2001). La D alfa 1, media los efectos del ABA sobre los estomas a través de la interacción con GPA1 y la producción de ácido fosfatídico que se une a ABI1 (Devaiah *et al.*, 2007; Mane *et al.*, 2007). Por otro lado, la D alfa 2, juega un papel importante en diversos procesos celulares, incluida la acción de las fitohormonas y la respuesta al estrés, caracterizada por la acidificación de la célula. Así mismo, la D alfa 3, media positivamente las respuestas de la planta a las tensiones hiperosmóticas y promueve el crecimiento de la raíz, la floración y la evitación del estrés (Hong *et al.*, 2008a; Hong *et al.*, 2008b). Por otra parte, la D alfa 4, promueve el crecimiento y desempeña un papel en la señalización del nitrógeno (Hong *et al.*, 2009). Finalmente, la D zeta1, regula la morfogénesis del pelo radicular (Ohashi *et al.*, 2003), y está involucrada en la elongación de la raíz durante la limitación de fosfato (Li *et al.*, 2006). Lo mencionado anteriormente, sugiere que estas proteínas regulaban positivamente el desarrollo y crecimiento de las plántulas transformadas,

sobre todo en las raíces, y quizás por tal motivo se observó una diferencia significativa en el crecimiento, desarrollo y acumulación de biomasa (parte aérea y raíz) de las plántulas transformadas en comparación con las silvestres.

7.5.5.6. Proteínas involucradas en el metabolismo de proteínas

La biosíntesis, metabolismo y transporte de proteínas en los cloroplastos son cruciales para la biogénesis y el desarrollo de los cloroplastos (Pogson & Albrecht, 2011). En el presente estudio, un total de 17 manchas proteicas se identificaron como proteínas que podrían estar involucradas en el metabolismo de proteínas. Una de ellas es el factor de iniciación de traducción eucariótico 5A-1 (F-5A-1 mancha 5204), la cual se cree que juega un papel importante en la maquinaria de traducción y facilita la síntesis de proteínas participando en la exportación nuclear de ARNm específicos (Park, 2006). Por otro lado, en *Arabidopsis*, se ha demostrado que se expresa en el tejido vascular, específicamente desarrollando el xilema y floema. Con el fin de determinar si realmente desempeña un papel en la formación del xilema y floema, su ADNc se sobreexpresó constitutivamente en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Observando que el análisis microscópico reveló que el área de sección transversal del xilema en los tallos de inflorescencia principal de las plantas transgénicas era 1,9 veces mayor que la de los tallos de inflorescencia correspondientes de las plantas silvestres (Liu *et al.*, 2008). En la evaluación del diámetro de tallo, se observó un patrón similar en las plántulas transformadas de *S. rebaudiana*, utilizadas en el presente estudio, ya que dichas plántulas fueron de un grosor de tallo estadísticamente mayor en comparación a las silvestres. Estos datos indican colectivamente que el F-5A-1 podría jugar un papel importante en la xilogénesis en *S. rebaudiana*.

Otra proteína que tiene relación con el metabolismo de proteínas es el F-5A-2 (mancha 5205). Dicha proteína es altamente conservada y se encuentra en todos los organismos eucarióticos (Xu *et al.*, 2011). Se sugiere que está principalmente involucrada en el metabolismo y tráfico de ARN, regulando así la proliferación celular, el crecimiento celular y la muerte celular programada (Feng *et al.*, 2007; Hopkins *et al.*,

2008). En plantas, la función fisiológica de esta proteína permanece en gran parte desconocida. Sin embargo, se han realizados estudios para conocer que función es la que cumplen; un ejemplo de ello es el realizado por Feng *et al.*, (2007), ellos informaron que un mutante de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresaba al F-5A-2, mostró defectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, con tamaño sustancialmente reducido y número de todos los órganos adultos. Por otro lado, Ren *et al.*, (2013), realizaron experimentos con un mutante de *Arabidopsis* (FUMONISIN B1-RESISTANT12), que codifica un factor de iniciación de la traducción eucariota 5A-2; ellos concluyeron que la expresión de esta proteína causa un desarrollo defectuoso del protoxilema y una sensibilidad reducida a la citoquinina. El F-5A-2, resultó inducido en plántulas silvestres de *S. rebaudiana*, utilizadas en el presente trabajo, dicha planta resultó ser de un menor tamaño y un tallo más delgado, en comparación a las plántulas transformadas, concluyendo que el F-5A-2 causa efectos desfavorables en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

La F-5A-3, es la última proteína que codifica en el factor de iniciación de traducción eucariótico 5A. En *Arabidopsis thaliana*, plántulas transgénicas que sobreexpresaban el F-5A-3, exhibieron un crecimiento vegetativo y reproductivo mejorado. Particularmente, la expresión F-5A-3 fue detectable en el floema, en las células compañeras, de raíces, tallos y hojas, en las células epidérmicas de la punta de la raíz, en las células de columela del caparazón de la raíz y en el tejido chalazal de óvulos fertilizados, y todos juegan un papel fundamental en la translocación de nutrientes o hormonas (Ma *et al.*, 2010). Por lo tanto, F-5A-3 parece estar involucrado en apoyar el crecimiento y desarrollo de las plántulas. Resultados similares se observaron en plántulas transformadas de *S. rebaudiana*, utilizadas en el presente estudios, las cuales al parecer sobreexpresaban el F-5A-3 (mancha 5110); y resultaron ser más grandes, con un número mayor se hojas y raíces en comparación a las plántulas silvestres.

Otras dos proteínas importantes que quizá se detectaron con mayor expresión en las plántulas transformadas, fueron la subclase de unión a ATP de la proteasa Clp

dependiente de ATP Clp A (mancha 6604), la cual puede interactuar con una proteasa de tipo ClpP implicada en la degradación de proteínas desnaturalizadas en el cloroplasto. La otra es la presecuencia de proteasa 2, cloroplástica / mitocondrial (mancha 5615), que es una proteasa independiente de ATP que degrada los péptidos de tránsito tanto mitocondriales como cloroplásticos después de su escisión. También degrada otros péptidos no estructurados. Específica para péptidos en el rango de 10 a 65 residuos, y muestra una preferencia por la escisión después de residuos polares pequeños y antes de residuos básicos, pero sin ninguna preferencia posicional (Ståhl *et al.*, 2002).

Por otra parte, otras dos manchas proteicas que se indujeron en plántulas transformadas, pudieran corresponder a otros dos factores involucrados en la síntesis de proteínas; el factor de elongación TU mitocondrial (mancha 3610) y el factor de elongación 1-delta 1 (mancha 2225). Estas proteínas también están involucradas en actividades metabólicas de la célula de la planta y el crecimiento general (Ngara *et al.*, 2012). Quizá la inducción de estas proteínas en las plántulas transformadas también influyó en las diferencias observadas en ambos tipos de plántulas utilizadas en el presente estudio.

Se relacionó una mancha proteica (4508), que se indujeron en las plántulas silvestres, con una proteína del tipo ubiquitina, la cual es una pequeña proteína reguladora que ha sido encontrada en la mayoría de los tejidos de los organismos eucariotas. Una de sus muchas funciones es dirigir el reciclaje de proteínas (Zamudio-Arroyo *et al.*, 2012). Por otro lado, también se detectó una proteína del tipo chaperonina (mancha 5418), que se sobreexpresó en las plántulas transformadas; son proteínas que proporcionan condiciones favorables para el plegamiento correcto de otras proteínas, evitando así la agregación.

Finalmente, 7 manchas proteicas se sobreexpresaron en las plántulas transformadas, las cuales podrían estar relacionadas con la transcripción génica y la traducción de proteínas, que incluyen una proteína de la familia del dedo de zinc (mancha 3813), a

la subunidad Y del factor de transcripción nuclear B-1 (mancha 3213), un factor de transcripción inducida por deficiencia de hierro (mancha 3308), la glicina - ARNt ligasa, cloroplástica / mitocondrial 2 (mancha 5706), un factor de alargamiento homólogo de SPT6 (mancha 4808), un factor de traducción homólogo de GUF1, mitocondrial (mancha 7812) y una proteína que contiene el dominio de unión a metil-CpG 9 (mancha 4811) (Yaish *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Pontier *et al.*, 2012). La inducción de proteínas relacionadas con los factores de transcripción y transducción en las plántulas transformadas de nuestro estudio sugiere que la transformación genética mediada por *A. rhizogenes* indujo la transcripción y transducción de las proteínas dentro de dichas plántulas y por consecuencia un mayor número de proteínas en comparación a las plántulas silvestres.

7.5.5.7. Proteínas asociadas con el transporte

12 manchas proteicas fueron detectadas como proteínas que se encuentran relacionadas con el transporte; dentro de ellas, 3 proteínas de la familia patellin (1, 4, 5), que se sobreexpresaron en las plántulas silvestres (mancha 4508, 3510 y 3509), pueden estar involucradas en eventos de tráfico de membrana asociados con la formación de la placa celular durante la citocinesis, además, se unen a algunas moléculas hidrofóbicas y promueven su transferencia entre los diferentes sitios celulares (Peterman *et al.*, 2004).

Otras dos proteínas sobreexpresadas en las plántulas silvestres podrían corresponder a las mancha 6117 y 4506, son la vacuolar ATP sintasa relacionada con la subunidad catalítica y la subunidad catalítica A del protón ATPasa de tipo V, respectivamente; las cuales son requeridas para la resistencia a múltiples tensiones, y pueden estar involucradas en el transporte de antioxidantes lipófilos dentro y fuera del plastoglobule. También puede catalizar la translocación de protones a través de las membranas. Requeridas para el ensamblaje y la actividad de la V-ATPasa. La ATPasa vacuolar V-ATPasa es responsable de acidificar una variedad de compartimentos intracelulares en células eucarióticas (Dettmer *et al.*, 2005; Brück *et al.*, 2008; Krebs *et al.*, 2010).

Por el contrario, 2 proteínas que se sobreexpresan en las plántulas transformadas, las cuales fueron identificadas como fundamentales para el proceso fotosintético, también fueron relacionadas con el transporte, ya que son las principales en el transporte de electrones dentro de los cloroplastos, dichas proteínas son, la ATP sintasa subunidad alfa (mancha 4408) y subunidad beta (mancha 5415); estas subunidades forman la porción catalítica extrínseca del complejo ATP sintasa y habitualmente están estrechamente acopladas a la membrana tilacoidal que cataliza la conversión de ADP en ATP utilizando el potencial electroquímico generado durante el transporte de electrones fotosintéticos (Chen *et al.*, 2011). Dichas proteínas podrían estar relacionadas con los resultados observados en la producción de clorofilas y carotenoides, del presente trabajo, ya que al estar sobreexpresadas en las plántulas transformadas hace el proceso fotosintético más eficiente en comparación al de las plántulas silvestres.

Por otro lado, la mancha 8309 se detectó como una proteína nuclear de unión al GTP Ran-1, la cual se sobreexpresó en la plántula transformadas, dicha proteína está involucrada en el tráfico de vesículas, eventos de señalización intracelular y muchos procesos fisiológicos importantes, como crecimiento, entrecruzamiento de señales de hormonas vegetales y respuesta al estrés (Wang *et al.*, 2016).

Finalmente, 2 proteínas de la familia translocasa cloroplásticas, se sobreexpresaron antagónicamente en las plántulas de *S. rebaudiana*; la translocasa de cloroplasto 159 (mancha 2704), en las transformadas y la translocasa de cloroplasto 132 (mancha 3608), en las silvestres; ambas proteínas parecen reconocer las proteínas precursoras destinadas al cloroplasto y regular su presentación al canal de translocación a través de la hidrólisis de GTP. Requerido para la biogénesis por cloroplastos. Probablemente se especializan en la importación de preproteínas fotosintéticas codificadas nucleares desde el citoplasma hasta el cloroplasto (Kubis *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; Hust *et al.*, 2006). Estos resultados proponen que dichos procesos se encuentran regulados de forma similar en ambos tipos de plántulas, utilizadas en el presente estudio.

7.5.5.8. Proteínas relacionadas con la organización celular

Las proteínas que tienen que ver con la organización celular son cruciales para la división celular, el movimiento, la morfogénesis y transducción de señales (Bommer & Thiele, 2004). En el presente estudio proteómico diferencial, se detectaron proteínas del citoesqueleto, como el factor despolimerizante de actina 2 (mancha 4206), dos profilinas, 1 (mancha 3214) y 2 (mancha 3107), y 2 cadenas de tubulina beta, la 7 (mancha 3408) y la 4 (mancha 3409), y una proteína involucrado en la morfogénesis y la proliferación de mitocondrias, mancha 3309, que puede corresponder a el factor divisor peroxisomal y mitocondrial 2. De todas estas proteínas, sobresale el factor despolimerizante de actina 2, el cual se sobreexpresó en las plántulas transformadas y está relacionado con el crecimiento celular normal, desarrollo de plantas, expansión de órganos celulares y floración (Ketelaar *et al.*, 2004; Clément *et al.*, 2009). Lo que sugiere que esta proteína también influyo en las diferencias que se observaron en el desarrollo y crecimiento de las plantas utilizadas en el presente estudio. Por otro lado, la sobreexpresión de estas proteínas en general fue mayor en las plántulas transformadas, lo que sugiere que el crecimiento celular se aceleró en las plántulas transformadas en comparación a las silvestres.

7.5.5.9. Proteínas involucradas en el metabolismo de hormonas

Las hormonas vegetales son un grupo de sustancias orgánicas naturales que influyen en los procesos fisiológicos a bajas concentraciones. Los procesos influenciados consisten principalmente en el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo celular, aunque otros procesos, como el movimiento de los estomas, también pueden verse afectados. Más allá del ABA, que juega un papel sustancial en el estrés hídrico, otras hormonas como auxinas, giberelinas y/o los jasmonatos están involucradas en dichos procesos (Davies, 2010; Peleg *et al.*, & Blumwald, 2011). Nuestro análisis proteómico revelo 3 proteínas que se sobreexpresaron en las plántulas transformadas, las cuales corresponden a las manchas 5310 y 2408, relacionadas con las proteínas asociadas a lípidos plásticos 1 y 3, respectivamente, y la mancha 8307, se identificó como la

proteína de óxido de aleno ciclasa 2; todas estas proteínas están involucradas en la biosíntesis de jasmonatos (Browse, 2009; Youssef *et al.*, 2010). Los jasmonato y sus derivados son hormonas vegetales a base de lípidos que regulan una amplia gama de procesos en las plantas, desde el crecimiento, la fotosíntesis y hasta el desarrollo reproductivo (Schaller & Stintzi, 2009; Wasternack, 2009). La inducción de estas proteínas dentro de las plántulas transformadas sugiere que están relacionadas con las diferencias que se observaron entre ambos tipos de plántulas (silvestres y transformadas), en cuanto al desarrollo y crecimiento, siendo las plántulas transformadas superior a la silvestre.

Por otro lado, 4 manchas proteicas se relacionaron con la biosíntesis de auxinas. 3 de ellas se sobreexpresaron en las plántulas transformadas, la tirosina fosfatasa (mancha 6315), la acetona-cianohidrina liasa (mancha 7204) y la Nitrilasa 1 (mancha 6309), y se detectó solo una regulada positivamente en las plántulas silvestres, la proteína de unión a auxina 1 (mancha 3212). Es bien sabido que las auxinas como IAA es la hormona del crecimiento tanto del hipocótilo como de la raíz (Okushima *et al.*, 2005; Teale *et al.*, 2006). En general, la sobreexpresión de las proteínas involucradas en la biosíntesis de auxinas fue mayor en las plántulas transformadas, lo que sugiere que estas proteínas son responsables del aumento en el crecimiento y desarrollo de las plántulas transformadas, tanto del tallo como de las raíces; concluyendo que la agrotransformación mediada por *A. rhizogenes* desencadena la inducción de proteínas que tienen que ver con la biosíntesis de hormonas.

7.5.5.10. Proteínas afines con el estrés y defensa

Se sabe que el estrés biótico o abiótico como insectos, nematodos, hongos, bacterias, sequía, salinidad, frío y/o calor, producen tensiones secundarias, como el estrés osmótico y oxidativo (Wang *et al.*, 2003). La mayoría de estos estreses generan la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales pueden atacar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Apel & Hirt 2004; Bai *et al.*, 2001). Para controlar o contrarrestar el daño, las plantas responde a estas tensiones de una manera

compleja, lo que resulta en proteínas similares que responden a diferentes tensiones (Kozłowski & Pallardy, 2002; Bajguz & Hayat, 2009). En el presente estudio, 20 (15%, Fig. 36) proteínas relacionadas con el estrés y defensa se identificaron en ambos tipos de plántulas (silvestres y transformadas).

En las plántulas transformadas se indujeron 10 proteínas, de las que destacan, la endoquinasa EP3 (mancha 4308) y las quitinasas 1, 2 (mancha 2307) y 3 (mancha 3310), las cuales están involucradas en la defensa a la infección por bacterias, como las *Xanthomonas campestris* (Liliane *et al.*, 1997), y en la defensa contra patógenos fúngicos que contienen quitina (Kim *et al.*, 2003; Mizuno *et al.*, 2008). Por otro lado, se relacionó la mancha 8609 con la nitrato reductasa [NADH], la cual es una proteína que desempeña un papel clave en la síntesis de óxido nítrico (NO) (Rockel *et al.*, 2002), una importante molécula de señalización que media los procesos fisiológicos y de desarrollo. Además, el NO juega un papel importante en las respuestas de las plantas al estrés biótico y abiótico (Qiao & Fan, 2008; Moreau *et al.*, 2010; Corpas *et al.*, 2011). También, se informó que el NO modula las vías de señalización de etileno, ácido salicílico y ácido jasmónico y el cierre estomático inducido por ABA (Lamattina *et al.*, 2003; Wendehenne *et al.*, 2004). Por otra parte, la 1212, se vinculó con la una proteína similar a la osmotina, que juegan un papel importante en el ajuste osmótico para tolerar las condiciones de sequía (Barthakur *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2015).

La mancha proteica 4206 se relacionó con la peroxirredoxina -2B; esta proteína reduce el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos de alquilo con equivalentes reductores proporcionados a través del sistema de tiorredoxina y glutaredoxina (Dietz *et al.*, 2006). Por otra parte, se detectó a glutatión peroxidasa (mancha 5204). Esta proteína puede constituir un sistema de protección contra el estrés oxidativo. Involucrado positivamente en la vía de señalización del ABA, regulando numerosas respuestas de ABA, como el cierre de los estomas, la germinación de la semilla y la inhibición del crecimiento vegetativo. Oxida y reprime las proteínas diana (por ejemplo, la actividad fosfatasa de ABI1 y ABI2) cuando se oxida por H₂O₂, probablemente después de la señalización de ABA. Modula la actividad del canal de calcio en células de protección

en respuesta a ABA o H₂O₂; y confiere tolerancia al estrés por sequía, mejorando el cierre estomático dependiente de ABA (Miao *et al.*, 2006).

Finalmente, también se detectó la L-ascorbato peroxidasa 2, citosólica (mancha 4406) y un homólogo de endoplasmina (mancha 4614); la 4406 juega un papel clave en la eliminación de peróxido de hidrógeno, también juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas, protegiéndolas de las tensiones abióticas (Lu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013). La 4614, es requerida para el meristemo apical del brote, el meristemo apical de la raíz y la formación de meristemos florales. También participa en la elongación del tubo de polen. Involucrado en la resistencia a la tunicamicina o estrés inducido por alto calcio. Posee actividad de ATPasa (Ishiguro *et al.*, 2002; Chong *et al.*, 2014). La sobreexpresión de estas proteínas en las plántulas transformadas, no solo tienen que ver con la defensa y el estrés, como se mencionó anteriormente, sino que también juegan un papel crucial en el desarrollo de las plántulas en general, y se sugiere que por la sobreexpresión de estas proteínas, las plántulas transformadas sean de un mayor tamaño, mayor número de hojas y raíces, en comparación a las plántulas silvestres, utilizadas en el presente estudio.

Al igual que en las plántulas transformadas, en las plántulas silvestres también se sobreexpresaron 10 proteínas involucradas con la defensa y el estrés; entre ellas la mancha 4507 se relacionó con la probable mediador de la subunidad de transcripción ARN polimerasa II 37e. Proteína de choque térmico que probablemente está involucrada en la respuesta de defensa. (Noël *et al.*, 2007). Así mismo, la mancha 7303, se relacionó a la proteína aldo-ceto reductasa, esta proteína es una oxidorreductasa que actúa como enzima detoxificante al reducir una gama de aldehídos y cetonas tóxicos producidos durante el estrés (Bona *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2009).

Por otro lado, también se detectaron proteínas antioxidantes que tienen relación en contra de los daños oxidativos inducido por ERO. Dos superóxido dismutasa [Cu-Zn] (manchas 8204 y 9206), dos lipoxigenasas (manchas 9509 y 5614), la glutaredoxina-

C7 (mancha 8209) y una catalasa (mancha 8508). La sobreexpresión de superóxido dismutasa podría indicar que, en las plántulas silvestres, la regulación de las concentraciones de los radicales libres, que normalmente se producen dentro de las células y que son tóxicos para los sistemas biológicos, se encuentra en niveles que no afectan a las plántulas. Por otro lado, se ha informado que estas proteínas median la tolerancia al estrés, incluido el estrés fotooxidativo (Abarca *et al.*, 2001; Sunkar *et al.*, 2006). De la misma forma, las lipoxigenasas de plantas pueden estar involucradas en una serie de diversos aspectos de la fisiología de las plantas, la resistencia a las plagas y la senescencia o las respuestas a las heridas. Funcionan como reguladores del desarrollo de la raíz al controlar la aparición de raíces laterales (Vellosillo *et al.*, 2007; Bannenberg *et al.*, 2009). La inducción de estas proteínas en las plántulas silvestres, podrían ser responsables de las diferencias en la acumulación de biomasa, que se presentó entre ambos tipos de plántulas utilizadas en este trabajo (Fig. 19 B). Las catalasas se producen en casi todos los organismos de respiración aeróbica y sirve para proteger las células de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno (Willekens *et al.*, 1997). Finalmente, la glutaredoxina-C7, tiene una actividad de glutatión-disulfuro oxidorreductasa en presencia de NADPH y glutatión reductasa. Reduce disulfuros y proteínas de bajo peso molecular. Las glutaredoxinas son pequeñas oxidorreductasas que participan en diversos procesos celulares y desempeñan un papel crucial en las respuestas al estrés oxidativo (Xing & Zachgo 2008).

La sobreexpresión de estas proteínas (en ambos tipos de plántulas) sensibles al estrés no debería sorprender, ya que es un mecanismo de defensa natural que responde, como se mencionó anteriormente, a cualquier estrés biótico / abiótico, con el fin de mantener a las células en las mejores condiciones funcionales.

7.5.5.11. Proteínas relacionadas con los metabolitos secundarios

Se sabe que los MetS son moléculas que desempeñan un papel importante en la adaptación de las plantas a su entorno, y también representan una importante fuente de productos farmacéuticos activos (Bourgaud *et al.*, 2001). En el presente trabajo de

proteómica diferencial, la mayor detección de proteínas tuvo relación con la biosíntesis de MetS (29 proteínas), principalmente en la biosíntesis de compuestos fenólicos y GEs, en plántulas silvestres y transformadas de *S. rebaudiana*.

En primer lugar, se relacionó a la mancha proteica 5419 con la fosfoglicerato mutasa, la cual es una enzima isomerasa que cataliza la octava etapa de la glucólisis. Cataliza la transferencia interna de un grupo fosfato desde el carbono C-3 al carbono C-2 que resulta en la conversión de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato a través del compuesto intermedio 2,3-bisfosfoglicerato (Zhao & Assmann, 2011). La glucólisis es una de las dos rutas de donde parte la ruta del Shikimato, la cual, lleva a cabo la biosíntesis de los compuestos fenólicos (Mandal *et al.*, 2010). Aparte de la proteína antes mencionada; varias manchas proteicas que se sobreexpresaron en las plántulas silvestres, se relacionaron con proteínas que estaban involucradas con la glucólisis, sugiriendo que la ruta del Shikimato se encontró más activa en las plántulas silvestres en comparación a las transformadas, lo que resultó en una mayor producción de compuestos fenólicos (Fig. 27).

La mancha proteica 7514, que se sobreexpresó en las plántulas silvestres, se detectó como la fenilalanina amoniaco-liasa, la cual es una enzima que cataliza la conversión de L-fenilalanina a amoníaco y ácido transcinámico (Camm & Towers, 1973). PAL reside en una posición metabólicamente importante, que une el metabolismo primario al metabolismo secundario. PAL es parte del primer paso comprometido en la ruta de los fenilpropanoides y es una enzima clave en la asignación de cantidades significativas de carbono de la fenilalanina a la biosíntesis de varios metabolitos secundarios importantes, como ligninas, flavonoides y cumarinas (Fritz *et al.*, 1976; Tanaka *et al.*, 1989). Se ha sugerido que el flujo global en el metabolismo de fenilpropanoides está regulado por PAL, que actúa como una enzima limitante de la velocidad (Bate *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2015).

Por otro lado, se detectaron otras tres proteínas involucradas en la biosíntesis de compuestos fenólicos, las cuales se sobreexpresaron en las plántulas silvestres; la

chalcona sintasa (mancha 7304), es fundamental para la biosíntesis de flavonoides y pigmentos en las plantas. Produce chalcona al condensar un p-coumaroil- y tres malonil-coenzima A tioésteres en una reacción de policétido intermedia que se cicla (Ferrer *et al.*, 1999). La flavonol sintasa (mancha 4407), es una dioxigenasa que convierte dihidroflavonoles en flavonoles, se encontró inicialmente en el perejil y se demostró que requiere 2-oxoglutarato y Fe / ascorbato para una actividad completa (Lin *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015). Finalmente, la flavanona 3-dioxigenasa 3 (mancha 6312), cataliza la 3-beta-hidroxilación de 2S-flavanonas a 2R, 3R-dihidroflavonoles que son intermedios en la biosíntesis de flavonoles, antocianidinas, catequinas y proantocianidinas en plantas (Kim *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2008). Estas proteínas también concuerdan con nuestros datos metabólicos, que muestran que, en comparación con las plántulas transformadas, el contenido de compuestos fenólicos fue mayor en las plántulas silvestres.

Por otra parte, también se identificaron enzimas involucradas en la biosíntesis de otros metabolitos secundarios, por ejemplo, uroporfirinógeno descarboxilasa (mancha 7407), involucrada en la biosíntesis de porfirinas (Chent *et al.*, 2011), zeta-caroteno desaturasa (mancha 8512), involucrada en la biosíntesis de carotenos y xantofilas (Bartley *et al.*, 1999), y quinona reductasa de tipo flavodoxina (mancha 8206) involucrada en la respuesta de auxinas, y se ha sugerido que puede proteger las células de la planta contra el estrés oxidativo (Ogawa *et al.*, 2003). Estas proteínas se sobreexpresaron en las plántulas transformadas, sugiriendo que la biosíntesis de otros MetS, importantes para las plantas, se encontró mayormente activa en las plántulas transformadas en comparación a las silvestres.

En relación con los GEs, se expresaron diferentes enzimas involucradas en su biosíntesis, como la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, que es la principal enzima en la ruta metabólica de MEP, ya que controla el 82% del flujo de la ruta (Cordoba *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2014). Se detectó la DXS (mancha 8608), que se sobreexpresó en las plántulas transformadas y 4 subunidades de esta enzima que se sobreexpresaron 2 en las plántulas transformadas (manchas 7513 y 8511) y las otras

2 en las silvestres (manchas 7512 y 6507). Por otro lado, también se detectó la segunda enzima de la ruta del MEP, la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa 1 (mancha 7403), que se sobreexpresó en las plántulas silvestres y la DXR 2, que solo se detectó en las plántulas transformadas (mancha 5421), esta enzima es requerida para el desarrollo de cloroplastos (Carretero-Paulet *et al.*, 2002; Carretero-Paulet *et al.*, 2006).

La 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol kinasa (mancha 9306) solo se detectó en las plántulas silvestres. Por el contrario, la 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa (mancha 8307) solo se expresó en las plántulas transformadas, la cual es una enzima requerida para la biosíntesis de isoprenoides, esencial para el desarrollo de cloroplastos y necesaria para la biosíntesis de pigmentos y giberelinas (Rohdich *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 2008). Esta última proteína quizá esté involucrada en las diferencias que se observaron entre las plántulas, siendo las plántulas transformadas de un mayor tamaño y mayor acumulación de biomasa.

Por otro lado, la (E) 4-Hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato sintasa (mancha 7511) y una isopentenil pirofosfato 1 (mancha 8308) se sobreexpresaron en las plántulas silvestres; en contraste la isopentenil pirofosfato 2 (mancha 5310), solo se expresó en las plántulas transformadas, esta enzima cataliza la isomerización de DMAPP a partir de IPP, para crear terpenos y terpenoides (Vranová *et al.*, 2013). De igual manera, la IPP/DMAPP sintasa (mancha 5416), se sobreexpresó en las plántulas transformadas y participa en el proceso biosintético del IPP y DMAPP de la ruta MEP y MVA.

Dos geranylgeranyl pirofosfato sintasa se detectaron en las plántulas utilizadas en este trabajado; la GGPPS 2 (mancha 7305) se sobreexpresó en las plántulas silvestres y la GGPPS 3 (mancha 6309) en las transformadas, esta enzima es esencial para el proceso biosintético de carotenoides (Cordoba *et al.*, 2009). Así mismo, otras dos enzimas se sobreexpresaron en las plántulas transformadas, la ent-copalil difosfato sintasa (mancha 7611), que cataliza la conversión de geranylgeranyl difosfato en el precursor de giberelinas, copalil difosfato, iniciando así su biosíntesis (Prisic *et al.*,

2007; Prisic & Peters, 2007; Mann *et al.*, 2010); y la ent-kaureno sintasa (mancha 4613), cataliza la conversión de copalil difosfato a kaureno el cual es oxidado por la enzima kaureno oxidasa dando ácido kaurénico precursor de la síntesis de giberelinas y glucósidos de esteviol (Totté *et al.*, 2000; Modi *et al.*, 2014). Estas dos enzimas son claves para diferentes procesos, como se mencionó anteriormente; es por ello que se sugiere que las diferencias fisiológicas entre las plántulas silvestres y transformadas sean tan evidentes, siendo las transformadas de un mayor tamaño y un mayor número de hojas, gracias a una mayor producción de giberelinas; por otro lado, la producción de GEs fue superior en las plántulas transformadas (Fig. 24), sugiriendo que estas dos proteínas influyeron para una mayor producción de estos compuestos de interés comercial.

Finalmente, también se detectaron las enzimas que llevan directamente a la producción de los GEs, las cuales se sobreexpresaron en las plántulas transformadas; la primera es la UDP-glucosiltransferasa 85C2 (mancha 8513), que se encuentra involucrada en la conversión de esteviol en esteviolmonósido y de glucósido a rubusósido (Richman *et al.*, 2005); la segunda enzima es la UGT-glucosiltransferasa (mancha 5415), en *S. rebaudiana*, la UGT está involucrada en la producción de glucósidos de esteviol, transfiriendo un residuo de glucosa de un donante activado a una molécula aceptora. Convierte el esteviolmonósido en esteviolbiósido (Totté *et al.*, 2000; Modi *et al.*, 2014); la tercera enzima es la UDP-glucosiltransferasa 74G1 (mancha 6405), convierte el esteviolbiósido en esteviósido y el esteviol en glucósido (Richman *et al.*, 2005); y la cuarta enzima es la UDP-glucosiltransferasa 76G1 (mancha 5420), esta enzima convierte el esteviósido en el rebaudiósido A y B (Richman *et al.*, 2005); estas enzimas pueden ser parte de todas las enzimas sobreexpresadas en las plántulas transformadas que influyeron para una mayor producción de GEs, en comparación a las silvestres. En la Fig. 37, se resumen todas las enzimas sobreexpresadas en las plántulas transformadas que pudieron haber llevado a una mayor producción de GEs y a ser responsables de las diferencias en los parámetros fisiológicos evaluados en el presente trabajo.



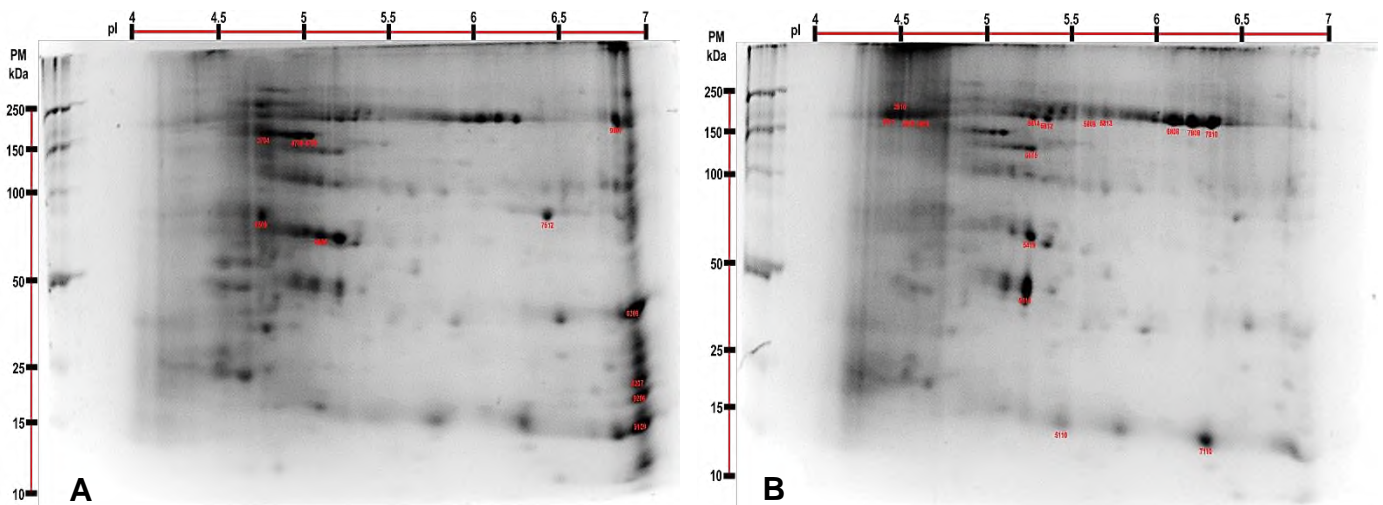
Fig. 37. Posibles enzimas responsables de las diferencias en los parámetros fisiológicos evaluados y la producción de glucósidos de esteviol entre las plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*. Las flechas rojas indican la inducción de las enzimas en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS).

7.5.6. Identificación de las proteínas por MALDI-TOF MS

Las metodologías proteómicas para la expresión diferencial son bastante tediosas por naturaleza; sin embargo, proporcionan una extensa información sobre las proteínas que se logran identificar. La identificación final posterior a la metodología proteómica involucra procedimientos de identificación que implican análisis de espectrometría de masas. En este trabajo se empleó una metodología proteómica de última generación MALDI-TOF MS, usada para la identificación de proteínas mediante huella digital de masa peptídica, y en este caso, para caracterizar péptidos de plántulas transformadas

(pCAMsrDXS) y silvestres de *S. rebaudiana*. Se seleccionaron las manchas proteicas de ambos geles que mostraron cambios en su expresión, eligiendo 11 de las plántulas silvestres y 16 de las transformadas (pCAMsrDXS) (Fig. 38 A y B). Finalmente, solo se pudieron examinar 3 manchas proteicas de las plántulas silvestres y 8 de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) (Fig. 38 C y D); esto se puede deber a que en el proceso de digestión se hayan degradado las proteínas haciendo imposible su recuperación.

Los datos se examinaron utilizando BioTools 3.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) en combinación con el algoritmo de búsqueda Mascot (versión 2.6.2.1) contra la base de datos de plantas verdes. Los resultados de MS mostraron que las 6 manchas proteicas identificadas con éxito, de las cuales, 2 se regularon positivamente en las plántulas silvestre - 4506 y 3509, y 4 en las transformadas (pCAMsrDXS) - 7810, 5419, 5110 y 7110 (Fig. 39), podrían corresponder con proteínas previamente reportadas en las bases de datos (Tabla 8), ya que a pesar de que la cobertura de las secuencias de la proteínas identificadas fue bajo, la identidad de todos los péptidos es del 100% (Ver anexo 13), indicando que muy probablemente las proteínas identificadas de las plántulas de *S. rebaudiana* correspondan a las ya reportadas en las bases de datos. Por otro lado, no se logró caracterizar 5 manchas proteicas, 1 de silvestre - 9807 y 4 de la transformada (pCAMsrDXS) - 2811, 2810, 2809, 2808 y 5814, ya que no hubo proteínas que coincidieran en la base de datos. Esto pudiera deberse a que aún se desconoce el proteoma de las plantas de *S. rebaudiana*.



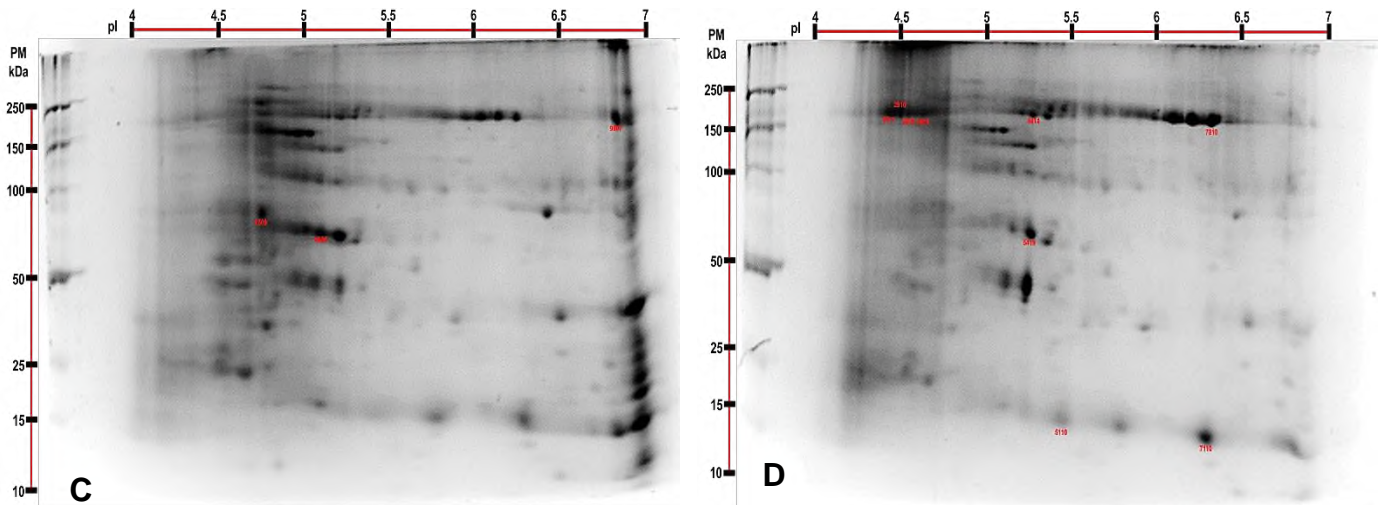


Fig. 38. Selección de manchas proteicas en geles 2-D SDS PAGE de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*. A: manchas proteicas seleccionadas de plántulas silvestres y B: transformadas (pCAMsrDXS). C: manchas proteicas analizadas por MALDI-TOF MS de plántulas silvestres y D: transformadas (pCAMsrDXS).

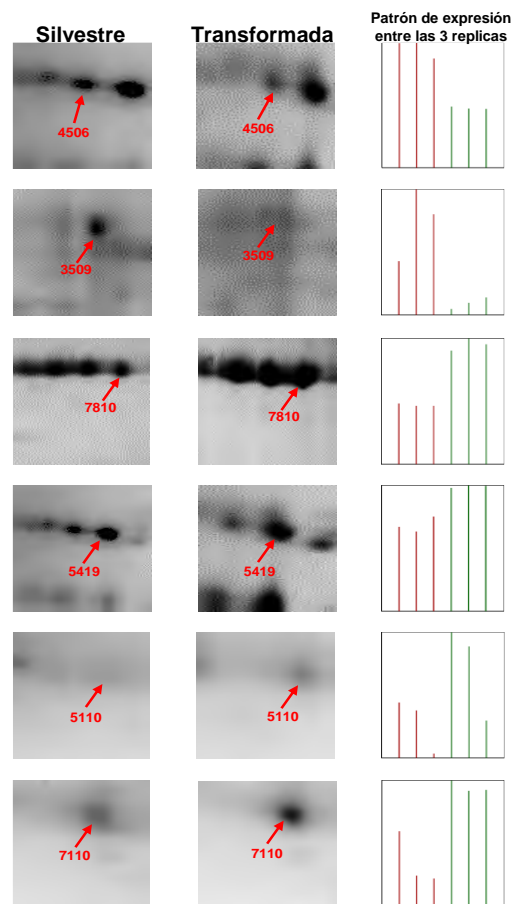


Fig. 39. Diferencia de expresión de las manchas proteicas analizadas por MALDI-TOF-MS de las plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*. Las líneas en rojo representan a las plántulas silvestres y las verdes a las transformadas (pCAMsrDXS).

Tabla 8. Posibles proteínas identificadas por MALDI-TOF de plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*.

No. Mancha ^A	No. Acceso ^B	PM (kDa) Teó/Exp ^C	pI Teó/Exp ^D	Nombre ^E	No. Péptido ^F	Secuencias de péptidos ^G	Cobertura ^H	Identidad ^I	UC ^J	Especie ^K
SILVESTRES										
4506	Q8S8N9	79.18/73.37	5.05/5.08	Candidata de Golgi 1	3	SYEASIR SVVEDLSEEQNDLQLPASGR AKSVVEDLSEEQNDLQLPASGR	6.93%	100% 100% 100%	AG	<i>Arabidopsis thaliana</i>
3509	P36505	124.37/79.56	5.8/4.66	Fitocromo 1	4	MFMDK AAEAQEMSLNIPITVNCRR DLVTDESVAVVERLLYLALR VSHPGAGLPEELVLEMYDRGK	5.81%	100% 100% 100% 100%	Cyt	<i>Physcomitrella patens subsp. patens</i>
TRANSFORMADAS (pCAMsrDXS)										
7810	Q9AWL7	128.5/170.12	6.83/6.15	Proteína GIGANTEA	3	AIASLQVEASDLANFLTMDR TMIHSLFVESCASMDLASR ATDGMLVDGEACTLPQLELLEVTAR	5.52%	100% 100% 100%	Cito y Mem	<i>Oryza sativa subsp. Japonica</i>
	F4J6F6	143.7/170.12	5.56/6.15	Probable proteína quinasa serina/treonina IREH1	3	VLHSIEK EDAVVRSVPPLAPPENYAIK KPPPPEVKEGPAFVSPIMASSLGLNR	5.09%	100% 100% 100%	Nuc	<i>Arabidopsis thaliana</i>
5419	A2ZP58	65.29/65.22	5.21/5.19	Proteína 5 relacionada con actina	5	AGQRLR QLLSLKYPYHSASITWEK YPLVSVPEDETLTPEQLKEK KEHCYVALDYMSELQIFK EHCYVALDYMSELQIFKNNK	14.21%	100% 100% 100% 100% 100%	Nuc	<i>Oryza sativa subsp. indica</i>
5110	Q337A5	17.38/16.38	5.75/5.38	Factor despolimerizante de actina 10	2	SAFWELKR EILGFTVMGGGGSPAWIEVPEK	19.87%	100% 100%	CiE	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>
7110	Q9LSW8	27.4/14.02	7.3/6.29	Subunidad de flavoproteína de transferencia de electrones beta	3	SKPIKK TGLAMGADR YASLPNIMK	9.56%	100% 100% 100%	Mit	<i>Arabidopsis thaliana</i>

A: número de mancha proteica dentro del gel. **B:** número de acceso de la base de datos www.uniprot.org. **C:** peso molecular teórico/experimental en kilodaltons. **D:** punto isoeléctrico teórico/experimental. **E:** nombre de las proteínas. **F:** número de péptidos identificados. **G:** secuencias de péptidos identificados. **H:** porcentaje de cobertura de la secuencia de la proteína. **I:** identidad de cada fragmento de péptidos identificados, **J:** ubicación celular de las proteínas: AG = aparato de Golgi, Cyt = citoplasma, CiE = citoesqueleto, Cito = citosol, Nuc = núcleo, Mem = membrana plasmática, Mit = mitocondria, **K:** especie de planta donde fue encontrada la proteína.

7.5.6.1. Funcionalidad de las proteínas identificadas por el método de MALDI-TOF

Dentro de las proteínas detectadas en las plántulas silvestres se encuentra la proteína candidata de Golgi (mancha 4506), que desempeña un papel en el anclaje de las vesículas a las membranas de Golgi y en el mantenimiento de la estructura general del aparato de Golgi (Latijnhouwers *et al.*, 2007). De igual manera se detectó la proteína fitocromo 1 (mancha 3509), esta proteína es un fotorreceptor regulador que existe en dos formas que son reversiblemente interconvertibles por la luz: la forma Pr que absorbe al máximo en la región roja del espectro y la forma Pfr que absorbe al máximo en la región del rojo lejano. La fotoconversión de Pr en Pfr induce un conjunto de respuestas morfogénicas, mientras que la reconversión de Pfr en Pr cancela la inducción de esas respuestas. Pfr controla la expresión de varios genes nucleares, incluidos los que codifican la subunidad pequeña de ribulosa-bisfosfato carboxilasa, proteína de unión a clorofila A / B, protoclorofilida reductasa, ARNr, etc. También controla la expresión de su propio gen (es) en un modo de retroalimentación negativa. Media el movimiento de evitación de cloroplastos en el citoplasma (Uenaka & Kadota, 2007). Quizás esta última proteína al regular otras proteínas que tienen que ver con la producción de clorofilas afecte de una manera desfavorable la producción de éstas y por ello las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) lograron una mayor producción.

Por otro lado, dentro de las proteínas que se regularon positivamente en las plántulas silvestres, se encuentran la proteína GIGANTEA y la probable proteína quinasa serina/treonina IREH1, ambas se detectaron de la mancha proteica 7810. La participación de la proteína GIGANTEA se relaciona con la regulación del ritmo circadiano y en el control de la floración fotoperiódica. Actúa como supresor de la floración bajo condiciones de día corto y día largo (Hayama *et al.*, 2003). En cuanto a la probable proteína quinasa serina/treonina IREH1; esta proteína puede estar involucrado en la elongación del cabello radicular (Oyama *et al.*, 2002). Los resultados observados en cuanto a la producción y acumulación de biomasa de las raíces fue mayor en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) (Fig. 19 A y B); tal vez, la última

proteína mencionada en este párrafo fue una de las causantes de este suceso, al sobreexpresarse en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS).

Por otra parte, las siguientes tres proteínas también se sobreexpresaron en las plántulas transformadas (pCAMsrDXS). La proteína 5 relacionada con actina (mancha 5419), es una subunidad probable de un complejo de remodelación de cromatina. Involucrado en la reparación del ADN y requerido para el desarrollo multicelular de todos los órganos vegetales (Kandasamy *et al.*, 2009). El factor despolimerizante de actina 10 (mancha 5110), esta es una pequeña proteína de unión a actina e implicada en el crecimiento de la planta, la respuesta al estrés del desarrollo y la defensa de patógenos (Drøbak *et al.*, 2004; Staiger & Blanchoin, 2006; Hussey *et al.*, 2006). Se ha encontrado relacionado con la resistencia de la planta a varios patógenos en *Arabidopsis* y cebada (Miklis *et al.*, 2007; Clément *et al.*, 2009). El papel de la actina también se informó en respuesta a las hormonas vegetales y las tensiones bióticas o abióticas (Solanke & Sharma, 2008). La energía producida por la despolimerización y polimerización de la actina se usa para el movimiento direccional de las células, que es necesario para la cicatrización de heridas, la respuesta inmune, el desarrollo embrionario y el desarrollo de los tejidos (Tian *et al.*, 2009; Pollard & Borisy, 2003). La proteína antes mencionada pudo haber sido una de las responsables en las diferencias de los parámetros fisiológicos evaluados entre las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y silvestres, siendo la plántula transformada (pCAMsrDXS) superior a la silvestre. Finalmente, la última proteína que se pudo detectar fue la subunidad de flavoproteína de transferencia de electrones beta (mancha 7110), esta proteína sirve como un aceptor de electrones específico para varias deshidrogenasas, que incluyen cinco acil-CoA deshidrogenasas, glutaril-CoA y sarcosina deshidrogenasa. Transfiere los electrones a la cadena respiratoria mitocondrial principal a través de la flavoproteína de transferencia de electrones - ubiquinona oxidoreductasa (ETF-QO) y participa en el catabolismo de leucina y en la degradación de fitol (Ishizaki *et al.*, 2006).

Como se mostró anteriormente, es muy compleja la relación entre las proteínas expresadas diferencialmente en ambos tipos de cultivo y los efectos fenotípicos

observados, en especial debido a que algunas de las proteínas identificadas tienen múltiples funciones reportadas. No obstante, en los resultados de huella peptídica, se observó un posible efecto positivo en la expresión de proteínas relacionadas con el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones, crecimiento y reordenamiento celular que indican una mayor actividad metabólica en el caso de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) y, a su vez, podría explicar parcialmente la mejora en los parámetros de crecimiento y acumulación de metabolitos.

8. CONCLUSIONES

Las plántulas de *S. rebaudiana* transformadas genéticamente mediante *Agrobacterium rhizogenes* con la inserción del gen 1-desoxi-xilulosa-5-fosfato sintasa modificado, fueron significativamente superiores en los diferentes parámetros fisiológicos medidos y con una mayor producción de glucósidos de esteviol en comparación a las plántulas silvestre, lo que resulta en la aceptación de la primera hipótesis.

Por otro lado, se sugiere que a consecuencia de la inserción del gen 1-desoxi-xilulosa-5-fosfato sintasa modificado, al genoma de las plántulas silvestres, desencadenó una serie de reacciones favorables que terminaron en la inducción de diversas proteínas involucradas en diferentes procesos fisiológicos y bioquímicos, como las proteínas involucradas en la ruta de los glucósidos de esteviol, induciendo 11 proteínas de las 18 involucradas en su biosíntesis. De la misma manera, se indujeron proteínas involucradas en la síntesis de giberelinas, tocoferoles, clorofilas, carotenoides entre otros; aceptando de esta manera la segunda hipótesis.

9. RECOMENDACIONES

- Realizar una extracción secuencial exhaustiva con solventes de distinto grado de polaridad para la identificación de los diferentes compuestos fenólicos.
- Verificar la inserción de la DXS modificada en el genoma de la plántula transformada (pCAMsrDXS).
- Evaluar los niveles de expresión de los genes en la plántula transformada (pCAMsrDXS) que pudieran estar involucrados en los cambios fisiológicos y la producción de glucósidos de esteviol, como SrDXS, SrIDI, SrGGP, SrKS1-1 y SrKO.
- Realizar el análisis de proteómica diferencial utilizando tiras de pH inmovilizado, cámara electroforética y geles 2-D SDS-PAGE más grandes, para hacer que las proteínas que puedan tener un peso molecular y punto isoeléctrico muy parecido, se puedan separar de una mejor manera y así realizar una mejor identificación.
- Aclimatar las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) *in vitro* a invernadero, para conocer si la acumulación de biomasa y producción de glucósidos de esteviol sigue en aumento en función al tiempo de cultivo.

10. REFERENCIAS

- Abarca, D., Roldán, M., Martín, M., & Sabater, B. (2001). *Arabidopsis thaliana* ecotype Cvi shows an increased tolerance to photo-oxidative stress and contains a new chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase isoenzyme. *Journal of experimental botany*, 52(360), 1417-1425.
- Abonnenc, M., Qiao, L., Liu, B., & Girault, H. H. (2010). Electrochemical aspects of electrospray and laser desorption/ionization for mass spectrometry. *Annual review of analytical chemistry*, 3, 231-254.
- Abou-Arab, A. E., Abou-Arab, A. A., & Abu-Salem, M. F. (2010). Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, 4(5), 269-281.
- Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M. F., Guerrette, S., Marsischky, G. T., Kolodner, R., & Fishel, R. (1996). hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13629-13634.
- Aebbersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198-207.
- Ahmad, N., Rab, A., & Ahmad, N. (2016). Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 154, 51-56.
- Alvarado-Orea, I. V., Montes-Palmeros, M., Vera-Reyes, I., Lira-Saldívar, R. H., Pavón-Orozco, P., & Huerta-Heredía, A. A. (2016). Steviol glucosides production in *Stevia rebaudiana* bertoni root culture. *Mexican Journal of Biotechnology*, 1(1), 12-20.
- Anbazhagan, M., Kalpana, M., Rajendran, R., Natarajan, V., & Dhanavel, D. (2010). *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 22(3), 216-222.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.

- Appel, R. D., Vargas, J. R., Palagi, P. M., Walther, D., & Hochstrasser, D. F. (1997). Melanie II—a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: II. Algorithms. *Electrophoresis*, 18(15), 2735-2748.
- Aranda-González, I., Segura-Campos, M., Moguel-Ordoñez, Y., & Betancur-Ancona, D. (2014). *Stevia rebaudiana* Bertoni. Un potencial adyuvante en el tratamiento de la diabetes mellitus. *CyTA-Journal of Food*, 12(3), 218-226.
- Atteh, J. O., Onagbesan, O. M., Tona, K., Decuypere, E., Geuns, J. M. C., & Buyse, J. (2008). Evaluation of supplementary *stevia* (*Stevia rebaudiana*, bertoni) leaves and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 92(6), 640-649.
- Autade, R. H., Fargade, S. R., Borhade, P. G., Udmale, S. K., & Choudhary, R. S. (2014). *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (BERT.) a natural, non-caloric sweetener herb. *Journal of Cell and Tissue Research*, 14(3), 4659-4664.
- Bai, X., Yang, L., Yang, Y., Ahmad, P., Yang, Y., & Hu, X. (2011). Deciphering the protective role of nitric oxide against salt stress at the physiological and proteomic levels in maize. *Journal of proteome research*, 10(10), 4349-4364.
- Bajguz, A., & Hayat, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1), 1-8.
- Bannenberg, G., Martínez, M., Hamberg, M., & Castresana, C. (2009). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids*, 44(2), 85-95.
- Barbet-Massin, C., Giuliano, S., Alletto, L., Daydé, J., & Berger, M. (2016). Towards a semi-perennial culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni under temperate climate: effects of genotype, environment and plant age on steviol glycoside content and composition. *Genetic resources and crop evolution*, 63(4), 685-694.

- Barthakur, S, Babu, V., & Bansa, K. C. (2001). Over-expression of osmotin induces proline accumulation and confers tolerance to osmotic stress in transgenic tobacco. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 10(1), 31-37.
- Bartley, G. E., Scolnik, P. A., & Beyer, P. (1999). Two *Arabidopsis thaliana* carotene desaturases, phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase, expressed in *Escherichia coli*, catalyze a poly-cis pathway to yield pro-lycopene. *European Journal of Biochemistry*, 259(2), 396-403.
- Bate, N. J., & Rothstein, S. J. (1998). C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *The Plant Journal*, 16(5), 561-569.
- Bate, N. J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P. W., Dixon, R. A., Lamb, C. J., & Elkind, Y. (1994). Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), 7608-7612.
- Benhassaine-Kesri, G., Aid, F., Demandre, C., Kader, J. C., & Mazliak, P. (2002). Drought stress affects chloroplast lipid metabolism in rape (*Brassica napus*) leaves. *Physiologia Plantarum*, 115(2), 221-227.
- Bertoni, M. S. (1905). Le Kaa` He-e´ Sa nature et ses proprietes. *Anales Científicos Paraguayos*, 5, 1-14.
- Blanco, M., Valverde, R., & Gómez, L. (2003). Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense*, 27(1), 19-28.
- Bohlmann, J., & Keeling, C. I. (2008). Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal*, 54(4), 656-669.
- Bommer, U. A., & Thiele, B. J. (2004). The translationally controlled tumour protein (TCTP). *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(3), 379-385.
- Bona, E., Marsano, F., Cavaletto, M., & Berta, G. (2007). Proteomic characterization of copper stress response in *Cannabis sativa* roots. *Proteomics*, 7(7), 1121-1130.

- Bondarev, N. I., Sukhanova, M. A., Reshetnyak, O. V., & Nosov, A. M. (2003). Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny. *Biología plantarum*, 47(2), 261-264.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.
- Brandão, A. R., Barbosa, H. S., & Arruda, M. A. Z. (2010). Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Journal of proteomics*, 73(8), 1433-1440.
- Brandle, J. E., & Rosa, N. (1992). Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science*, 72(4), 1263-1266.
- Brandle, J. E., & Telmer, P. G. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68(14), 1855-1863.
- Brandle, J. S., & Marsolais, A. A. (1998). *Stevia* plant named. *RSIT*, 95, 166-186.
- Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 183-205.
- Brüx, A., Liu, T. Y., Krebs, M., Stierhof, Y. D., Lohmann, J. U., Miersch, O., Wasternack, C., & Schumacher, K. (2008). Reduced V-ATPase activity in the trans-Golgi network causes oxylipin-dependent hypocotyl growth inhibition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(4), 1088-1100.
- Cabrera-Soto, M. L., Salinas-Moreno, Y., Velázquez-Cardelas, G. A., & Espinosa, T. (2009). Content of soluble and insoluble phenols in the structures of corn grain and their relationship with physical properties. *Agrociencia (Montecillo)*, 43(8), 827-839.
- Camm, E. L., & Towers, G. N. (1973). Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry*, 12(5), 961-973.
- Canovas, F. M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H. P., & Rossignol, M. (2004). Plant proteome analysis. *Proteomics*, 4, 285-298.

- Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., Rodríguez-Concepción, M., Ferrer, A., Boronat, A., & Campos, N. (2002). Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-c-methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant physiology*, 129(4), 1581-1591.
- Carretero-Paulet, L., Cairo, A., Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Campos, N., Boronat, A., & Rodríguez-Concepción, M. (2006). Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant molecular biology*, 62(4-5), 683-695.
- Casique-Arroyo, G., Martínez-Gallardo, N., de la Vara, L. G., & Délano-Frier, J. P. (2014). Betacyanin biosynthetic genes and enzymes are differentially induced by (a) biotic stress in *Amaranthus hypochondriacus*. *PLOS ONE*, 9(6), 1-18.
- Ceunen, S., Werbrouck, S., & Geuns, J. M. (2012). Stimulation of steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* by red LED light. *Journal of plant physiology*, 169(7), 749-752.
- Chatsudthipong, V., & Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & therapeutics*, 121(1), 41-54.
- Chen, J., Jeppesen, P. B., Nordentoft, I., & Hermansen, K. (2006). Stevioside counteracts the glyburide-induced desensitization of the pancreatic beta-cell function in mice: studies *in vitro*. *Metabolism*, 55(12), 1674-1680.
- Chen, X., Zhang, W., Xie, Y., Lu, W., & Zhang, R. (2007). Comparative proteomics of thylakoid membrane from a chlorophyll b-less rice mutant and its wild type. *Plant Sci*, 173, 397-407.
- Chen, Y., Pang, Q., Dai, S., Wang, Y., Chen, S., & Yan, X. (2011). Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Arabidopsis* in response to methyl jasmonate. *Journal of plant physiology*, 168(10), 995-1008.

- Choi, P. S., Kim, Y. D., Choi, K. M., Chung, H. J., Choi, D. W., & Liu, J. R. (2004). Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep*, 22, 828-831.
- Chong, L. P., Wang, Y., Gad, N., Anderson, N., Shah, B., & Zhao, R. (2014). A highly charged region in the middle domain of plant endoplasmic reticulum (ER)-localized heat-shock protein 90 is required for resistance to tunicamycin or high calcium-induced ER stresses. *Journal of experimental botany*, 66(1), 113-124.
- Christey, M. C. (2001). Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 687-700.
- Christou, P. (1992). Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *The Plant Journal*, 2(3), 275-281.
- Clauser, K. R., Baker, P., & Burlingame, A. L. (1999). Role of accurate mass measurement (± 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Analytical chemistry*, 71(14), 2871-2882.
- Clément, M., Ketelaar, T., Rodiuc, N., Banora, M. Y., Smertenko, A., Engler, G., Abad, P., Hussey, P. J., & de Almeida E. J. (2009). Actin-depolymerizing factor2-mediated actin dynamics are essential for root-knot nematode infection of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(9), 2963-2979.
- Clément, M., Ketelaar, T., Rodiuc, N., Banora, M. Y., Smertenko, A., Engler, G., Abad, P., Hussey, P. J., & de Almeida E. J. (2009). Actin-depolymerizing factor2-mediated actin dynamics are essential for root-knot nematode infection of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(9), 2963-2979.
- Cordoba, E., Salmi, M., & León, P. (2009). Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 60(10), 2933-2943.
- Corpas, F. J., Leterrier, M., Valderrama, R., Airaki, M., Chaki, M., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2011). Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science*, 181(5), 604-611.

- Croxatto, A., Prod'hom, G., & Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 380-407.
- Das, A., Gantait, S., & Mandal, N. (2011). Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *Int J Agric Res*, 6(1), 40-48.
- Das, S., Das, A. K., Murphy, R. A., Punwani, I. C., Nasution, M. P., & Kinghorn, A. D. (1992). Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Caries Research*, 26(5), 363-366.
- David, C., Chilton, M.D., & Tempe, J. (1984). Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. *Nat Biotechnol*, 2, 73-76.
- Davies, P. J. (2010). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. *In plant hormones*, 1-15.
- Debnath, M. (2008). Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Journal of medicinal plants research*, 2(2), 45-51.
- Desai, C. V., Desai, H. B., Suthar, K. P., Singh, D., Patel, R. M., & Taslim, A. (2015). Phytotoxicity of zinc-nanoparticles and its influence on stevioside production in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Appl. Biol. Res*, 17(1), 1-7.
- Deshpande, R. A., & Shankar, V. (2002). Ribonucleases from T2 family. *Critical reviews in microbiology*, 28(2), 79-122.
- Dettmer, J., Schubert, D., Calvo-Weimar, O., Stierhof, Y. D., Schmidt, R., & Schumacher, K. (2005). Essential role of the V-ATPase in male gametophyte development. *The Plant Journal*, 41(1), 117-124.
- Devaiah, S. P., Pan, X., Hong, Y., Roth, M., Welti, R., & Wang, X. (2007). Enhancing seed quality and viability by suppressing phospholipase D in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 50(6), 950-957.

- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & 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.
- Dhingra, V., Gupta, M., Andacht, T., & Fu, Z. F. (2005). New frontiers in proteomics research: a perspective. *International journal of pharmaceutics*, 299(2), 1-18.
- Dietz, K. J., Jacob, S., Oelze, M. L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S. M. N., Baier, M., & Finkemeier, I. (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1697-1709.
- Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085-1097.
- Drake, B. G., González-Meler, M. A., & Long, S. P. (1997). More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂?. *Annual review of plant biology*, 48(1), 609-639.
- Drøbak, B. K., Franklin-Tong, V. E., & Staiger, C. J. (2004). The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling. *New phytologist*, 163(1), 13-30.
- Dwivedi, R. S. (1999). Unnurtured and untapped super sweet nonsacchariferous plant species in India. *Current science*, 76(11), 1454-1461.
- Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*, 19(6), 1349.
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., & Rohdich, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(12), 1401-1426.
- Enfissi, E., Fraser, P. D., Lois, L. M., Boronat, A., Schuch, W., & Bramley, P. M. (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 3(1), 17-27.

- Estévez, J. M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., & León, P. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22901-22909.
- Estévez, J. M., Cantero, A., Romero, C., Kawaide, H., Jiménez, L. F., Kuzuyama, T., Seto, H., Kamiya, Y., & León, P. (2000). Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 124(1), 95-104.
- Fan, P., Feng, J., Jiang, P., Chen, X., Bao, H., Nie, L., Jiang, D., Lv, S., Kuang, T., & Li, Y. (2011). Coordination of carbon fixation and nitrogen metabolism in *Salicornia europaea* under salinity: Comparative proteomic analysis on chloroplast proteins. *Proteomics*, 11, 4346-4367.
- Fan, R., Li, Y., Li, C., & Zhang, Y. (2015). Differential microRNA analysis of glandular trichomes and young leaves in *Xanthium strumarium* L. reveals their putative roles in regulating terpenoid biosynthesis. *PLoS One*, 10(9), 1-17.
- Feng, H., Chen, Q., Feng, J., Zhang, J., Yang, X., & Zuo, J. (2007). Functional characterization of the *Arabidopsis* eukaryotic translation initiation factor 5A-2 that plays a crucial role in plant growth and development by regulating cell division, cell growth, and cell death. *Plant physiology*, 144(3), 1531-1545.
- Ferl, R., & Paul, A. L. (2000). Genome organization and expression. *Buchanan, BB; Gruissem, W.; Jones, RL Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists*, 312-357.
- Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., & Noel, J. P. (1999). Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural and Molecular Biology*, 6(8), 775-784.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2011). Structural characterization of phenolics and betacyanins in *Gomphrena globosa* by high-performance liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 25(22), 3441-3446.

- Ferro, M., Salvi, D., Brugière, S., Miras, S., Kowalski, S., Louwagie, M., Garin, J., Joyard, J., & Rolland, N. (2003). Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(5), 325-345.
- Frederico, A. P., Ruas, P. M., Marin-Morales, M. A., Ruas, C. F., & Nakajima, J. N. (1996). Chromosome studies in some *Stevia*. Cav. (Compositae) species from Southern Brazil. *Brazilian journal of Genetics*, 19(4), 605-609.
- Fritz, R. R., Hodgins, D. S., & Abell, C. W. (1976). Phenylalanine ammonia-lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 251(15), 4646-4650.
- Fronza, D., & Folegatti, M. V. (2003). Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. *Scientia Agricola*, 60(3), 595-599.
- Gardana, C., Scaglianti, M., & Simonetti, P. (2010). Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography*, 1217(9), 1463-1470.
- Garrels, J. I. (1989). The QUEST system for quantitative analysis of two-dimensional gels. *Journal of Biological Chemistry*, 264(9), 5269-5282.
- Gasulla, F., Dorp, K., Dombrink, I., Zähringer, U., Gisch, N., Dörmann, P., & Bartels, D. (2013). The role of lipid metabolism in the acquisition of desiccation tolerance in *Craterostigma plantagineum*: a comparative approach. *The Plant Journal*, 75(5), 726-741.
- Gaweł-Bęben, K., Bujak, T., Nizioł-Łukaszewska, Z., Antosiewicz, B., Jakubczyk, A., Karaś, M., & Rybczyńska, K. (2015). *Stevia rebaudiana* Bert. leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. *Molecules*, 20(4), 5468-5486.
- Gelvin, S. B. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual review of plant biology*, 51(1), 223-256.

- Genschel, J., Littman, S. J., Drummond, J. T., & Modrich, P. (1998). Isolation of MutS β from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutS β and MutS α . *Journal of Biological Chemistry*, 273(31), 19895-19901.
- Geuns, J. M. (2003). Stevioside. *Phytochemistry*, 64(5), 913-921.
- Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of medicinal plants research*, 5(31), 6697-6703.
- Gigon, A., Matos, A. R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y., & Pham-Thi, A. T. (2004). Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of botany*, 94(3), 345-351.
- Goettemoeller, J., & Ching, A. (1999). Seed germination in *Stevia rebaudiana*. *J. Janick*, 510-511.
- Gong, C. Y., Li, Q., Yu, H. T., Wang, Z., & Wang, T. (2012). Proteomics insight into the biological safety of transgenic modification of rice as compared with conventional genetic breeding and spontaneous genotypic variation. *Journal of Proteome Research*, 11(5), 3019-3029.
- Gong, Y. F., Liao, Z. H., Guo, B. H., Sun, X. F., & Tang, K. X. (2006). Molecular cloning and expression profile analysis of *Ginkgo biloba* DXS gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Planta Medica*, 72(4), 329-335.
- Goyal, S. K., & Goyal, R. K. (2010). *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61, 1-10.
- Guleria, P., Masand, S., & Yadav, S. K. (2014). Overexpression of SrUGT85C2 from *Stevia* reduced growth and yield of transgenic *Arabidopsis* by influencing plastidial MEP pathway. *Gene*, 539(2), 250-257.
- Gunjan, S.K., Lutz, J., Bushong, A., Rogers, D.T., & Littleton, J. (2013). Hairy root cultures and plant regeneration in *Solidago nemoralis* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Am J Plant Sci*, 4, 1675-1678.

- Gupta, E., Purwar, S., Sundaram, S., & Rai, G. K. (2013). Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(46), 3343-3353.
- Gupta, O. P., Karkute, S. G., Banerjee, S., Meena, N. L., & Dahuja, A. (2017). Contemporary understanding of miRNA-based regulation of secondary metabolites biosynthesis in plants. *Frontiers in plant science*, 8, 1-10.
- Gupta, P., Sharma, S., & 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.
- Gupta, P., Sharma, S., & Saxena, S. (2015). Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline and polyethylene glycol. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(3), 863-874.
- Gutierrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M., & Bellini, C. (2007). Combined networks regulating seed maturation. *Trends in plant science*, 12(7), 294-300.
- Hale, J. E., Butler, J. P., Knierman, M. D., & Becker, G. W. (2000). Increased sensitivity of tryptic peptide detection by MALDI-TOF mass spectrometry is achieved by conversion of lysine to homoarginine. *Analytical biochemistry*, 287(1), 110-117.
- Handro, W., Hell, K. G., & Kerbauy, G. B. (1977). Tissue culture of *Stevia rebaudiana*, a sweetening plant. *Planta medica*, 32(06), 115-117.
- Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M., & Shimamoto, K. (2003). Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*, 422(6933), 719-722.
- Henry, Y., Vain, P., & De Buyser, J. (1994). Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica*, 79(2), 45-58.
- Hong, Y., Devaiah, S. P., Bahn, S. C., Thamasandra, B. N., Li, M., Welti, R., & Wang, X. (2009). Phospholipase D ϵ and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth. *The Plant Journal*, 58(3), 376-387.

- Hong, Y., Pan, X., Welti, R., & Wang, X. (2008a). Phospholipase D α 3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(3), 803-816.
- Hong, Y., Pan, X., Welti, R., & Wang, X. (2008b). The effect of phospholipase D α 3 in *Arabidopsis* response to hyperosmotic stress and glucose. *Plant signaling & behavior*, 3(12), 1099-1100.
- Hopkins, M. T., Lampi, Y., Wang, T. W., Liu, Z., & Thompson, J. E. (2008). Eukaryotic translation initiation factor 5A is involved in pathogen-induced cell death and development of disease symptoms in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 148(1), 479-489.
- Hoshida, H., Tanaka, Y., Hibino, T., Hayashi, Y., Tanaka, A., Takabe, T., & Takabe, T. (2000). Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant molecular biology*, 43(1), 103-111.
- Hossain, M. A., Shamim Kabir, A. H. M., Jahan, T. A., & Hasan, M. N. (2008). Micropropagation of *Stevia*. *Int. J. Sustain. Crop Prod*, 3(4), 1-9.
- Hossain, M. A., Siddique, A. B., Rahman, S. M., & Hossain, M. A. (2010). Chemical composition of the essential oils of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Asian J Trad Med*, 5(2), 56-61.
- Hsieh, M. H., Chang, C. Y., Hsu, S. J., & Chen, J. J. (2008). Chloroplast localization of methylerythritol 4-phosphate pathway enzymes and regulation of mitochondrial genes in ispD and ispE albino mutants in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 66(6), 663-673.
- Hua, Q., Zhou, Q., Gan, S., Wu, J., Chen, C., Li, J., Ye, Y., Zhao, J., Hu, G., & Qin, Y. (2016). Proteomic analysis of *Hylocereus polyrhizus* reveals metabolic pathway changes. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1-13.
- Humphrey, T. V., Richman, A. S., Menassa, R., & Brandle, J. E. (2006). Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis. *Plant molecular biology*, 61(1), 47-62.
- Hunter, W. N. (2007). The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 21573-21577.

- Hussain, I., Muhammad, A., Chaudhry, Z., Naqvi, R., & Rashid, H. (2005). Morphogenic potential of three potato (*Solanum tuberosum*) cultivars from diverse explants, a prerequisite in genetic manipulation. *Pakistan Journal of Botany*, 37(4), 889-898.
- Hussey, P. J., Ketelaar, T., & Deeks, M. J. (2006). Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 109-125.
- Hust, B., & Gutensohn, M. (2006). Deletion of core components of the plastid protein import machinery causes differential arrest of embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 8(1), 18-30.
- Ibrahim, I. A., Nasr, M. I., Mohammed, B. R., & El-Zefzafi, M. M. (2008b). Plant growth regulators affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech*, 10(3), 254-259.
- Ibrahim, I. A., Nasr, M. I., Mohammed, B. R., & El-Zefzafi, M. M. (2008a). Nutrient factors affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech*, 10(3), 248-253.
- Ishiguro, S., Watanabe, Y., Ito, N., Nonaka, H., Takeda, N., Sakai, T., Kanaya, H., & Okada, K. (2002). SHEPHERD is the *Arabidopsis* GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *The EMBO journal*, 21(5), 898-908.
- Ishizaki, K., Schauer, N., Larson, T. R., Graham, I. A., Fernie, A. R., & Leaver, C. J. (2006). The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of *Arabidopsis* in extended darkness. *The Plant Journal*, 47(5), 751-760.
- Ishizaki, T., Hoshino, Y., Masuda, K., & Oosawa, K. (2002). Explants of Ri-transformed hairy roots of spinach can develop embryogenic calli in the absence of gibberellic acid, an essential growth regulator for induction of embryogenesis from non-transformed roots. *Plant Sci*, 163, 223-231.
- Jackson, A. U., Tata, A., Wu, C., Perry, R. H., Haas, G., West, L., & Cooks, R. G. (2009). Direct analysis of *Stevia* leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*, 134(5), 867-874.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. (2007). Induction of drought stress tolerance by ketoconazole in

Catharanthus roseus is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 60(2), 201-206.

Javed, R., Yücesan, B., & Gurel, E. (2017). Hydrogen peroxide-induced steviol glycosides accumulation and enhancement of antioxidant activities in leaf tissues of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Tech*, 20(1), 100-104.

Jeppesen, P. B., Gregersen, S., Alstrup, K. K., & Hermansen, K. (2002). Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo*: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine*, 9(1), 9-14.

Jeppesen, P. B., Gregersen, S., Rolfsen, S. E. D., Jepsen, M., Colombo, M., Agger, A., Xiao, J., Kruhøffer, M., Ørntoft, T., & Hermansen, K. (2003). Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism*, 52(3), 372-378.

Jiménez-Brigada, A. (2018). Evaluación de la sobreexpresión de 1-desoxixilulosa-5-fosfato sintasa modificada en raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* sobre la producción de glucósidos de esteviol. Tesis en escritura. Universidad del Papaloapan. Instituto de Biotecnología.

Jitendra, M., Monika, S., Ratan, S. D., Priyanka, G., Priyanka, S., & Kiran, D. J. (2012). Micropropagation of an anti-diabetic plant—*Stevia rebaudiana* Bertoni, (Natural Sweetener) in hadoti region of South-East Rajasthan, India. *ISCA Journal of Biological Sciences*, 1(3), 37-42.

John, E. R. (1999). Chaperonins. *Current Biology*, 9(10), 1.

Jordana-Lluch, E., Catalá, E. M., & Ruiz, V. A. (2012). La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(10), 635-644.

Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J., & Rolland, N. (2009). Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Molecular Plant*, 2, 1154-1180.

- Jurinke, C., Oeth, P., & van den Boom, D. (2004). MALDI-TOF mass spectrometry. *Molecular biotechnology*, 26(2), 147-163.
- Jutabha, P., Toskulkao, C., & Chatsudthipong, V. (2000). Effect of stevioside on PAH transport by isolated perfused rabbit renal proximal tubule. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 78(9), 737-744.
- Kandasamy, M. K., McKinney, E. C., Deal, R. B., Smith, A. P., & Meagher, R. B. (2009). *Arabidopsis* actin-related protein ARP5 in multicellular development and DNA repair. *Developmental biology*, 335(1), 22-32.
- Karaköse, H., Müller, A., & Kuhnert, N. (2015). Profiling and quantification of phenolics in *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(41), 9188-9198.
- Karas, M., Glückmann, M., & Schäfer, J. (2000). Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of mass spectrometry*, 35(1), 1-12.
- Ketelaar, T., Anthony, R. G., & Hussey, P. J. (2004). Green fluorescent protein-mTalin causes defects in actin organization and cell expansion in *Arabidopsis* and inhibits actin depolymerizing factor's actin depolymerizing activity *in vitro*. *Plant Physiology*, 136(4), 3990-3998.
- Khan, S. A., Rahman, L. U., Shanker, K., & Singh, M. (2014). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transgenic plant and somaclone production through direct and indirect regeneration from leaves in *Stevia rebaudiana* with their glycoside profile. *Protoplasma*, 251(3), 661-670.
- Khan, S. A., Rahman, L., Verma, R., & Shanker, K. (2016). Physical and chemical mutagenesis in *Stevia rebaudiana*: variant generation with higher UGT expression and glycosidic profile but with low photosynthetic capabilities. *Acta Physiol Plant*, 38, 1-12.
- Kikkert, J. R., Vidal, J. R., & Reisch, B. I. (2004). Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biistics. *Transgenic Plants: Methods and Protocols*, 61-78.

- Kilam, D., Saifi, M., Abdin, M. Z., Agnihotri, A., & Varma, A. (2015). Combined effects of *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* enhance plant growth, antioxidant potential and steviol glycoside content in *Stevia rebaudiana*. *Symbiosis*, 66(3), 149-156.
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X., & Rajapakse, N. C. (2006). Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2327-2332.
- Kim, I. S., Yang, M., Lee, O. H., & Kang, S. N. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 44(5), 1328-1332.
- Kim, J. H., Lee, Y. J., Kim, B. G., Lim, Y., & Ahn, J. (2008). Flavanone 3 beta-hydroxylases from rice: key enzymes for flavonol and anthocyanin biosynthesis. *Molecules and cells*, 25(2), 312-316.
- Kim, J. K., Jang, I. C., Wu, R., Zuo, W. N., Boston, R. S., Lee, Y. H., Ahn, P., & Nahm, B. H. (2003). Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight. *Transgenic Research*, 12(4), 475-484.
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8), 3173-3178.
- Kinghorn, A. D., Wu, C. D., Soejarto, D. D., (2001). Stevioside. In: O'Brien Nabors, L. (Ed.), *Alternative Sweeteners, third ed., revised and expanded*. Dekker, New York, 167-183.
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., & Sanford, J. C. (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327(6117), 70-73.
- Ko, T. S., Lee, S., Krasnyanski, S., & Korban, S. S. (2003). Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(3), 439-447.

- Koes, R. E., Quattrocchio, F., & Mol, J. N. (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16(2), 123-132.
- Koyama, E., Kitazawa, K., Ohori, Y., Izawa, O., Kakegawa, K., Fujino, A., & Ui, M. (2003). *In vitro* metabolism of the glycosidic sweeteners, *Stevia* mixture and enzymatically modified *stevia* in human intestinal microflora. *Food and chemical toxicology*, 41(3), 359-374.
- Kozlowski, T. T., & Pallardy, S. G. (2002). Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *The botanical review*, 68(2), 270-334.
- Krebs, M., Beyhl, D., Görlich, E., Al-Rasheid, K. A., Marten, I., Stierhof, Y. D., Hedrich, R., & Schumacher, K. (2010). *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7), 3251-3256.
- Krüger, R., Pfenninger, A., Fournier, I., Glückmann, M., & Karas, M. (2001). Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes. *Analytical chemistry*, 73(24), 5812-5821.
- Kubis, S., Patel, R., Combe, J., Bédard, J., Kovacheva, S., Lilley, K., Biehl, A., Leister, D., Ríos, G., Koncz, C., & Jarvis, P. (2004). Functional specialization amongst the *Arabidopsis* Toc159 family of chloroplast protein import receptors. *The Plant Cell*, 16(8), 2059-2077.
- Kumar, H., Kaul, K., Bajpai-Gupta, S., Kaul, V. K., & Kumar, S. (2012). A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene*, 492(1), 276-284.
- Kumar, S. A., Kumari, P. H., Kumar, G. S., Mohanalatha, C., & Kavi Kishor, P. B. (2015). Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. *Frontiers in plant science*, 6, 1-16.
- Kumari, M., & Chandra, S. (2014). *Stevia rebaudiana*: beyond sweetness. *Handbook of Medicinal Plants and Their Bioactive. Trivandrum: Research Signpost*, 11-26.

- Kumari, M., & Chandra, S. (2017). Secondary metabolite production in transformed cultures: Stevioside glycosides production from *Stevia rebaudiana* hairy root cultures. *Transgenesis and Secondary Metabolism*, 103-121.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M., & Pagnussat, G. (2003). Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 109-136.
- Laribi, B., Rouatbi, N., Kouki, K., & Bettaieb, T. (2012). *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert.)-A non-caloric sweetener and antidiabetic medicinal plant. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 2(2), 333-339.
- Latijnhouwers, M., Gillespie, T., Boevink, P., Kriechbaumer, V., Hawes, C., & Carvalho, C. M. (2007). Localization and domain characterization of *Arabidopsis* golgin candidates. *Journal of experimental botany*, 58(16), 4373-4386.
- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P. B., Wilhelm-Gruissem, W., & Lange, M. (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 100(11), 6866-6871.
- Lay, J. O., & Holland, R. D. (2000). Rapid identification of bacteria based on spectral patterns using MALDI-TOFMS. *In Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, 461-487.
- Lee, C. N., Wong, K. L., Liu, J. C., Chen, Y. J., Cheng, J. T., & Chan, P. (2001). Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension. *Planta medica*, 67(9), 796-799.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & 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, M., Qin, C., Welti, R., & Wang, X. (2006). Double knockouts of phospholipases D ζ 1 and D ζ 2 in *Arabidopsis* affect root elongation during phosphate-limited growth but do not affect root hair patterning. *Plant physiology*, 140(2), 761-770.
- Li, Q., Li, J., Liu, S., Huang, J., Lin, H., Wang, K., Cheng X., & Liu, Z. (2015). A comparative proteomic analysis of the buds and the young expanding leaves of the tea plant (*Camellia sinensis* L.). *International journal of molecular sciences*, 16(6), 14007-14038.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical society transactions*, 11, 591-592.
- Liliane, B. A. G., Sachetto-Martins, G., Contarini, M. G., Sandroni, M., Ferreira, R. P., de Lima, V. M., Cordeiro, M. C., de Oliveira, D. E., & Margis-Pinheiro, M. (1997). *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. *FEBS letters*, 419(1), 69-75.
- Lin, D., Tabb, D. L., & Yates III, J. R. (2003). Large-scale protein identification using mass spectrometry. *(BBA)-Proteins and Proteomics*, 1646(2), 1-10.
- Lin, G. Z., Lian, Y. J., Ryu, J. H., Sung, M. K., Park, J. S., Park, H. J., Park, K. B., Shin, J. S., Lee, M. S., & Cheon, C. (2007). Expression and purification of His-tagged flavonol synthase of *Camellia sinensis* from *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 55(2), 287-292.
- Liu, T. W., Fu, B., Niu, L., Chen, J., Wang, W. H., He, J. X., Pei, Z. M., & Zheng, H. L. (2011). Comparative proteomic analysis of proteins in response to simulated acid rain in *Arabidopsis*. *Journal of proteome research*, 10(5), 2579-2589.
- Liu, X., Yu, W., Wang, G., Cao, F., Cai, J., & Wang, H. (2016). Comparative proteomic and physiological analysis reveals the variation mechanisms of leaf coloration and carbon fixation in a xantha mutant of *Ginkgo biloba* L. *International journal of molecular sciences*, 17(11), 1-24.

- Liu, Z., Duguay, J., Ma, F., Wang, T. W., Tshin, R., Hopkins, M. T., McNamara, L., & Thompson, J. E. (2008). Modulation of eIF5A1 expression alters xylem abundance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 59(4), 939-950.
- Loaiza, J., & Valverde, R. (2006). Transformación genética de *Echinacea purpurea* y *E. angustifolia* mediante *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense*, 30(1), 27-34.
- Lois, L. M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N., & Boronat, A. (2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase. *The Plant Journal*, 22(6), 503-513.
- Londhe, S. V., & Nanaware, S. M. (2013). HPTLC method for simultaneous analysis of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana*. *Journal of AOAC International*, 96(1), 24-26.
- López-Laredo, A. R., Ramírez-Flores, F. D., Sepúlveda-Jiménez, G., & Trejo-Tapia, G. (2009). Comparison of metabolite levels in callus of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. cultured in photoperiod and darkness. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(5), 550-558.
- Lu, Z., Takano, T., & Liu, S. (2005). Purification and characterization of two ascorbate peroxidases of rice (*Oryza sativa* L.) expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology letters*, 27(1), 63-67.
- Ma, F., Liu, Z., Wang, T. W., Hopkins, M. T., Peterson, C. A., & Thompson, J. E. (2010). *Arabidopsis* eIF5A3 influences growth and the response to osmotic and nutrient stress. *Plant, cell & environment*, 33(10), 1682-1696.
- Ma, L., & Shi, Y. (2011). Effects of potassium fertilizer on physiological and biochemical index of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Energy Procedia*, 5, 581-586.
- Mahmoud, S. S., & Croteau, R. B. (2001). Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8915-8920.

- Maiti, R. K. & Purohit, S. S. (2008). *Stevia: A miracle plant for human health. Jodhpur: Agrobios India*, 64.
- Maki, K. C., Curry, L. L., Reeves, M. S., Toth, P. D., McKenney, J. M., Farmer, M. V., Schwartz, S. L., Lubin, B. C., Boileau, A. C., Dicklin, M. R., Carakostas, M. C., & Tarka, S. M. (2008). Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 47-53.
- Manaa, A., Ben Ahmed, H., Valot, B., Bouchet, J. P., Aschi-Smiti, S., Causse, M., & Faurobert, M. (2011). Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2797-2813.
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant signaling & behavior*, 5(4), 359-368.
- Mane, S. P., Vasquez-Robinet, C., Sioson, A. A., Heath, L. S., & Grene, R. (2007). Early PLD α -mediated events in response to progressive drought stress in *Arabidopsis*: a transcriptome analysis. *Journal of experimental botany*, 58(2), 241-252.
- Mann, F. M., Prusic, S., Davenport, E. K., Determan, M. K., Coates, R. M., & Peters, R. J. (2010). A single residue switch for Mg²⁺-dependent inhibition characterizes plant class II diterpene cyclases from primary and secondary metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 20558-20563.
- Marengo, E., Robotti, E., Antonucci, F., Cecconi, D., Campostrini, N., & Righetti, P. G. (2005). Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: A review of commercial software and home-made systems. *Proteomics*, 5(3), 654-666.
- Martin, D., Tholl, D., Gershenzon, J., & Bohlmann, J. (2002). Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant physiology*, 129(3), 1003-1018.
- Martino, V. (2000). Los flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 19(4), 303-308.
- Maserti, B. E., Del Carratore, R., Della Croce, C. M., Podda, A., Migheli, Q., Froelicher, Y., Luro, F., Morillon, P., Talon, M., & Rossignol, M. (2011). Comparative analysis of

proteome changes induced by the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* and methyl jasmonate in citrus leaves. *Journal of plant physiology*, 168(4), 392-402.

Mathew, R., & Sankar, P. D. (2014). Comparison of major secondary metabolites quantified in elicited cell cultures, non-elicited cell cultures, callus cultures and field grown plants of *Ocimum*. *Int J Pharmacy and Pharmaceu Sci*, 6, 102-106.

Mathur, S., & 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*, 1-9.

Mendoza-Poudereux, I., Kutzner, E., Huber, C., Segura, J., Arrillaga, I., & Eisenreich, W. (2017). Dynamics of monoterpene formation in spike lavender plants. *Metabolites*, 7(4), 1-22.

Miao, Y., Lv, D., Wang, P., Wang, X. C., Chen, J., Miao, C., & Song, C. P. (2006). An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell*, 18(10), 2749-2766.

Michalec-Warzecha, Ż., Pistelli, L., D'Angiolillo, F., & Libik-Konieczny, M. (2016). Establishment of highly efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for *Stevia rebaudiana* Bertoni explants. *Acta Biológica Cracoviensia s. Botánica*, 58(1), 113-118.

Miklis, M., Consonni, C., Bhat, R. A., Lipka, V., Schulze-Lefert, P., & Panstruga, R. (2007). Barley MLO modulates actin-dependent and actin-independent antifungal defense pathways at the cell periphery. *Plant Physiology*, 144(2), 1132-1143.

Millar, A. H., Sweetlove, L. J., Giegé, P., & Leaver, C. J. (2001). Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiology*, 127(4), 1711-1727.

Mitra, A., & Pal, A. (2007). *In vitro* regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert) from the nodal explant. *Journal of plant biochemistry and biotechnology*, 16(1), 59-62.

Miziorko, H. M. (2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 505(2), 131-143.

- Mizuno, R., Fukamizo, T., Sugiyama, S., Nishizawa, Y., Kezuka, Y., Nonaka, T., Suzuki, K., & Watanabe, T. (2008). Role of the loop structure of the catalytic domain in rice class I chitinase. *Journal of biochemistry*, 143(4), 487-495.
- Mizutani, K., & Tanaka, O. (2002). Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. *Stevia, the genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, 19, 178-195.
- Modi, A. R., Raj, S., Kanani, P., Patel, A., & Narayanan, S. (2014). Analysis of differentially expressed genes involved in stevioside biosynthesis in cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni treated with steviol as an immediate precursor. *Journal of plant growth regulation*, 33(3), 481-488.
- Mohamed, A. A. A., Ceunen, S., Geuns, J. M. C., Van den Ende, W., & De Ley, M. (2011). UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides. *Journal of plant physiology*, 168(10), 1136-1141.
- Mok, D. W., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant biology*, 52(1), 89-118.
- Molina-Calle, M., Priego-Capote, F., & de Castro, M. L. (2017). Characterization of *Stevia* leaves by LC–QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts. *Food chemistry*, 219, 329-338.
- Montamat, F., Guilloton, M., Karst, F., & Delrot, S. (1995). Isolation and characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. *Gene*, 167(1), 197-201.
- Monteiro, R. (1980). Taxonomia e biologia da reprodução da *Stevia rebaudiana* Bert. Thesis de doutorado. Universidade Estadual de Campinas.
- Montes-Palmeros, M. (2017). Plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* expuestas a metil jasmonato. Tesis de maestría. Universidad del Papaloapan. Instituto de Biotecnología.
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J., & Klessig, D. F. (2010). NO synthesis and signaling in plants—where do we stand?. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 372-383.

- Morris, W. L., Ducreux, L. J., Hedden, P., Millam, S., & Taylor, M. A. (2006). Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. *Journal of experimental botany*, 57(12), 3007-3018.
- Mouradov, A., & Spangenberg, G. (2014). Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Frontiers in plant science*, 5, 1-16.
- Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B., & Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1865-1872.
- Mubarak, M., El Halmouch, Y., Belal, A., Elfadeel, M., EL-Din, T., Mahmoud, S. F., El Sharnouby, E., & El Sarag, E. (2015). Improving sweet leaf (*Stevia rebaudiana* var. Bertoni) resistance to bialaphos herbicide via *bar* gene transfer. *Plant Omics*, 8(3), 232-237.
- Mulabagal, V., & Tsay, H. S. (2004). Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int J Appl Sci Eng*, 2(1), 29-48.
- Muñoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Ros, R., & Segura, J. (2006). Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant physiology*, 142(3), 890-900.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 31, 129-139.
- Ngara, R., Ndimba, R., Borch-Jensen, J., Jensen, O. N., & Ndimba, B. (2012). Identification and profiling of salinity stress-responsive proteins in *Sorghum bicolor* seedlings. *Journal of Proteomics*, 75(13), 4139-4150.
- Nilsson, O., & Olsson, O. (1997). Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 463-473.

- Noël, L. D., Cagna, G., Stuttmann, J., Wirthmüller, L., Betsuyaku, S., Witte, C. P., Bhat, R., Pochon, N., Colby, T., & Parker, J. E. (2007). Interaction between SGT1 and cytosolic/nuclear HSC70 chaperones regulates *Arabidopsis* immune responses. *The Plant Cell*, 19(12), 4061-4076.
- Nouri, M. Z., Moumeni, A., & Komatsu, S. (2015). Abiotic stresses: insight into gene regulation and protein expression in photosynthetic pathways of plants. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 20392-20416.
- Nower, A. A. (2014). *In vitro* propagation and synthetic seeds production: An efficient methods for *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Tech*, 16(1), 100-108.
- Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., & Stitt, M. (2010). Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular plant*, 3(6), 973-996.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250, 4007-4021.
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., & Yamaguchi, S. (2003). Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Cell*, 15(7), 1591-1604.
- Ohashi, Y., Oka, A., Rodrigues-Pousada, R., Possenti, M., Ruberti, I., Morelli, G., & Aoyama, T. (2003). Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Science*, 300(5624), 1427-1430.
- Okada, K., Kawaide, H., Kuzuyama, T., Seto, H., Curtis, I. S., & Kamiya, Y. (2002). Antisense and chemical suppression of the nonmevalonate pathway affects ent-kaurene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta*, 215(2), 339-344.
- Okushima, Y., Overvoorde, P. J., Arima, K., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J. R., Hughes, B., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., & Theologis, A. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant Cell*, 17(2), 444-463.

- Oyama, T., Shimura, Y., & Okada, K. (2002). The IRE gene encodes a protein kinase homologue and modulates root hair growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 30(3), 289-299.
- Pande, S. D., Iqbal, M., & Srivastava, P. S. (2000). Effect of ZnSO₄ and CuSO₄ on regeneration and lepidine content in *Lepidimun sativum* L. *Biologia plantarum*, 43(2), 253-256.
- Pandey, H., Pandey, P., Pandey, S. S., Singh, S., & Banerjee, S. (2016). Meeting the challenge of stevioside production in the hairy roots of *Stevia rebaudiana* by probing the underlying process. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126(3), 511-521.
- Park, M. H. (2006). The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *Journal of biochemistry*, 139(2), 161-169.
- Patterson, S. D., & Aebersold, R. (1995). Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis*, 16(1), 1791-1814.
- Peleg, Z., & Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 290-295.
- Peltier, J. B., Ytterberg, A. J., Sun, Q., & van Wijk, K. J. (2004). New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49367-49383.
- Peltier, J. B., Ytterberg, J., Liberles, D. A., Roepstorff, P., & van Wijk, K. J. (2001). Identification of a 350 kDa ClpP protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 16318-16327.
- Peterman, T. K., Ohol, Y. M., McReynolds, L. J., & Luna, E. J. (2004). Patellin1, a novel Sec14-like protein, localizes to the cell plate and binds phosphoinositides. *Plant physiology*, 136(2), 3080-3094.
- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro* culture of higher plants. *Springer Science & Business Media*, 1-354.

- Pitta-Alvarez, S. I., Spollansky, T. C., & Giulietti, A. M. (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(4), 252-258.
- Pogson, B. J., & Albrecht, V. (2011). Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. *Plant Physiology*, 1-19.
- Pól, J., Ostrá, E. V., Karásek, P., Roth, M., Benešová, K., Kotlaříková, P., & Čáslavský, J. (2007). Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 388(8), 1847-1857.
- Pollard, T. D., & Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4), 453-465.
- Pontier, D., Picart, C., Roudier, F., Garcia, D., Lahmy, S., Azevedo, J., Alart, E., Michéle, L., Karlowski, W. M., Cooke, R., Colot, V., Voinnet, O., & Lagrange, T. (2012). NERD, a plant-specific GW protein, defines an additional RNAi-dependent chromatin-based pathway in *Arabidopsis*. *Molecular cell*, 48(1), 121-132.
- Potrykus, I. (1991). Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annual review of plant biology*, 42(1), 205-225.
- Preethi, D., Sridhar, T. M., & Naidu, C. V. (2011). Efficient protocol for indirect shoot regeneration from leaf explants of *Stevia rebaudiana* (Bert.) An important calorie free biosweetener. *Journal of Phytology*, 3(5), 56-60.
- Prisic, S., & Peters, R. J. (2007). Synergistic substrate inhibition of ent-copalyl diphosphate synthase: a potential feed-forward inhibition mechanism limiting gibberellin metabolism. *Plant physiology*, 144(1), 445-454.
- Prisic, S., Xu, J., Coates, R. M., & Peters, R. J. (2007). Probing the role of the DXDD motif in class II diterpene cyclases. *ChemBioChem*, 8(8), 869-874.
- Proudfoot, N. J., Furger, A., & Dye, M. J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, 108(4), 501-512.

- Qiao, W., & Fan, L. M. (2008). Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1238-1246.
- Qin, C., & Wang, X. (2002). The Arabidopsis phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD ζ 1 with distinct regulatory domains. *Plant physiology*, 128(3), 1057-1068.
- Rafiq, M., Dahot, M. U., Mangrio, S. M., Naqvi, H. A., & Qarshi, I. A. (2007). *In vitro* clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pak J Bot*, 39, 2467-2474.
- Ramesh, K., Singh, V., & Megeji, N. W. (2006). Cultivation of *Stevia* [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A comprehensive review. *Advances in Agronomy*, 89, 137-177.
- Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153.
- Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., & O'Neal, J. M. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *TRENDS in Biotechnology*, 20(12), 522-531.
- Rasool, K. G., Khan, M. A., Aldawood, A. S., Tufail, M., Mukhtar, M., & Takeda, M. (2015). Identification of proteins modulated in the date palm stem infested with red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* oliv.) using two-dimensional differential gel electrophoresis and mass spectrometry. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 19326-19346.
- Razak, U. N. A. A., Ong, C. B., Yu, T. S., & Lau, L. K. (2014). *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(1), 23-28.
- Reis, R. V., Borges, A. P. P. L., Chierrito T. P. C., de Souto E. R., de Souza L. M., Iacomini M., de Oliveira, A. J. B., & 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.

- Ren, B., Chen, Q., Hong, S., Zhao, W., Feng, J., Feng, H., & Zuo, J. (2013). The *Arabidopsis* eukaryotic translation initiation factor eIF5A-2 regulates root protoxylem development by modulating cytokinin signaling. *The Plant Cell*, 113, 1-17.
- Ren, Y., Lv, J., Wang, H., Li, L., Peng, Y., & Qu, L. J. (2009). A comparative proteomics approach to detect unintended effects in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Genetics and Genomics*, 36(10), 629-639.
- Reyes, S. R., Casanova, E. V., Romero, D. R., Horna, L., & Lopez, C. (2014). Capacidad antioxidante *in vitro* de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de *Sambucus peruviana* HBK (sauco) proveniente de la ciudad de Huamachuco. *Pharmaciencia*, 1(2), 57-64.
- Richman, A., Swanson, A., Humphrey, T., Chapman, R., McGarvey, B., Pocs, R., & Brandle, J. (2005). Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *The Plant Journal*, 41(1), 56-67.
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. *CIAT*, 151, 1-969.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., & Kaiser, W. M. (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 103-110.
- Rodríguez-Concepción, M. (2006). Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochemistry Reviews*, 5(1), 1-15.
- Rogers, S., Girolami, M., Kolch, W., Waters, K. M., Liu, T., Thrall, B., & Wiley, H. S. (2008). Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. *Bioinformatics*, 24(24), 2894-2900.
- Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Richter, G., Schuhr, C. A., Hecht, S., Zenk, M. H., & Bacher, A. (2000). Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-

methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6451-6456.

Rosengren, A. T., Salmi, J. M., Aittokallio, T., Westerholm, J., Lahesmaa, R., Nyman, T. A., & Nevalainen, O. S. (2003). Comparison of PDQuest and Progenesis software packages in the analysis of two-dimensional electrophoresis gels. *Proteomics*, 3(10), 1936-1946.

Ruiz-May, E., De-la-Peña, C., Galaz-Ávalos, R. M., Lei, Z., Watson, B. S., Sumner, L. W., & Loyola-Vargas, V. M. (2011). Methyl jasmonate induces ATP biosynthesis deficiency and accumulation of proteins related to secondary metabolism in *Catharanthus roseus* (L.) G. hairy roots. *Plant and cell physiology*, 52(8), 1401-1421.

Sahu, R., Gangopadhyay, M., & Dewanjee, S. (2013). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Solenostemon scutellarioides*. *Acta physiologiae plantarum*, 35(5), 1473-1481.

Sairkar, P., Shukla, N. P., & Mehrotra, N. N. (2009). Mass production of an economically important medicinal plant *Stevia rebaudiana* using *in vitro* propagation techniques. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(4), 266-270.

Sanford, J. C. (1988). The biolistic process. *Trends in Biotechnology*, 6(12), 299-302.

Sanford, J. C. (2000). The development of the biolistic process. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(5), 303-308.

Sauer, S., & Kliem, M. (2010). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 74-82.

Savita, S. M., Sheela, K., Sunanda, S., Shankar, A. G., & Ramakrishna, P. (2004). *Stevia rebaudiana*-A functional component for food industry. *J. Hum. Ecol*, 15(4), 261-264.

Savitha, B. C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., & Ravishankar, G. A. (2006). Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*, 41(1), 50-60.

- Schaller, A., & Stintzi, A. (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis—structure, function, regulation. *Phytochemistry*, 70(14), 1532-1538.
- Serio, L. (2010). La *Stevia rebaudiana*, une alternative au sucre. *Phytothérapie*, 8(1), 26-32.
- Shatnawi, M. A., Shibli, R. A., Abu-Romman, S. M., Al-Mazra'awi, M. S., Al Ajlouni, Z. I., Shatanawi, W. A., & Odeh, W. H. (2011). Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(1), 213-220.
- Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H., & Mann, M. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14440-14445.
- Shih, C. H., Chu, H., Tang, L. K., Sakamoto, W., Maekawa, M., Chu, I. K., Wang, M., & Lo, C. (2008). Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. *Planta*, 228(6), 1043-1054.
- Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F., & Kaul, V. K. (2013). Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Complications*, 27(2), 103-113.
- Shively, J. E. (2000). The chemistry of protein sequence analysis. *In Proteomics in Functional Genomics*, 88, 99-117.
- Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V. K., & Shukla, S. (2009). *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2338-2343.
- Simpson, P. J., Tantitadapitak, C., Reed, A. M., Mather, O. C., Bunce, C. M., White, S. A., & Ride, J. P. (2009). Characterization of two novel aldo–keto reductases from *Arabidopsis*: expression patterns, broad substrate specificity, and an open active-site structure suggest a role in toxicant metabolism following stress. *Journal of molecular biology*, 392(2), 465-480.

- Singh, H. P., Dhir, S. K., & Dhir, S. (2005). *Stevia*. Compendium of transgenic crop plants. *Sugar Technol*, 7, 17-24.
- Singh, R. (2011). Genetic evaluation of *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction on *Stevia rebaudiana* L. Bertoni. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(3), 468-473.
- Sivaram, L., & Mukundan, U. (2003). *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39(5), 520-523.
- Smith, J., & Van-Stadin, H. (1992). Subcellular pathway of glycoside synthesis. *S. Afr. J. Sci*, 88, 206.
- Smith, M. D., Rounds, C. M., Wang, F., Chen, K., Afithile, M., & Schnell, D. J. (2004). atToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. *The Journal of cell biology*, 165(3), 323-334.
- Soejarto, D. D., Compadre, C. M., Medon, P. J., Kamath, S. K., & Kinghorn, A. D. (1983). Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Economic Botany*, 37(1), 71-79.
- Solanke, A. U., & Sharma, A. K. (2008). Signal transduction during cold stress in plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 14(2), 69-79.
- Soliman, H. I. A., Metwali, E. M. R., & Almaghrabi, O. A. H. (2014). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and assessment of genetic stability of *in vitro* regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *Plant Biotechnology*, 31(3), 249-256.
- Spreitzer, R. J., & Salvucci, M. E. (2002). Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual review of plant biology*, 53, 449-475.
- Ståhl, A., Moberg, P., Ytterberg, J., Panfilov, O., von Löwenhielm, H. B., Nilsson, F., & Glaser, E. (2002). Isolation and identification of a novel mitochondrial metalloprotease (PreP) that degrades targeting presequences in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 1-30.

- Staiger, C. J., & Blanchoin, L. (2006). Actin dynamics: old friends with new stories. *Current opinion in plant biology*, 9(6), 554-562.
- Steinbrenner, A. D., Agerbirk, N., Orians, C. M., & Chew, F. S. (2012). Transient abiotic stresses lead to latent defense and reproductive responses over the *Brassica rapa* life cycle. *Chemoecology*, 22(4), 239-250.
- Suanarunsawat, T., & Chaiyabutr, N. (1997). The effect of stevioside on glucose metabolism in rat. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 75(8), 976-982.
- Sun, Q., Emanuelsson, O., & van Wijk, K. J. (2004). Analysis of curated and predicted plastid subproteomes of *Arabidopsis*. Subcellular compartmentalization leads to distinctive proteome properties. *Plant physiology*, 135(2), 723-734.
- Sunkar, R., Kapoor, A., & Zhu, J. K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell*, 18(8), 2051-2065.
- Tada, A., Ishizuki, K., Iwamura, J., Mikami, H., Hirao, Y., Fujita, I., Yamazaki, T., Akiyama, H., & Kawamura, Y. (2013). Improvement of the assay method for steviol glycosides in the JECFA specifications. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4(4), 190-196.
- Tadhani, M. B., Patel, V. H., & Subhash, R. (2007). *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3), 323-329.
- Tadhani, M., & Subhash, R. (2006). Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *J. Med. Sci*, 6(3), 321-326.
- Takahashi, K., Matsuda, M., Ohashi, K., Taniguchi, K., Nakagomi, O., Abe, Y., Mori, S., Sato, N., Okutani, K., & Shigeta, S. (2001). Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral research*, 49(1), 15-24.
- Tanaka, Y., Matsuoka, M., Yamamoto, N., Ohashi, Y., Kano-Murakami, Y., & Ozeki, Y. (1989). Structure and characterization of a cDNA clone for phenylalanine ammonia-lyase from cut-injured roots of sweet potato. *Plant physiology*, 90(4), 1403-1407.

- Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847-859.
- Thiyagarajan, M., & Venkatachalam, P. (2012). Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 111-117.
- Tian, M., Chaudhry, F., Ruzicka, D. R., Meagher, R. B., Staiger, C. J., & Day, B. (2009). *Arabidopsis* actin-depolymerizing factor AtADF4 mediates defense signal transduction triggered by the *Pseudomonas syringae* effector AvrPphB. *Plant physiology*, 150(2), 815-824.
- Tomanek, L. (2011). Environmental proteomics: Changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis, and development. *Annu. Rev. Mar. Sci*, 3, 373-399.
- Tomás-Barberán, F. A., & 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.
- Totté, N., Charon, L., Rohmer, M., Compennolle, F., Baboeuf, I., & Geuns, J. M. (2000). Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. *Tetrahedron Letters*, 41(33), 6407-6410.
- Towers, G. N., & Ellis, S. (1993). Secondary metabolism in plant tissue cultures transformed with *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Secondary Metabolism in Plant Tissue Cultures*, 6, 56-78.
- Uenaka, H., & Kadota, A. (2007). Functional analyses of the *Physcomitrella patens* phytochromes in regulating chloroplast avoidance movement. *The Plant Journal*, 51(6), 1050-1061.

- Ukiya, M., Sawada, S., Kikuchi, T., Kushi, Y., Fukatsu, M., & Akihisa, T. (2013). Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of steviol and isosteviol derivatives against human cancer cell lines. *Chemistry & biodiversity*, 10(2), 177-188.
- Valadkhan, S., & Jaladat, Y. (2010). The spliceosomal proteome: at the heart of the largest cellular ribonucleoprotein machine. *Proteomics*, 10(22), 4128-4141.
- Vashisht, I., Mishra, P., Pal, T., Chanumolu, S., Singh, T. R., & Chauhan, R. S. (2015). Mining NGS transcriptomes for miRNAs and dissecting their role in regulating growth, development, and secondary metabolites production in different organs of a medicinal herb, *Picrorhiza kurroa*. *Planta*, 241(5), 1255-1268.
- Vellosillo, T., Martínez, M., López, M. A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Hamberg, M., & Castresana, C. (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *The Plant Cell*, 19(3), 831-846.
- Verpoorte, R., & Alfermann, A. W. (2013). Metabolic engineering of plant secondary metabolism. *Springer Science & Business Media*, 1-293.
- Vranová, E., Coman, D., & Grisse, W. (2013). Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual review of plant biology*, 64, 665-700.
- Wang, C., Zien, C. A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D. F., & Wang, X. (2000). Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12(11), 2237-2246.
- Wang, L., Cao, H., Chen, C., Yue, C., Hao, X., Yang, Y., & Wang, X. (2016). Complementary transcriptomic and proteomic analyses of a chlorophyll-deficient tea plant cultivar reveal multiple metabolic pathway changes. *J. Proteome*, 130, 160-169.
- Wang, L., Wang, X., Jin, X., Jia, R., Huang, Q., Tan, Y., & Guo, A. (2015). Comparative proteomics of Bt-transgenic and non-transgenic cotton leaves. *Proteome science*, 13(1), 1-15.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.

- Wang, X., Cai, X., Xu, C., Wang, Q., & Dai, S. (2016). Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1-30.
- Wasternack, C. (2009). Jasmonates in stress, growth, and development. *Plant Stress Biology*, 5, 91-118.
- Wendehenne, D., Durner, J., & Klessig, D. F. (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 449-455.
- Will, C. L., & Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(7), 1-23.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO journal*, 16(16), 4806-4816.
- Wittmann-Liebold, B., Graack, H. R., & Pohl, T. (2006). Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*, 6(17), 4688-4703.
- Wright, L. P., Rohwer, J. M., Ghirardo, A., Hammerbacher, A., Ortiz-Alcaide, M., Raguschke, B., Schnitzler, J. P., Gershenzon, J., & Phillips, M. A. (2014). Deoxyxylulose 5-phosphate synthase controls flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 165(4), 1488-1504.
- Wu, F. S., & Feng, T. Y. (1999). Delivery of plasmid DNA into intact plant cells by electroporation of plasmolyzed cells. *Plant Cell Reports*, 18(5), 381-386.
- Xing, S., & Zachgo, S. (2008). ROXY1 and ROXY2, two *Arabidopsis* glutaredoxin genes, are required for anther development. *The Plant Journal*, 53(5), 790-801.
- Xu, J., Zhang, B., Jiang, C., & Ming, F. (2011). RceIF5A, encoding a eukaryotic translation initiation factor 5A in *Rosa chinensis*, can enhance thermotolerance, oxidative and osmotic stress resistance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 75(2), 167-178.

- Xu, Y. H., Liu, R., Yan, L., Liu, Z. Q., Jiang, S. C., Shen, Y. Y., Wang, X. F., & Zhang, D. P. (2011). Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 63(3), 1095-1106.
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D., & Ahuja, P. S. (2011). A review on the improvement of *Stevia* [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(1), 1-27.
- Yaish, M. W., Peng, M., & Rothstein, S. J. (2009). AtMBD9 modulates *Arabidopsis* development through the dual epigenetic pathways of DNA methylation and histone acetylation. *The Plant Journal*, 59(1), 123-135.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J., & Wu, J. Y. (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant science*, 170(4), 853-858.
- Yang, D. C., & Choi, Y. E. (2000). Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep*, 19, 491-496.
- Yang, Y., Huang, S., Han, Y., Yuan, H., Gu, C., & 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.
- Youssef, A., Laizet, Y. H., Block, M. A., Maréchal, E., Alcaraz, J. P., Larson, T. R., Gaffé, J., & Kuntz, M. (2010). Plant lipid-associated fibrillin proteins condition jasmonate production under photosynthetic stress. *The Plant Journal*, 61(3), 436-445.
- Yu, H., Yang, G., Sato, M., Yamaguchi, T., Nakano, T., & Xi, Y. (2017). Antioxidant activities of aqueous extract from *Stevia rebaudiana* stem waste to inhibit fish oil oxidation and identification of its phenolic compounds. *Food chemistry*, 232, 379-386.
- Yu, J., Chen, S., Wang, T., Sun, G., & Dai, S. (2013). Comparative proteomic analysis of *Puccinellia tenuiflora* leaves under Na₂CO₃ stress. *International journal of molecular sciences*, 14(1), 1740-1762.

- Yu, J., Chen, S., Zhao, Q., Wang, T., Yang, C., Diaz, C., Sun, G., & Dai, S. (2011). Physiological and proteomic analysis of salinity tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. *Journal of Proteome Research*, 10(9), 3852-3870.
- Yu, Z. X., Wang, L. J., Zhao, B., Shan, C. M., Zhang, Y. H., Chen, D. F., & Chen, X. Y. (2015). Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in *Arabidopsis* and Patchouli (*Pogostemon cablin*) by the miR156-targeted SPL transcription factors. *Molecular plant*, 8(1), 98-110.
- Yücesan, B., Mohammed, A., Büyükgöçmen, R., Altuğ, C., Kavas, Ö., Gürel, S., & Gürel, E. (2016). *In vitro* and *ex vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni with high Rebaudioside-A content-A commercial scale application. *Scientia Horticulturae*, 203, 20-28.
- Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y., & Hara, Y. (1996). Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature biotechnology*, 14(9), 1129-1132.
- Zamudio-Arroyo, J. M., Peña-Rangel, M. T., & Riesgo-Escovar, J. R. (2012). La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 133-141.
- Zayova, E., Stancheva, I., Geneva, M., Petrova, M., & Dimitrova, L. (2013). Antioxidant activity of *in vitro* propagated *Stevia rebaudiana* Bertoni plants of different origins. *Turkish Journal of Biology*, 37(1), 106-113.
- Zeng, J., Chen, A., Li, D., Yi, B., & Wu, W. (2013). Effects of salt stress on the growth, physiological responses, and glycoside contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(24), 5720-5726.
- Zhang, C., Yan, Q., Cheuk, W. K., & Wu, J. (2004). Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag⁺ elicitation and nutrient feeding. *Planta medica*, 70(2), 147-151.

- Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M., & Franco, C. (2002). Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*, 162(3), 459-468.
- Zhang, X. L., Zhang, J., Guo, Y. H., Sun, P., Jia, H. X., Fan, W., Lu M. Z., & Hu, J. J. (2016). Comparative proteomic analysis of mature pollen in triploid and diploid *Populus deltoides*. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1-17.
- Zhang, Z., Zhang, Q., Wu, J., Zheng, X., Zheng, S., Sun, X., Qui, Q., & Lu, T. (2013). Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2 (OsAPX2) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses. *PloS one*, 8(2), 1-13.
- Zhao, C., Wang, J., Cao, M., Zhao, K., Shao, J., Lei, T., Yin, J., Hill, G. G., Xu, N., & Liu, S. (2005). Proteomic changes in rice leaves during development of field-grown rice plants. *Proteomics*, 5(4), 961-972.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23(4), 283-333.
- Zhao, Z., & Assmann, S. M. (2011). The glycolytic enzyme, phosphoglycerate mutase, has critical roles in stomatal movement, vegetative growth, and pollen production in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 62(14), 5179-5189.
- Zhong, D., Du, H., Wang, Z., & Huang, B. (2011). Genotypic variation in fatty acid composition and unsaturation levels in bermudagrass associated with leaf dehydration tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(1), 35-40.
- Zhou, M. L., Zhu, X. M., Shao, J. R., Tang, J. R., & Wu, Y. M. (2011). Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90, 1229-1239.
- Zhou, M., & Veenstra, T. D. (2008). Mass spectrometry: m/z 1983–2008. *Biotechniques*, 44(5), 667-670.
- Zhou, Y., Wu, X. X., Zhang, Z., & Gao, Z. H. (2015). Comparative proteomic analysis of floral color variegation in peach. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 464, 1101-1106.

- Zien, C. A., Wang, C., Wang, X., & Welti, R. (2001). *In vivo* substrates and the contribution of the common phospholipase D, PLD α , to wound-induced metabolism of lipids in *Arabidopsis*. *(BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1530(2), 236-248.
- Zolla, L., Rinalducci, S., Timperio, A. M., & Huber, C. G. (2002). Proteomics of light-harvesting proteins in different plant species. Analysis and comparison by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Photosystem I. *Plant physiology*, 130(4), 1938-1950.

11. ANEXOS

Anexo 1, sección 6.1:

Para la construcción del plásmido binarios pCAMsrDXS se utilizó el plásmido binario **pCAMBIA 1105.1** que contiene el gen de resistencia a higromicina (aph) para la selección de plantas y el gen GUSPlus como reportero para investigar la transferencia de genes. P35S y Pe35S, promotor y potenciador + promotor de CaMV35S, respectivamente; TNOS y T35S, terminadores de *A. tumefaciens*, gen de la nopalina sintasa y CaMV35S, respectivamente; cat, catalasa intrón; LB la izquierda y RB la secuencia de borde derecho del ADN-T. Finalmente se obtuvo el plásmido pCAMsrDXS (Fig. 40), donde se incluye la secuencia modificada y optimizada de DXS, sintetizada por el proveedor GenScript.

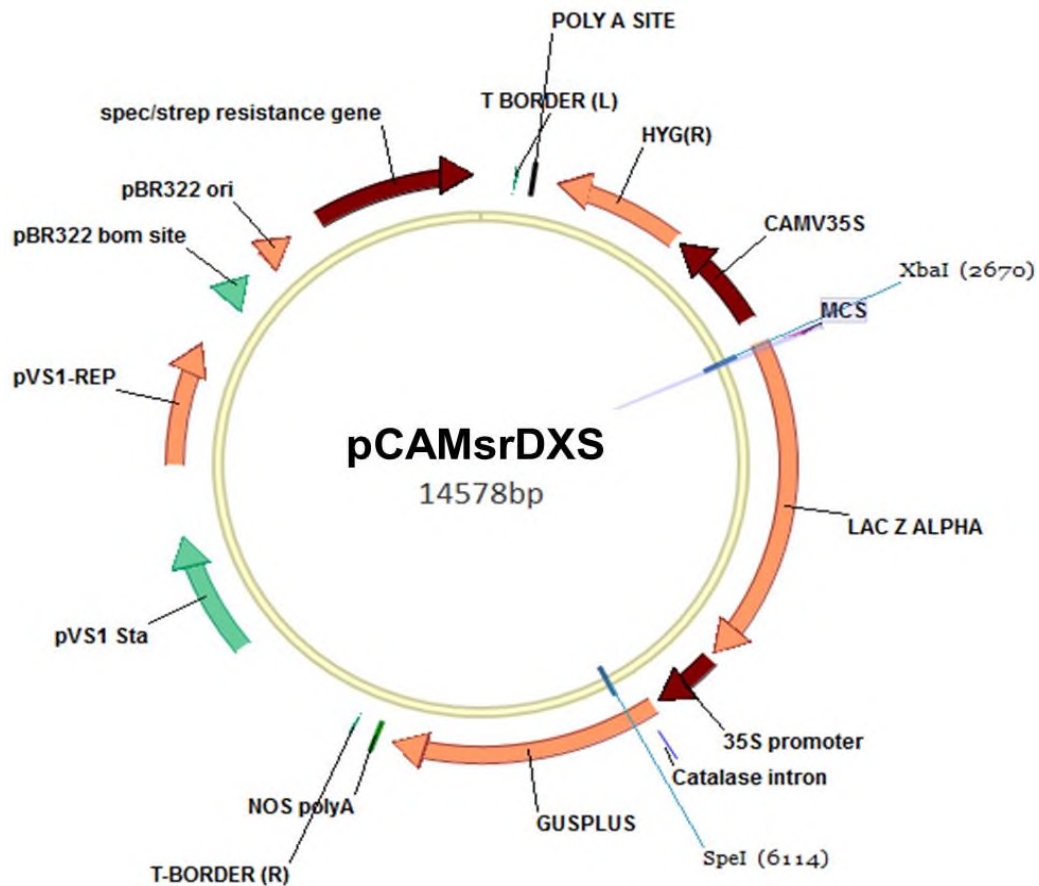


Fig. 40. Plásmido binario pCAMsrDXS conteniendo una secuencia modificada del gen DXS.

Anexo 2, sección 6.4:

En la Fig. 41, se muestra como se seccionaron las plántulas por zonas para poder calcular en área foliar en donde se tomaron 10 hojas de la parte baja, 10 de la parte intermedia y 10 del meristemo apical, para así tener un número representativo de cada toma de muestra.

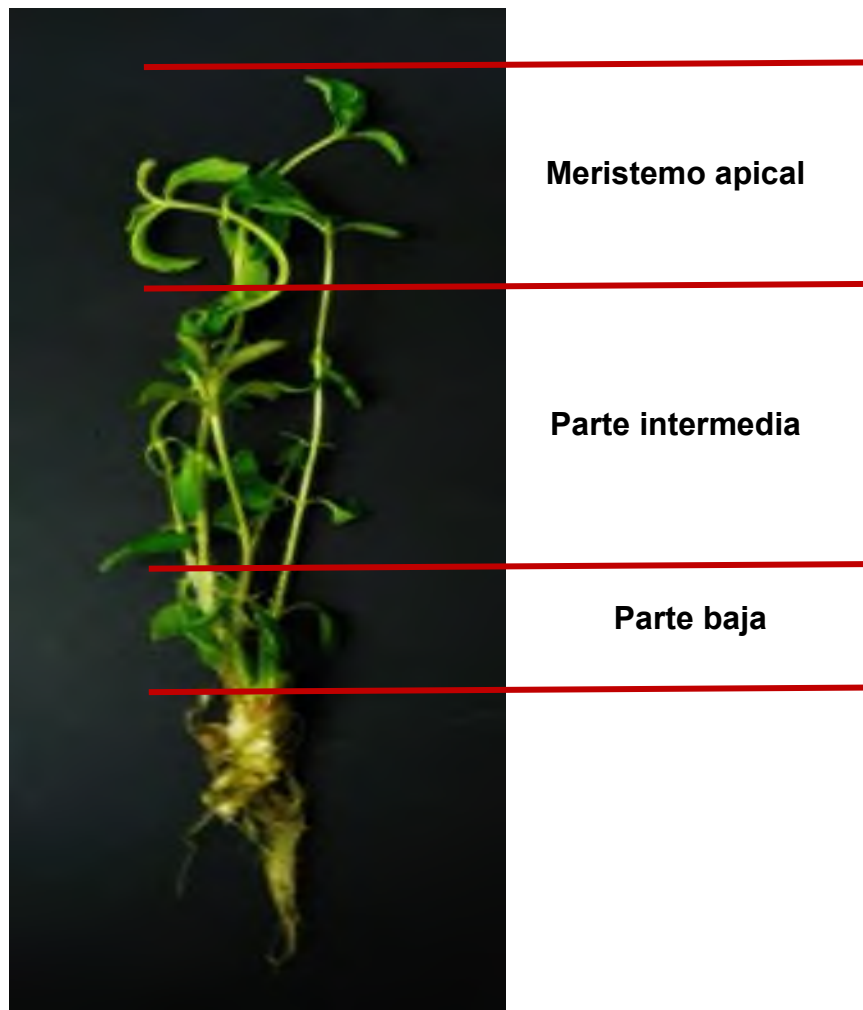


Fig. 41. Zonas en las que se seccionaron las plántulas para calcular el área foliar.

Anexo 3, sección 6.4:

Para poder calcular el área foliar se tomó muestra a los días 15, 20, 25, 30 y 35, tomando de la parte baja, la intermedia y del meristemo apical (Fig. 42).



Fig. 42. Toma de muestra para calcular el área foliar a los días **A:** 15, **B:** 20, **C:** 25, **D:** 30, **E:** 35 de plántulas **S:** silvestres y **T:** transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*.

Anexo 4, sección 6.5.4:

Para poder calcular la concentración de esteviósido y rebaudiósido A se realizaron curvas de calibración con sus respectivos estandares, utilizando concentraciones de 25, 50, 100, 250, 350 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 43).

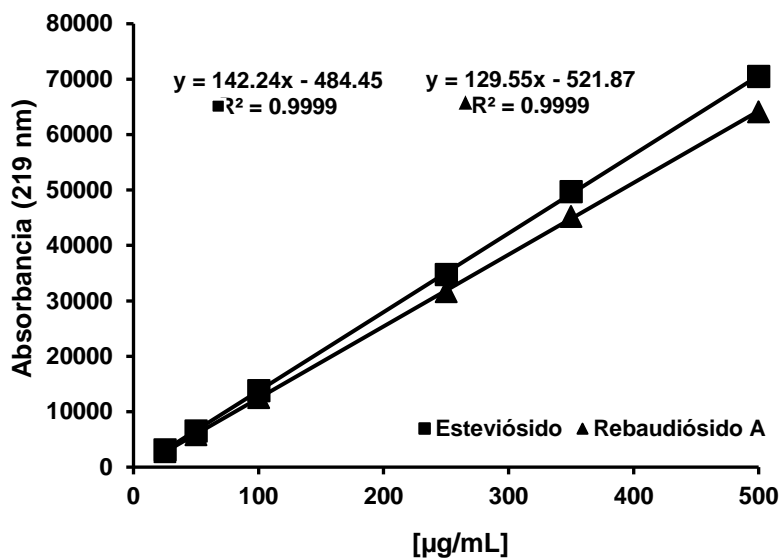


Fig. 43. Curva de calibración de estevósido y rebaudiósido A.

Anexo 5, sección 6.5.5:

Para poder calcular la concentración de fenoles totales se realizó un curva de calibración con ácido gálico a una concentración de 0.650 mg/mL (Fig. 44).

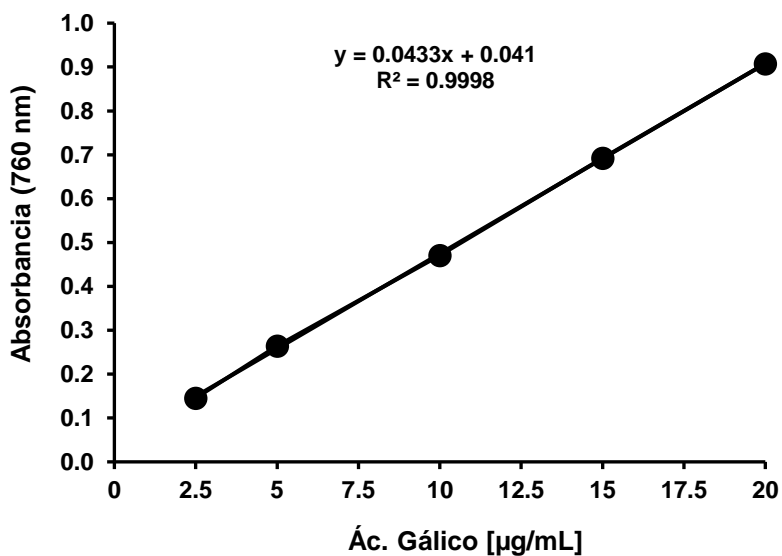


Fig. 44. Curva de calibración de fenoles totales.

Anexo 6, sección 6.5.7:

Para poder calcular la concentración de fenoles totales se realizó un curva de calibración con rutina a una concentración de 0.5 mg/mL (Fig. 45).

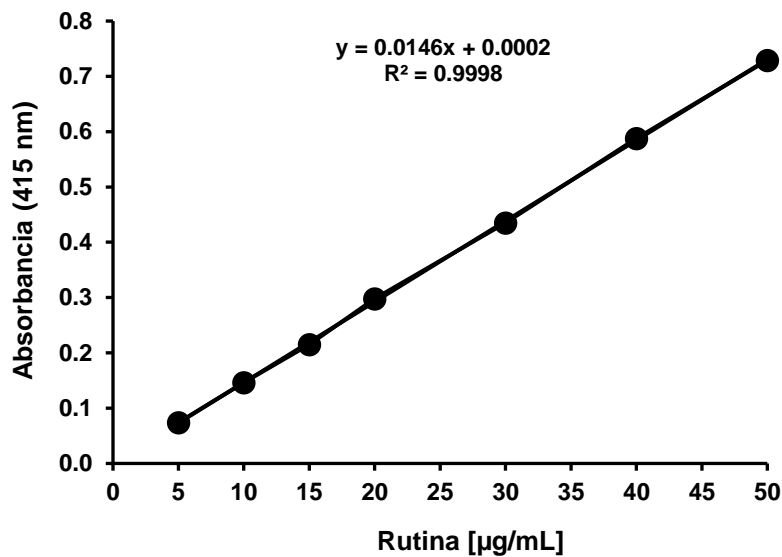


Fig. 45. Curva de calibración de flavonoides totales.

Anexo 7, sección 6.7.2:

Para poder calcular la concentración de proteína total soluble se realizó un curva de calibración con albúmina de suero bovino a una concentración de 2 mg/mL (Fig. 46).

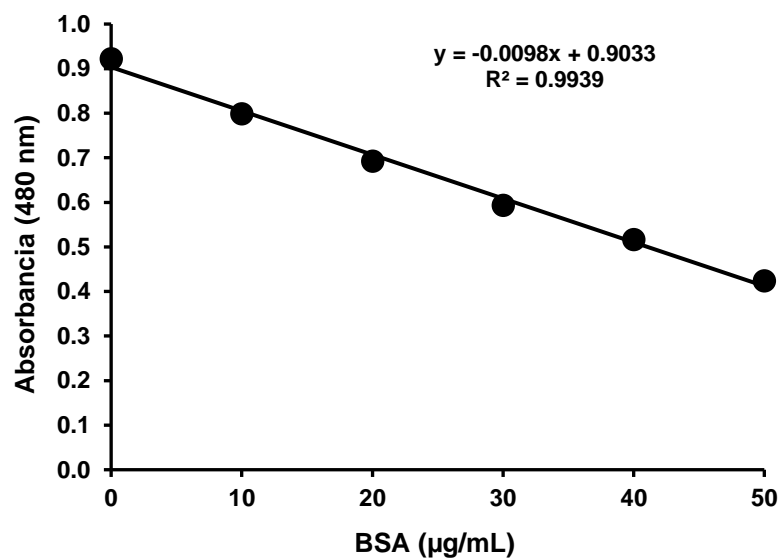


Fig. 46. Curva de calibración de proteína total soluble.

Anexo 8, sección 6.7.2:

Se realizó un análisis estadístico utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%, indicándonos que las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) fueron estadísticamente diferentes en todos los parámetros fisiológicos (con excepción del porcentaje de humedad) durante toda la cinética, en comparación con las plántulas silvestres (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis estadístico de los parámetros fisiológicos de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) vs silvestres de *Stevia rebaudiana*.

Número de raíces			Biomasa de raíces (PF)		Diámetro de tallo (mm)		Longitud de plántulas (cm)		Número de hojas		Contenido de clorofila a (mg/gPF)		Contenido de clorofila b (mg/gPF)	
Plántula	Media	Agrupación	Media	Agrupación	Media	Agrupación	Media	Agrupación	Media	Agrupación	Media	Agrupación	Media	Agrupación
Transformada	9.50	A	23.63	A	1.41	A	9.95	A	73.50	A	1.51	A	0.71	A
Silvestre	8.00	B	16.94	B	1.21	B	8.45	B	61.20	B	1.14	B	0.55	B
Contenido de carotenoides (mg/gPF)			Área foliar de la parte baja (cm ²)		Área foliar de la parte intermedia (cm ²)		Área foliar del meristemo apical (cm ²)		Biomasa de parte aérea (PF)		Biomasa de parte aérea (PS)		Porcentaje de humedades	
Plántula	Media	Agrupación	Media	Agrupación	Media	Agrupación	Media	Agrupación	Media	Agrupación	Media	Agrupación	Media	Agrupación
Transformada	1.87	A	0.15	A	0.28	A	0.21	A	348.57	A	31.14	A	91.77	A
Silvestre	1.31	B	0.12	B	0.20	B	0.15	B	267.81	B	23.19	B	91.95	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 9, sección 7.4.1:

Los análisis por UHPLC mostraron que las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) produjeron una mayor cantidad de Reb A y Est, en comparación a las plántulas silvestres de *S. rebaudiana* (Fig. 47).

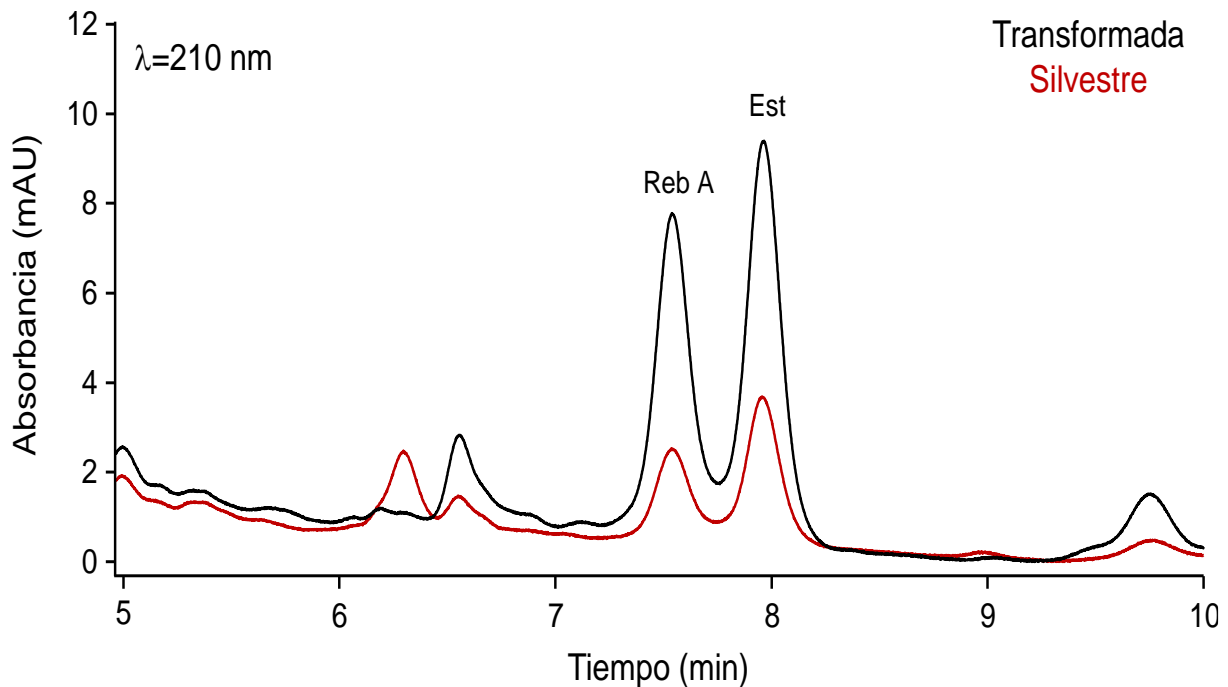


Fig. 47. Cromatograma de la producción de rebaudiósido A y esteviósido de plántulas transformadas (pCAMsrDXS) (-) y silvestres (-) de *Stevia rebaudiana*, a los 35 días de cultivo.

Anexo 10, sección 7.4.1:

Para verificar si existía diferencia significativa en la producción de GEs entre las plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *S. rebaudiana* se realizó un análisis estadístico utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%, indicando que las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) fueron estadísticamente diferentes en la acumulación de GEs (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis estadístico de la producción de glucósidos de esteviol de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) vs silvestres de *Stevia rebaudiana*.

Plántula	Esteviósido		Rebaudiósido A		Reb A/Est	
	Media	Agrupación	Media	Agrupación	Media	Agrupación
Transformada	2.48	A	3.97	A	6.80	A
Silvestre	2.10	B	2.76	B	4.86	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 11, sección 7.4.2:

Para verificar si existía diferencia significativa en la producción de fenoles totales entre las plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *S. rebaudiana* se realizó un análisis estadístico utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%, indicándonos que no había diferencia significativa entre ambas plántulas (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis estadístico de la producción de fenoles totales de las plántulas transformadas (pCAMsrDXS) vs silvestres de *Stevia rebaudiana*.

Plántula	Fenoles totales	
	Media	Agrupación
Transformada	25.31	A
Silvestre	26.08	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

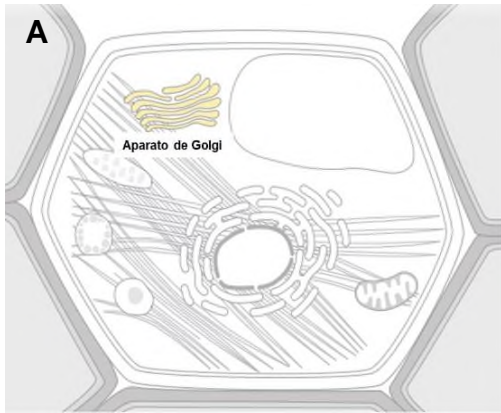
Anexo 12, sección 7.5.4:

La ubicación celular de cada proteína identificada se relaciona con su función dentro de las plántulas, algunas se pueden detectar en diferentes lugares gracias a las diversas funciones que cumplen. En la Fig. 48 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M y N, se resume cuantas proteínas se detectaron en cada parte de la célula.

UNPA

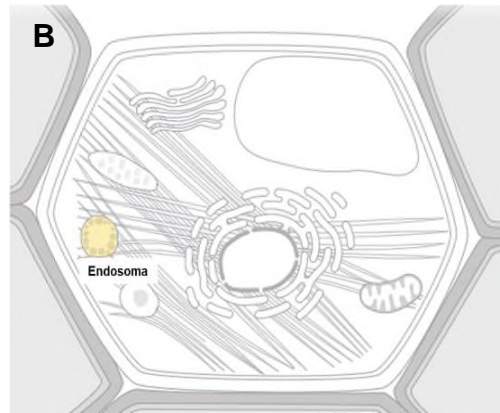
ANEXOS

AJSC



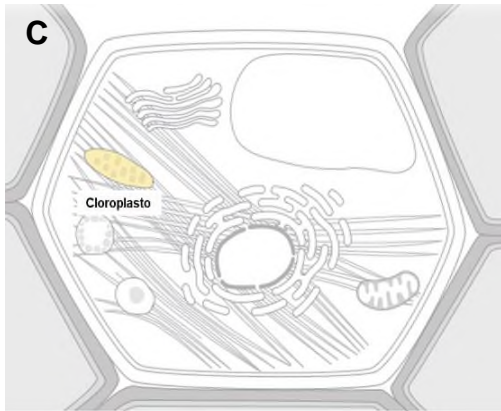
Total de manchas proteicas detectadas

1



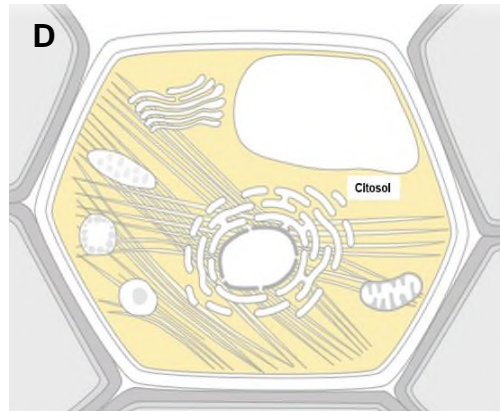
Total de manchas proteicas detectadas

1



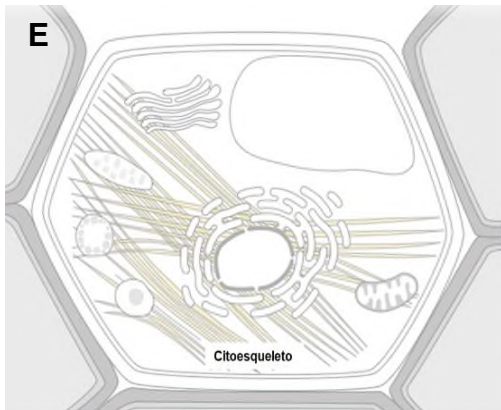
Total de manchas proteicas detectadas

54



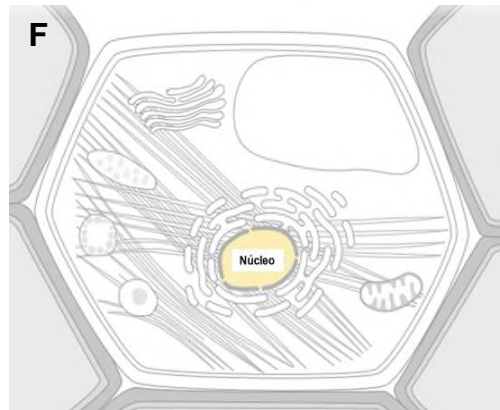
Total de manchas proteicas detectadas

7



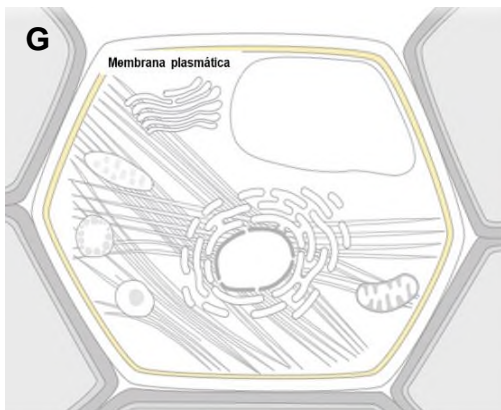
Total de manchas proteicas detectadas

5



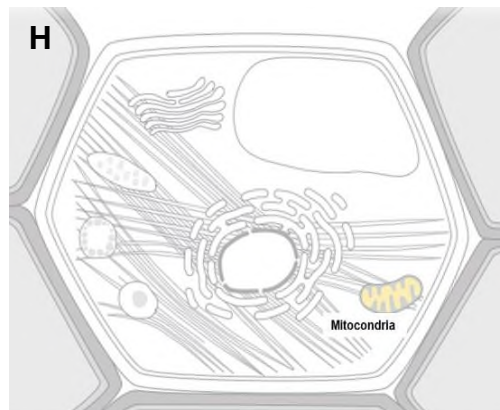
Total de manchas proteicas detectadas

18



Total de manchas proteicas detectadas

4



Total de manchas proteicas detectadas

12

UNPA

ANEXOS

AJSC

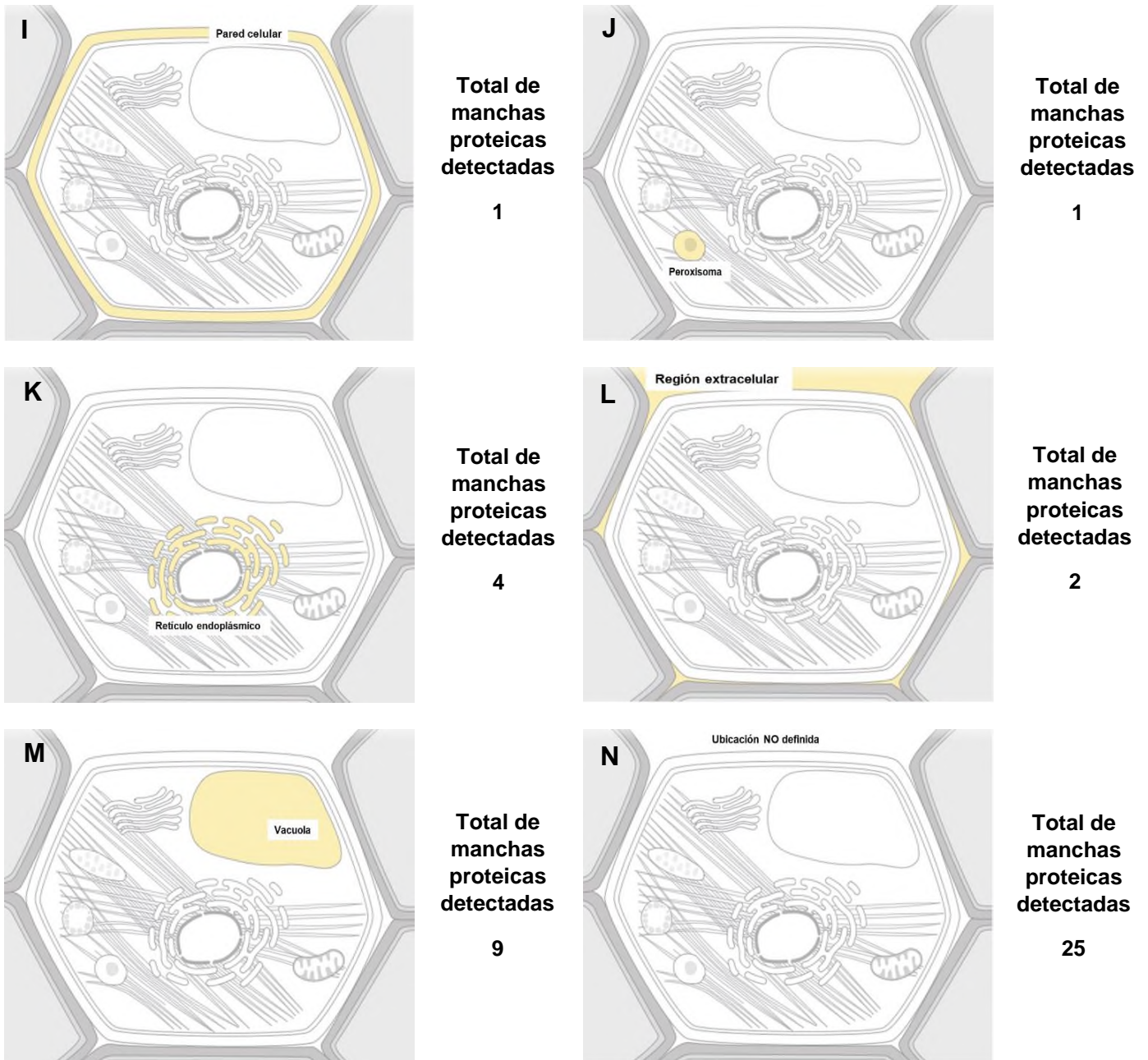


Fig. 48. Ubicación celular de las proteínas identificadas de las plántulas silvestres y transformadas (pCAMsrDXS) de *Stevia rebaudiana*.

Anexo 13, sección 7.5.5:

A continuación, se presentan las secuencias de las proteínas identificadas y los péptidos que se detectaron por MALDI-TOF-MS. Los fragmentos en las secuencias en color amarillo representan los péptidos identificados con una identidad del 100%

Candidata de Golgi 1, mancha 4506 – 6.93% de cobertura (Silvestre).**SYEASIR****SVVEDLSEEQNDLQLPASGR****AKSVVEDLSEEQNDLQLPASGR**

10	20	30	40	50
MASWLKAAED	LFEVVDRR AK	SVVEDLSEEQ	NDLQLPASGR	KGSQGKRTSS
60	70	80	90	100
KKKKLVKEES	SNKRDSSGDQ	SGPGVVSQSEV	PPSKSSVSTD	ETSSSGPVLL
110	120	130	140	150
TREIHPTDAD	VQSVLSLPLS	VADTKSDDAA	VVAQESIVDG	DRSESKHADG
160	170	180	190	200
DIPNDSLQVP	SPSLPDKEIE	VVSENLMDA	PKNGTQRELD	DSSKRDVENL
210	220	230	240	250
DSVVHAPSVN	EGNVAQSTGD	EVKVGTINL	EKEQEPKVPV	TSTNLKREQD
260	270	280	290	300
RRADTTSMKI	QDQLEEAQGL	LKATVSTGQS	KEARLARVCA	GLSSRLQEIK
310	320	330	340	350
AENAQLEELL	TAEQELTK SY	EASIR HLQKD	LSAAKSEVTK	VESSMVEALA
360	370	380	390	400
AKNSEIETLV	SAMDALKNQA	ALNEGKLSL	QGDMEISMRN	RELAETRMNQ
410	420	430	440	450
ALREELATTE	RRAEEERSAH	NATKMAAMER	ERELEHRAVD	ASTALVRIQR
460	470	480	490	500
IADERTAKVA	DFEQKVALLE	AECTSLNQEL	QDMEVRARRG	QKKAPDEANQ
510	520	530	540	550
VIQIQAWQDE	VDRARQGQRD	AEEKLSLMEA	EMQKLRVEMA	AMKRDAEHYS
560	570	580	590	600
RQEHELEKTR	YRELTDLLEY	KQTQLETMAS	EKAAAEFQLE	KEVKRLHEAQ
610	620	630	640	650
VEVEKSRVSR	RASATWEEDS	EIKTLEPLPL	YHRHMATAST	QLQNAVKLLD
660	670	680	690	700
SGAVRATRF	WRYPIARMFL	LFYLVFVHLF	LMYLIHRLQE	QAEAEQVAAM

TNNVFRL

Subunidad de flavoproteína de transferencia de electrones beta, mancha 7110 – 9.56% de cobertura (Transformada pCAMsrDXS).**SKPIKK****TGLAMGADR****YASLPNIMK**

10	20	30	40	50
MKILVAVKRV	VDYAVKIRVK	PDKTGVETQN	VKMSMNPFCF	IALEEALRIK
60	70	80	90	100
EAGFAKEVIA	VSIGPSQCVD	TLR TGLAMGA	DR GIHVETNS	IFLPLTIAKI
110	120	130	140	150
LKSLADVENP	GLIFLGKQAI	DDDCNQTGQM	VAALLGWPQA	TFASKVVLDK
160	170	180	190	200
DKNVATVDRE	VDGGLETLNV	DLPAVITTDL	RLNQPR YASL	PNIMKAKSKP
210	220	230	240	250
IKK MTVQDLK	VDIKSDIEIL	EVTEPPKRKS	GVMVSSVDEL	IDKLNKNEAHV

V

Fitocromo 1, mancha 3509 – 5.81% de cobertura (Silvestre).**MFMDK****AAEAQEMSLNLPITVNCRR****DLVTDESVAVVERLLYLALR****VSHPGAGLPEELVLEMYDRGK**

10	20	30	40	50
MSTPKKTYSS	TSSAKSKAHS	VRVAQTTADA	ALQAVFEKSG	DSGDSFDYSK
60	70	80	90	100
SVSKSTAESL	PSGAVTAYLQ	RMQRGGLTQS	FGCMIAVEGT	GFRVIAYSEN
110	120	130	140	150
APEILDLVPQ	AVPSVGEMDT	LRIGTDVRTL	FTASSVASLE	KAAEAQEMSL
160	170	180	190	200
LNPITVNCRR	SGKQLYAIAH	RIDIGIVIDF	EAVKTDDHLV	SAAGALQSHK
210	220	230	240	250
LAAKAITRLQ	ALPGGDIGLL	CDTVVEEVRE	LTGYDRVMAY	RFHEDEHGEV
260	270	280	290	300
VAEIRRADLE	PYLGLHYPGT	DIPQASRFLF	MKNKVRRIAD	CSAPPVKVIQ
310	320	330	340	350
DPTLRQPVS	AGSTLRSPHG	CHAQYMGNMG	SIASLVMAVI	INDNEEDSHG
360	370	380	390	400
SVQRGRKLWG	LVVCHHTSPR	TVPFPLRSAC	GFLMQVFGLQ	LNMEVELAAQ
410	420	430	440	450
LREKHILRTQ	TLLCDMLLRD	APIGIVSQIP	NIMDLVKCDG	AALYYGKRFW
460	470	480	490	500
LLGTTPTESQ	IKDIAEWLLE	YHKDSTGLST	DSLADANYPA	AHLLGDAVCG
510	520	530	540	550
MAAAKITAKD	FLWFRSHTA	KEIKWGGAKH	DPGEKDDGRK	MHPRSSFCAF
560	570	580	590	600
LEVVKRRSLP	WEDVEMDAIH	SLQLILRGSF	QDIDDSDTKT	MIHARLNDLK
610	620	630	640	650
LHDMDELSVV	ANEMVRLIET	ATAPILAVDS	NGMINGWNAK	IAQVTGLPVS
660	670	680	690	700
EAMGRSLVKD	LVTDESVAV	ERLLYLALRG	EEEQNVEIKL	KTFGTQTEKG
710	720	730	740	750
VVILIVNACS	SRDVSENVVG	VCFVGGQDVTG	QKMFMDK FTR	IQQDYKTIVQ
760	770	780	790	800
NPHPLIPPIF	GADEFGYCFE	WNPAMEGLTG	WKKDEVVGKL	LVGEIFGMQM
810	820	830	840	850
MCCRMKSQDA	MTKFMIALNT	AMDGGSTDKF	TFSFFDREGK	YVDVLLSTNK
860	870	880	890	900
RTNADGVITG	VFCFLQIASS	ELQQALKVQR	ATEKVAVAKL	KELAYIRQEI
910	920	930	940	950
KNPLCGITFT	RQLEEDTDL	DDQQQFLDTS	AVCEQQLQKV	LNDMDLESIE
960	970	980	990	1000
DGYLELDTAE	FEMGTVMNAV	ISQGMTTSRE	KGLQIFRETP	REINTMRLLG
1010	1020	1030	1040	1050
DQIRLQQVLS	DFLLNTRVFT	PSPEGVVKIK	VVPTRKRLGG	SVHVVHLEFR
1060	1070	1080	1090	1100
VSHPGAGLPE	ELVLEMYDRG	KG MTQEGLGL	NMCRKLVRLM	NGDVHYVREA
1110				1120
MQCYFVNVE	LPMAQRDDAS	SQM		

Proteína GIGANTEA, mancha 7810 – 5.52% de cobertura (Transformada pCAMsrDXS).

AIASLQVEASDLANFLTMDR

TMIHSLFVESCASMDLASR

ATDGMLVDGEACTLPQLELLEVTAR

10	20	30	40	50
MSASNEKWID	GLQFSSSLFWP	PPQDSQQKQA	QILAYVEYFG	QFTADSEQFP
60	70	80	90	100
EDIAQLIQSC	YPSKEKRLVD	EVLATFVLHH	PEHGHAVVHP	ILSRIIDGTL
110	120	130	140	150
SYDRNGFPFM	SFISLFSHTS	EKEYSEQWAL	ACGEILRVLT	HYNRPFIKVD
160	170	180	190	200
HQHSEAECS	TSDQASSCES	MEKRANGSPR	NEPDRKPLRP	LSPWITDILL
210	220	230	240	250
AAPLGIRSDY	FRWCGGVMGK	YAAGGELKPP	TTAYSRGSGK	HPQLMPSTPR
260	270	280	290	300
WAVANGAGVI	LSVCDEEVAR	YETANLTAAA	VPALLPPPT	TPLDEHLVAG
310	320	330	340	350
LPPLEPYARL	FHRYYAIATP	SATQRLLFGL	LEAPPSWAPD	ALDAAVQLVE
360	370	380	390	400
LLRAAEDYDS	GMRLPKNWMH	LHFLRAIGTA	MSMRAGIAAD	TSAALLFRIL
410	420	430	440	450
SQPTLLFPPL	RHAEGVELHH	EPLGGYVSSY	KRQLEVPASE	ATIDATAQGI
460	470	480	490	500
ASMLCAHGPD	VEWRICTIWE	AAYGLLPLSS	SAVDLPEIVV	AAPLQPPTLS
510	520	530	540	550
WSLYLPLLKV	FEYLPRGSPS	EACLMRIFVA	TVEAILRRTF	PSETSEQSRK
560	570	580	590	600
PRSQSKNLAV	AELR TMIHSL	FVESCASMDL	ASRLLFVVLT	VCVSHQALPG
610	620	630	640	650
GSKRPTGSDN	HSSEEVNTDS	RLTNGRNRCK	KRQGPVATFD	SYVLAAVCAL
660	670	680	690	700
SCELQLFPFI	SKNGNHSNLK	DSIKIVIPGK	TTGISNELHN	SISSAILHTR
710	720	730	740	750
RILGILEALF	SLKPSSVGTS	WSYSSNEIVA	AAMVAHVSE	LFRRSRPCLN
760	770	780	790	800
ALSALKQCKW	DAEISTRASS	LYHLIDLHGK	TVTSIVNKAE	PLEAHLTLTP
810	820	830	840	850
VKKDEPIIEE	KNINSSDGA	LEKGDASRSH	RKNGFARPLL	KCAEDVILNG
860	870	880	890	900
DVASTSGKAI	ASLQVEASDL	ANFLTMDRNG	GYRGSQTLLR	SVLSEKQELC
910	920	930	940	950
FSVVSLLWQK	LIASPEMQMS	AESTSAHQGW	RKVVDALCDI	VSASPTKASA
960	970	980	990	1000
AIVLQAEKDL	QPWIARDDEQ	GQKMWRVNRQ	IVKLIAELMR	NHDSPEALVI
1010	1020	1030	1040	1050
LASASDLLLR	ATDGMLVDGE	ACTLPQLELL	EVTAR AVHLI	VEWGDSGVSV
1060	1070	1080	1090	1100
ADGLSNLLKC	RLSTTIRCLS	HPSAHVRALS	MSVLRDILNS	GQINSSKLIQ
1110	1120	1130	1140	1150
GEHRNGIQSP	TYQCLAASII	NWQADVERCI	EWEAHSRRAT	GLTLAFLTAA
1160				
AKELGCPLTC				

Probable proteína quinasa serina/treonina IREH1, mancha 7810 – 5.09% de cobertura (Transformada pCAMsrDXS).

VLHSIEK

EDAVRSVPPLAPPENYAIK

KPPPPEVKEGPAFVSPIMASSLGLNR

10	20	30	40	50
MVFNKLFES	SKKSGSSSPD	SSNSPRSVGS	NSPIRSDKKK	SKSASKDEPP
60	70	80	90	100
IPIPGFVGVG	CKQTQIKDGL	KKKDGSSKGG	QLSSEVQAHS	IGKSNLSPSS
110	120	130	140	150
EVK KPPPPEV	KEGPAFVSP	MASSLGLNR	KTRSGPLPQE	RVFNRYRNDPA
160	170	180	190	200
TSNLSKMGAD	GGDLGSGSAT	SGSGSGNRKK	EAGSSKLGLE	ENMDRTRPSD
210	220	230	240	250
NKSDRDSLSP	DTGPPRSLSP	TLPPSGSRLQ	NVASSSGTGR	SEMSSGRSGP
260	270	280	290	300
LRNSDFCTPE	NSYEWENPKE	SESPRYQALL	RMTSAPRKRF	PGDIKSFSHE
310	320	330	340	350
LNSKGVRRFP	LWKPRRSNNV	EEVLNLIRAK	FEKAKEEVNS	DLAVFAADLV
360	370	380	390	400
GVLEKNAESH	PEWEETFEDL	LILARSCAMT	TPGDFWLQCE	GIVQDLDDRR
410	420	430	440	450
QELPPGVLKQ	LHTRMLFILT	RCTRLLQFHK	ESWGEEEQVV	QLRQSR VLHS
460	470	480	490	500
IEK IPPSGAG	RSYSAAKVPS	TKKAYSQEQH	GLDWK EDAVV	RSVPPLAPPE
510	520	530	540	550
NYAIK ESESP	ANIDRMSSWK	KLPSALKTV	KEAPASEEQN	DSKVEPPNIV
560	570	580	590	600
GSRQGRDDAA	VAILNFPPAK	DSHEHSSKHR	HNISWGYWGE	QPLISEESSI
610	620	630	640	650
MCRICEEEVP	TTHVEDHSRV	CTLADKYDQK	GLSVDERLMA	VAGTLDKIAE
660	670	680	690	700
TFRHKDSLAA	AESPDGMKVS	NSHLTEESDV	LSPRLSDWSR	KGSEMDLDCF
710	720	730	740	750
PEADNSIFMD	DLRGLPLMSC	RTRFRGPKSDQ	GMTTSSASSM	TPRSPIPTPR
760	770	780	790	800
PDPIEQILGG	KGTFHDQDDI	PQMSELADIA	KCAADAIPGD	DQSIPFLLSC
810	820	830	840	850
LEDLRVVIDR	RKFDALTVET	FGTRIEKLIR	EKYVHMCELM	DDEKVDLLST
860	870	880	890	900
VIDEDAPLED	DVVRSLRTSP	VHPRDRTSID	DFEIKPISR	GAFGRVFLAK
910	920	930	940	950
KRTTGDLFAI	KVLKKADMIR	KNAVESILAE	RDILINVRNP	FVVRFFYSFT
960	970	980	990	1000
CRDNLVYVME	YLNGGDLYSL	LRNLGCLEED	IVRVYIAEVV	LALEYLHSEG
1010	1020	1030	1040	1050
VVHRDLKPDN	LLIAHDGHIK	LTDFGLSKVG	LINSTDDLGA	PAVSGTSLLD
1060	1070	1080	1090	1100
EEESRLAASE	EQLERRKKRS	AVGTPDY LAP	EILLGTGHGA	TADWWSVGII
1110	1120	1130	1140	1150
LFELIVGIPP	FNAEHPQQIF	DNILNRKIPW	PHVPEEMSAE	AHDIIDRFLT
1160	1170	1180	1190	1200
EDPHQRLGAR	GAAEVKQHIF	FKDINWDTLA	RQKAAPVPAS	ESAITDSYFR
1210	1220	1230	1240	1250
SRYSWNTSDE	QFFPSGEVPD	YSDADSMNTS	SGCSSNHHEE	GEAECEGHA
1260	1270		1280	1290
EFESGIPVDY	SFSNFSFKNL	SQLASINYDL	LSKGWKDEPQ	QIPHHK

Proteína 5 relacionada con actina, mancha 5119 – 14.21% de cobertura (Transformada pCAMsrDXS).

AGQRLR

QLLSLKYPYHSASITWEK

YPLVSPDETLTPEQLKEK

KEHCYVALDYMSELQIFK

EHCYVALDYMSELQIFKNNK

10	20	30	40	50
MSELLFETYG	VPSIGNDTYL	FVPLLSIVHG	SFEVRIVDAK	DVSSYFLKGE
60	70	80	90	100
PVLGACCRTN	VGGFHITDFL	RQLLSLKYPY	HSASITWEKA	EELK KEHCYV
110	120	130	140	150
ALDYMSELQI	FKNNK EEAEE	KTRYWQLPWV	PPPVEEPPSE	EELARKAALK
160	170	180	190	200
EK AGQRLR DM	AAAKRSQKIA	ELEKQLSYLE	ELMEQLDGAE	EEEATAILGR
210	220	230	240	250
SGYLSQQEIK	SAILKATQSL	RKAKGESNGN	EEKADASGVD	KYPLVSPDE
260	270	280	290	300
TLTPEQLKEK	KKQILLKTTT	EGRMRAKQRR	AEEEEALREKQ	EEERRLENPE
310	320	330	340	350
LYLEELRARY	SELSDRVDQR	KRQKLNKGKT	NGNHNSGGV	GRGERLNAAQ
360	370	380	390	400
KERMRLTSA	AFDRGKGEDT	FGTRDEDWLV	YKKMSKDND	DDDGNDDES
410	420	430	440	450
ELARIASKIQ	DMDPTFVNKA	EAVQQTPEPP	KVRTLTAEDY	RISIGIERFR
460	470	480	490	500
CPEILFQPGM	IGIDQAGIDE	MVSISLRRLM	EDEAVKERLC	QSILVTGGCS
510	520	530	540	550
LIPGMIPRLE	SGIRQFRPYL	SPLKLVRAAD	PLIDAWRGAA	AFAASSKFGR
560				570
HTFSLADYRE	HGENLFHRYN	IVYSL		

Factor despolimerizante de actina 10, mancha 5110 – 19.87% de cobertura (Transformada pCAMsrDXS).

SAFWELKR

EILGFTVMGGGGSPAWIEVPEK

10	20	30	40	50
MEILGFTVMG	GGGSPAWIEV	PEKSKSAFWE	LKR RKVHRYV	IFKIDDRREE
60	70	80	90	100
IVVEKTGAPG	ESYDDFTASL	PADDCRYAVY	DLDFVSDDNC	RKSKIFFISW
110	120	130	140	150
SPSVSRIRAK	TIYAVSRNQF	RHELDGVHFE	IQATDPDDMD	LEVLRGRANR

T