

**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
CAMPUS TUXTEPEC**

---

---

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**“Efecto de la sobreexpresión de 1-  
desoxixilulosa-5-fosfato sintasa modificada  
en raíces transformadas de *Stevia  
rebaudiana* sobre la producción de  
glucósidos de esteviol”**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

Adriana Jiménez Brigada

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Edgar García López

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca 2018.**

---

**Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Edgar García López en los laboratorios de Cultivo de Células Vegetales y Biología Molecular de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec.**

## **Dedicatoria:**

### *En especial a mi abuelita:*

Leonarda Zarate María (+) por preocuparse siempre por mí, enseñarme que en esta vida con esfuerzo y dedicación se logra todo lo que diseñes. Por haber formado parte de la pieza clave en mi formación académica, por su amor desmedido y cariño incondicional, así como sus apreciados consejos que llevaré por el resto de mi vida y transmitiré a mis hijos y nietos. Gracias abuelita hermosa, por todo lo que me diste e hiciste de mí una gran mujer, lamento que no estés conmigo actualmente, pero siempre te llevare en el corazón.

### *A mi Esposo Braulio:*

Amor este logro es de los dos, a pesar de los obstáculos que se nos han presentado y nunca has soltado mi mano, gracias por tu apoyo incondicional y por siempre motivarme, por estar conmigo en los desvelos y escuchar mis infinitas hipótesis con respecto a mi tesis y futuras aplicaciones, gracias por darme la oportunidad de seguir con mis sueños, te Amo mi vida.

### *A mis padres:*

Regino Jiménez Zarate, Lucina Brigada Martínez. Por su amor y apoyo incondicional, sobre todo por darme una formación de respeto y trabajo.

### *A mis Hermanos:*

Leonardo, José Alfredo y Regino por todo su apoyo y cariño.

### *A mis Hijos:*

Vania Odeth, hija eres una niña aún, pero muy madura por entender mi dedicación y amor hacia la investigación científica y a ti mi bebé David un motivo más para esforzarme día con día. *Y sobre todo a...* **DIOS.**

## **Agradecimientos:**

Al doctor Edgar García López, por la oportunidad que me proporcionó para trabajar en su grupo de investigación, involucrándome en este campo tan interesante de la Biotecnología, gracias por su paciencia, tiempo y dedicación para la realización de esta tesis.

A mi comité tutorial:

**Dr. Julián Mario Peña Castro**

**Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia**

**Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa**

Por su valiosa participación crítica durante el desarrollo de este trabajo mediante los exámenes tutoriales.

Así mismo a la Dra. Jacqueline Capataz Tafur por proporcionar amablemente algunos equipos y reactivos para el desarrollo del trabajo experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de Posgrado otorgada durante el periodo octubre 2014-septiembre 2016, número de becario 571433 y al “Programa de Fortalecimiento Académico Para Indígenas Apoyos Complementarios Para Mujeres Indígenas Becarias CONACYT 2015-1 y CONACYT 2015-2”.

## Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1 El modelo vegetal: <i>Stevia rebaudiana</i> .....	3
1.2 Síntesis de GE en <i>Stevia rebaudiana</i> .....	4
1.2.1 Precursores isoprenoides .....	4
1.2.2 La vía mevalónica .....	5
1.2.3 La vía MEP.....	6
1.2.4 La 1- desoxixilulosa-5-fosfato sintasa primera enzima de la vía MEP .....	9
1.3 La biosíntesis de los GE.....	10
1.3.1 La regulación de la ruta de la biosíntesis .....	11
1.4 Propiedades biológicas y comerciales de los GE .....	11
1.4.1 Los GE como edulcorantes.....	12
1.4.2 Glucósidos de esteviol antidiabético.....	12
1.5 La biotecnología vegetal y sus aplicaciones .....	13
1.5.1 Cultivo de células y tejidos vegetales.....	13
1.5.2 Transformación genética de plantas .....	14
2. Justificación .....	17
3. Hipótesis .....	17
4. Objetivos.....	17
5. Estrategia experimental .....	18
6. Materiales y métodos.....	19
6.1 Material vegetal.....	19
6.1.2 Medio de cultivo para células vegetales .....	19
6.1.3 Stock de Vitaminas 100X .....	20
6.2 Material bacteriano .....	20
6.2.1 Medio de cultivo para <i>Agrobacterium rhizogenes</i> y <i>E. coli</i> .....	20
6.3 Obtención células electrocompetentes.....	21
6.4 Diseño <i>in silico</i> y síntesis DXS modificada .....	21

6.5	Electroporación de <i>E. coli</i> y <i>A. rhizogenes</i> .....	24
6.6	Extracción de ADN plasmídico.....	24
6.6.1	Patrones de digestión del ADN plasmídico .....	26
6.7	Agrotransformación .....	27
6.7.1	Extracción de DNA genómico de raíces putativas.....	27
6.7.2.	Verificación de la transformación en raíces vía PCR .....	28
6.8	Análisis electroforéticos .....	30
6.9	Tinción histoquímica de $\beta$ -glucuronidasa.....	31
6.10	Extracción de glucósidos de esteviol de raíces.....	31
6.11	Cromatografía en capa fina (TLC) y análisis de intensidad de imagen.....	31
6.12	Análisis estadísticos.....	32
7.	Resultados y discusión.....	32
7.1	Diseño <i>in silico</i> de secuencia srsDXS y construcción del vector pCAMsrDXS.....	32
7.1.1	Análisis de la secuencia endógena de DXS y optimización de uso codónico.....	32
7.1.2	Construcción del vector pCAMsrDXS.....	37
7.2	Electroporación de <i>E. coli</i> y <i>A. rhizogenes</i> .....	37
7.2.1	Inserción del vector pCAMBIA 1105.1 en <i>E. coli</i> y <i>A. rhizogenes</i> .....	37
7.2.2	Inserción del vector pCAMsrDXS en <i>E. coli</i> y <i>A. rhizogenes</i> .....	39
7.3	Agrotransformación de plántulas de <i>Stevia rebaudiana</i> con cepas silvestres.....	42
7.3.1	Verificación de la transformación de los cultivos de raíces inducidos con cepas silvestres de <i>A. rhizogenes</i> .....	46
7.4	Infección de plántulas con la cepa K599 albergando el vector pCAMBIA 1105.1 y el vector pCAMsrDXS.....	47
7.4.1	Análisis de la expresión del gen reportero GUSPlus en raíces inducidas con K599.1 y K599DXS.....	51
7.4.2	Verificación de la transformación de las raíces inducidas con las cepas K599.1 y K599DXS por PCR .....	54
7.5	Producción de GE en los diferentes cultivos de raíces por TLC.....	55
8.	Conclusiones .....	61
9.	Sugerencias y perspectivas.....	62
10.	Bibliografía.....	63
	Anexos .....	68
	Anexo 1 .....	68
	Comprobación de liberación del inserto srDXS del vector de clonación comercial pUC57.....	68

Anexo 2 .....	69
Anexo 3 .....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Stevia rebaudiana</i> .....	3
Figura 2. Cultivo de <i>Stevia rebaudiana</i> en México.....	4
Figura 3. Vía Mevalonica.....	6
Figura 4. Vía MEP.....	7
Figura 5. Representación de la biosíntesis de isoprenoides.....	8
Figura 6. Proceso de agrotransformación.....	15
Figura 7. Cassette de expresión diseñado para srsDXS.....	22
Figura 8. Disposición de las secuencias en el T-ADN del vector pC1105.1 .....	23
Figura 9. Diagrama del vector pCAMBIA 1105.1.....	23
Figura 10. Alineamiento de las secuencias nucleotídica de DXS original con la secuencia de tercera iteración de optimización.....	34
Figura 11. Alineamiento de las secuencias de proteínas de DXS original con la secuencia Optimizada y traducida <i>in silico</i> .....	35
Figura 12. Alineamiento aminoacídico de DXS modificada de <i>Stevia rebaudiana</i> y DXS <i>Vitis vinifera</i> .....	36
Figura 13. Diagrama del vector pCAMsrDXS.....	37
Figura 14. Productos de digestión del plásmido pCAMBIA 1105.1 con la enzima de restricción EcoRI.....	38
Figura 15. Sitios de corte de las enzimas XbaI y SpeI en el vector pCAMsrDXS.....	39
Figura 16. Producto de Doble Digestión del Plásmido pCAMsrDXS con las enzimas de restricción XbaI Y SpeI en <i>E. coli</i> .....	40
Figura 17. Sitios de corte de la enzima PstI en el vector pCAMsrDXS .....	41
Figura 18. Productos de digestión del plásmido pCAMsrDXS con la enzima de restricción PstI provenientes de cepas de <i>A. rhizogenes</i> .....	42

Figura 19. Raíces emergidas a los 7 días posterior a la infección.....	43
Figura 20. Raíces putativas obtenidas por infección con cepas silvestres <i>A. rhizogenes</i> .....	44
Figura 21. Raíces en plántulas e hipocotilos a los 30 días posterior a la infección.....	41
Figura 22. Resultado de amplificación de los genes <i>rolB</i> y <i>D</i> por PCR sobre ADNg.....	47
Figura 23. Raíces putativas inducidas con la cepa K599.1 .....	48
Figura 24. Líneas de raíces inducidas con la cepa K599DXS .....	49
Figura 25. Regeneración de plántula a partir de raíces putativas inducidas con la cepa K599DXS..	50
Figura 26. Actividad enzimática de $\beta$ -glucuronidasa.....	51
Figura 27. Análisis de expresión de $\beta$ -glucuronidasa para confirmar la transformación con la cepa K599.1.....	52
Figura 28. Análisis de expresión de $\beta$ -glucuronidasa para confirmar la transformación con la cepa K599DXS .....	53
Figura 29. Análisis de expresión de $\beta$ -glucuronidasa sobre explantes de hoja de la línea de plántulas regeneradas de raíces transformadas de m1 srDXS .....	53
Figura 30. Amplificación del fragmento 35S en ADNg de raíces inducidas por la cepa K599.1.....	54
Figura 31. Amplificación del fragmento srDXS en ADNg de raíces inducidas por la cepa K599DXS .....	55
Figura 32. Cromatografía en capa fina de los diferentes extractos de GE.....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de isoprenoides.....	5
Tabla 2 Medio de cultivo MS.....	19
Tabla 3 Stock de vitaminas 100X.....	20
Tabla 4 Medio de cultivo LB.....	20
Tabla 5 Solución I Glucosa/Tris/EDTA (GTE).....	25
Tabla 6 Solución II NaOH/SDS.....	26
Tabla 7 Solución III de Acetato de potasio 5M.....	26
Tabla 8 Descripción de cebadores para las diferentes raíces putativas.....	29
Tabla 9 Componentes de PCR.....	29
Tabla 10 Buffer TAE 10X .....	30
Tabla 11 Buffer carga 6X .....	30
Tabla 12 Bromuro de etidio 20X (10 mg/ml).....	30
Tabla 13 Preparación de Agarosa.....	30
Tabla 14 valores de CAI	
Tabla 14 Valores de CAI y %GC de la secuencia tras las iteraciones de optimización.....	33
Tabla 15. Análisis de varianza del efecto del tipo de cepa y tipo de explante sobre la inducción de raíces usando cepas silvestres.....	45
Tabla 16 Producción de esteviósido y rebaudiósido A en los diferentes extractos de raíces de la figura 31 después de 30 días.....	57
Tabla 17. Productividad de esteviósido y rebaudiósido A en los diferentes extractos de raíces de la figura 31.....	58

## ABREVIATURAS

**AMV:** Ácido mevalónico  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**CoA:** Acetil coenzima A  
**DMAPP:** Dimetilalil pirofosfato  
**DXP:** 1-deoxi-d-xilulosa-5-fosfato  
**Dulc A:** Dulcósido A  
**Est:** Esteviósido  
**FPP:** Farnesil pirofosfato  
**GE:** Glucósidos de esteviol  
**GPP:** Geranil pirofosfato  
**GGPP:** Geranil geranil pirofosfato  
**IPP:** Isopentenil pirofosfato  
**KAH:** Ácido kaurenoico 13-hidroxilasa  
**KS:** Kaureno sintetasa  
**LB:** Luria Bertani  
**MS:** Murashige y Skoog  
**MEP:** 2-C-metil-D-eritritol 4- fosfato  
**PCR:** Reacción de cadena de la polimerasa  
**Ri:** Inductor de raíz  
**Reb A:** Rebaudiósido A  
**Reb B:** Rebaudiósido B  
**T-ADN:** ADN de transferencia  
**TLC:** Cromatografía de capa fina  
**UGT:** Uridina difosfato glicosiltransferasa



## RESUMEN

*Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta dicotiledónea que destaca por producir glucósidos de esteviol (GE) los cuales son edulcorantes no calóricos y son hasta 300 veces más dulces que la sacarosa y no elevan la glucosa en sangre. Algunas de las estrategias utilizadas para mejorar la producción de este tipo de metabolitos son la ingeniería metabólica y las técnicas de biotecnología vegetal. En el campo de la ingeniería metabólica, el diseño *in silico* de genes permite modificar racionalmente sistemas biológicos silvestres ya existentes a través de la elección de promotores, terminadores, secuencias potenciadoras y péptidos señal, además de realizar modificaciones como la optimización de uso codónico. Para la movilización de estas construcciones se hace uso de la agrotransformación que genera raíces transformadas al cocultivar explantes con cepas de *Agrobacterium rhizogenes*. Existen pocos estudios de agrotransformación de *Stevia rebaudiana*, y ninguno de ellos ha evaluado la expresión heteróloga de genes modificados y su efecto sobre la producción de GE. Así, en este trabajo se modificó una secuencia codificante para la enzima 1-desoxy-d-xylulose-5-fosfato sintasa (DXS) al optimizar su uso codónico e introducir la mutación K281N fuera del sitio activo y que se ha reportado aumenta la eficiencia catalítica en *Vitis vinifera*. Esta enzima cataliza el primer paso de la ruta de biosíntesis de GE en plastidios. La movilización de esta secuencia hacia el genoma de *S. rebaudiana* se realizó por agrotransformación y permitió establecer cinco diferentes tipos de cultivos, cuya transformación se confirmó por PCR y expresión del gen reportero GUSPlus. Después de comparar la producción y productividad de GE, se encontró que las líneas transformadas M5R4 y M1sDXS acumularon la mayor cantidad de esteviósido ( $108.63 \pm 13.03$  y  $93.07 \pm 11.16$  mg/gPF respectivamente), mientras que para rebaudiósido A las líneas M5R4 y M7sDXS tuvieron la mayor producción ( $549.71 \pm 60.46$  y  $716.53 \pm 78.81$  mg/gFW respectivamente). Los resultados indican que la sobreexpresión de srDXS tuvo efectos positivos en la producción y productividad de GE, comparado con las raíces no transformadas. Por otro lado, la similitud estadística de estos parámetros (Tukey  $p < 0.05$ ) con los de la línea M5R4 sugiere que la producción puede estar afectándose por el evento de transformación y la posición de la inserción del T-DNA en el genoma de *S. rebaudiana*.

## ABSTRACT

*Stevia rebaudiana* Bertoni is a dicotyledon plant noted for producing steviol glycosides (SG) which are natural sweeteners that do not provide calories to the consumer; they are also up to 300 times sweeter than sucrose and are beneficial to health due to not raising blood glucose levels. Some of the strategies used to improve the production of this type of metabolites are metabolic engineering and plant biotechnology techniques. In the field of metabolic engineering, *in silico* gene design allows to modify existing wild biological systems through the rational election of promoters, terminators, enhancing sequences and signal peptides, in addition to modifications such as the codon usage optimization. For the mobilization of these genetic constructions it is often used the agrotransformation process that generates hairy roots through the co-culture of plant explants with *Agrobacterium rhizogenes* strains. So far, there are few agrotransformation studies of regarding *Stevia rebaudiana*, and none of them, have evaluated the heterologous expression of modified genes and their effect on the SG production. Thus, in this work it was modified a sequence coding for the enzyme 1-Deoxy-d-Xylulose-5-Phosphate Synthase (DXS) to optimize its codon usage and introduce the K281N mutation, not in the active site, that have been reported enhances catalytic activity in *Vitis vinifera*. This enzyme catalyzes the first step in the biosynthesis of SG in plastids. The mobilization of this sequence to the genome of *S. rebaudiana* was performed by agrotransformation and allowed to establish five different types of root cultures, whose transformation was confirmed by PCR and reporter gene GUSPlus expression. After comparing the production and productivity of SG, it was found that transformed lines M5R4 and M1sDXS accumulated the largest amount of stevioside ( $108.63 \pm 13.03$  and  $93.07 \pm 11.16$  mg/gFW respectively), while for rebaudioside A lines M5R4 and M7sDXS had the largest production ( $549.71 \pm 716.53$  and  $60.46 \pm 78.81$  mg/gFW respectively). The results indicate that over-expression of srDXS had positive effects on the production and productivity of SG, in comparison to non-transformed roots. On the other hand, the statistical similarity (Tuckey  $p < 0.05$ ) of these parameters with those from M5R4 line suggest that production may be also affected by the event of transformation and the T-DNA position in the genome of *S. rebaudiana*

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 El modelo vegetal: *Stevia rebaudiana*

*Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta originaria de Paraguay (Fig. 1) que ha sido utilizada y estudiada extensivamente por su capacidad de producir metabolitos secundarios, llamados glucósidos de esteviol (GE), que son compuestos ampliamente conocidos por ser potentes edulcorantes (Jarma 2008).

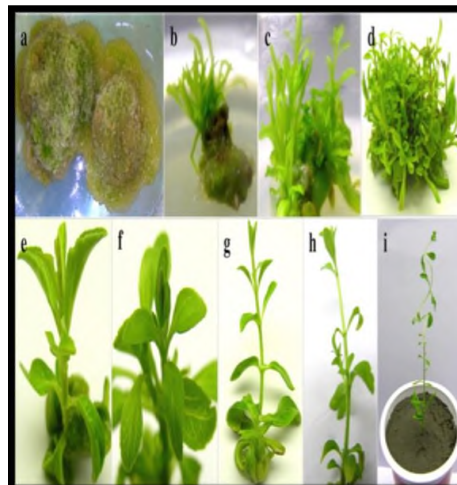
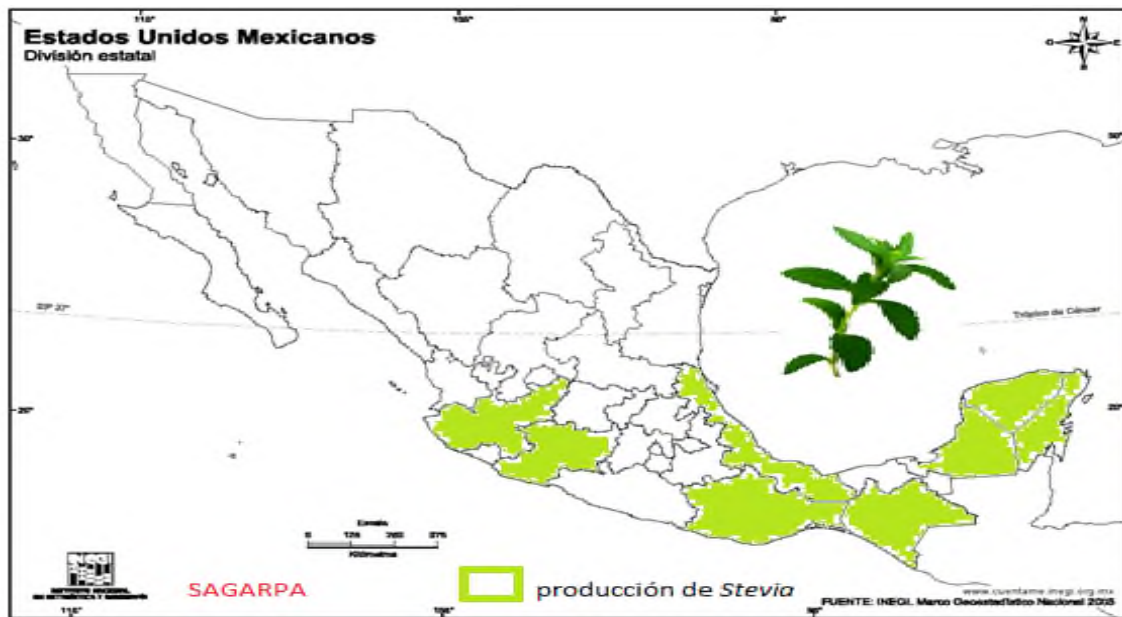


Figura 1. *Stevia rebaudiana*

Actualmente, en México el Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) trabajando conjuntamente con la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, pesca y Alimentación (SAGARPA) han realizado investigaciones y financiamiento para la transferencia de tecnología en el sur-sureste, con el objetivo de potenciar la producción de *Stevia rebaudiana* y dar una oportunidad al campo así como a los agricultores de forma económica (Sagarpa 2016).

En el 2011 se implementó el cultivo en Quintana Roo, posteriormente en el 2017 se estimó que existe 250 mil hectáreas cultivadas de *Stevia rebaudiana*, en los estados de Quintana Roo, Veracruz, Oaxaca, Yucatán, Chiapas, Campeche, Puebla, Michoacán y Jalisco (Fig. 2). Con respecto a la producción por cada hectárea se obtiene de 4 a 8 toneladas por año, donde interviene y depende mucho el clima y manejo de cultivo. Sin embargo, por cultivo tradicional de

acuerdo a estudios la producción de glucósidos de esteviol es variable en la planta, debido a que durante la floración estos compuestos disminuyen hasta un 50%, de ahí la búsqueda de alternativas como el uso de enfoques biotecnológicos, por mencionar el cultivo de tejidos para la propagación intensiva de genotipos, la comprensión del mecanismo y la vía de la biosíntesis de los glucósidos de esteviol mediante la regulación positiva de los genes, por ende mejorar el rendimiento y obtención de estos metabolitos secundarios (Yadav *et al.*, 2011).



**Figura. 2 Cultivo de *Stevia rebaudiana* en México.** Los estados que resaltan son actualmente productores de esta planta que tiene gran importancia a nivel mundial (SAGARPA 2016).

## 1.2 Síntesis de GE en *Stevia rebaudiana*

### 1.2.1 Precursores isoprenoides

Los isoprenoides son compuestos que proceden de la polimerización del isopreno, un hidrocarburo formado por 5 átomos de carbono, que da origen a los compuestos conocidos como terpenos. En las plantas la biosíntesis de los isoprenoides se deriva principalmente de dos moléculas, el isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP) que participan en el metabolismo primario, secundario y están involucrados en procesos celulares importantes como la fotosíntesis (clorofilas y carotenoides), la respiración (ubiquinonas), la arquitectura

de las membranas (esteroles), la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas (brasinosteroides, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico) (Vránova et al., 2012). El IPP Y DMAPP se sintetizan por dos rutas metabólicas independientes, la ruta del mevalonato o mevalónica (MVA) que se lleva a cabo en el citoplasma y la vía plastídica del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) que está presente en la mayoría de las eubacterias y en organismos fotosintéticos como algas y plantas superiores (Córdoba *et al.*, 2009). Los isoprenoides han sido clasificados de acuerdo al número de unidades básicas que los constituyen, como se muestra en la Tabla 1 (Wallach, 1987) y tienen una amplia gama de aplicaciones en los sectores de salud, nutrición e industria, de ahí la necesidad de obtener y mejorar la producción de metabolitos secundarios o productos naturales.

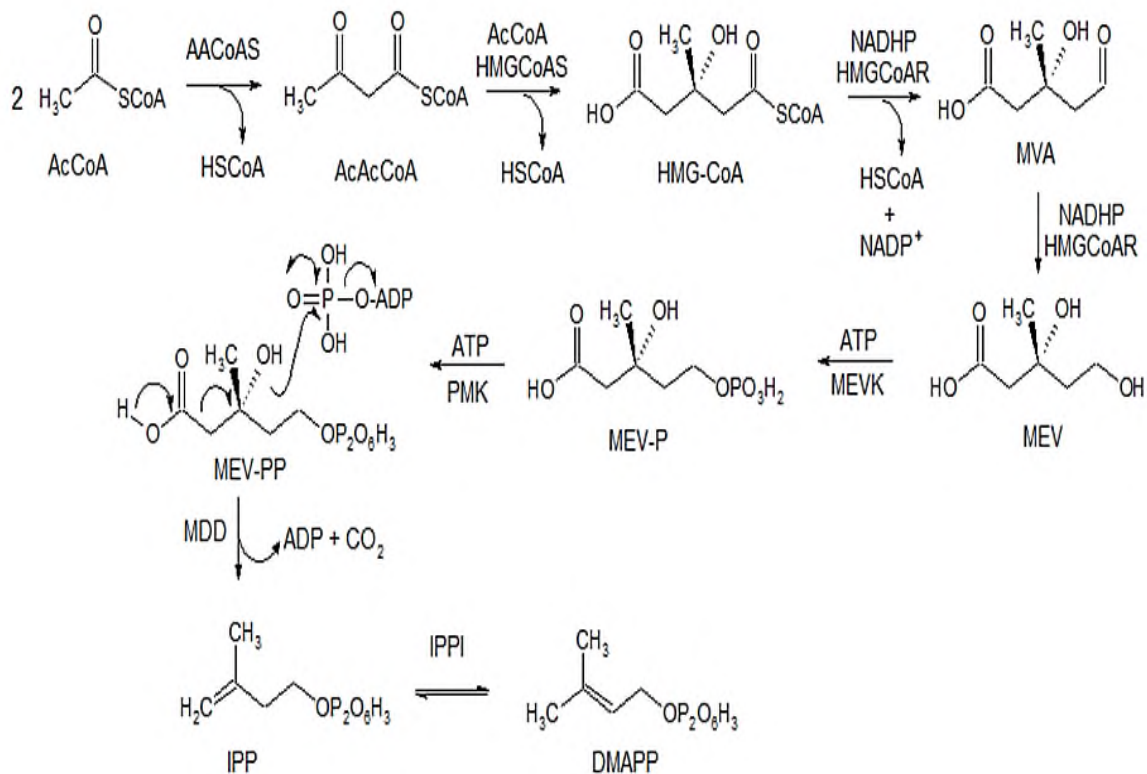
**Tabla 1. Clasificación de isoprenoides**

<b>Nombre</b>	<b>Número de unidades básicas</b>
Hemiterpenos	1 unidad de isopreno (5 C)
Monoterpenos	2 unidades (10 C)
Sesquiterpenos	3 unidades (15 C)
<b>Diterpenos</b>	<b>4 unidades (20 C)</b>
Triterpenos	6 unidades (30 C)
Tetraterpenos	8 unidades (40 C)
Politerpenos	más de 10 unidades isoprenoides

### 1.2.2 La vía mevalónica

La vía del mevalonato es una vía metabólica esencial presente en arqueas, algunas bacterias y eucariotas, inicia a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-coenzima A (CoA) por la acción de tres enzimas que producen el ácido mevalónico, siendo el primer intermediario comprometido de la vía (Fig. 3). Seguidamente, a través de la acción de las enzimas mevalonato quinasa (MVK), fosfo-mevalonato quinasa (PMK) y mevalonato-5-pirofosfato descarboxilasa (PMD), el ácido mevalónico es convertido a isopentenil difosfato y finalmente, la enzima isopentenil difosfato isomerasa (IDI) utiliza este compuesto como sustrato para producir dimetil-alil difosfato (Goldstein y Brown, 1990; Hemmerlin, Harwood,

y Bach 2012). La vía del mevalonato es la responsable de la producción de sesquiterpenos (C15) y triterpenos (C30), como los esteroides (Gershenzon y Croteau, 1993).

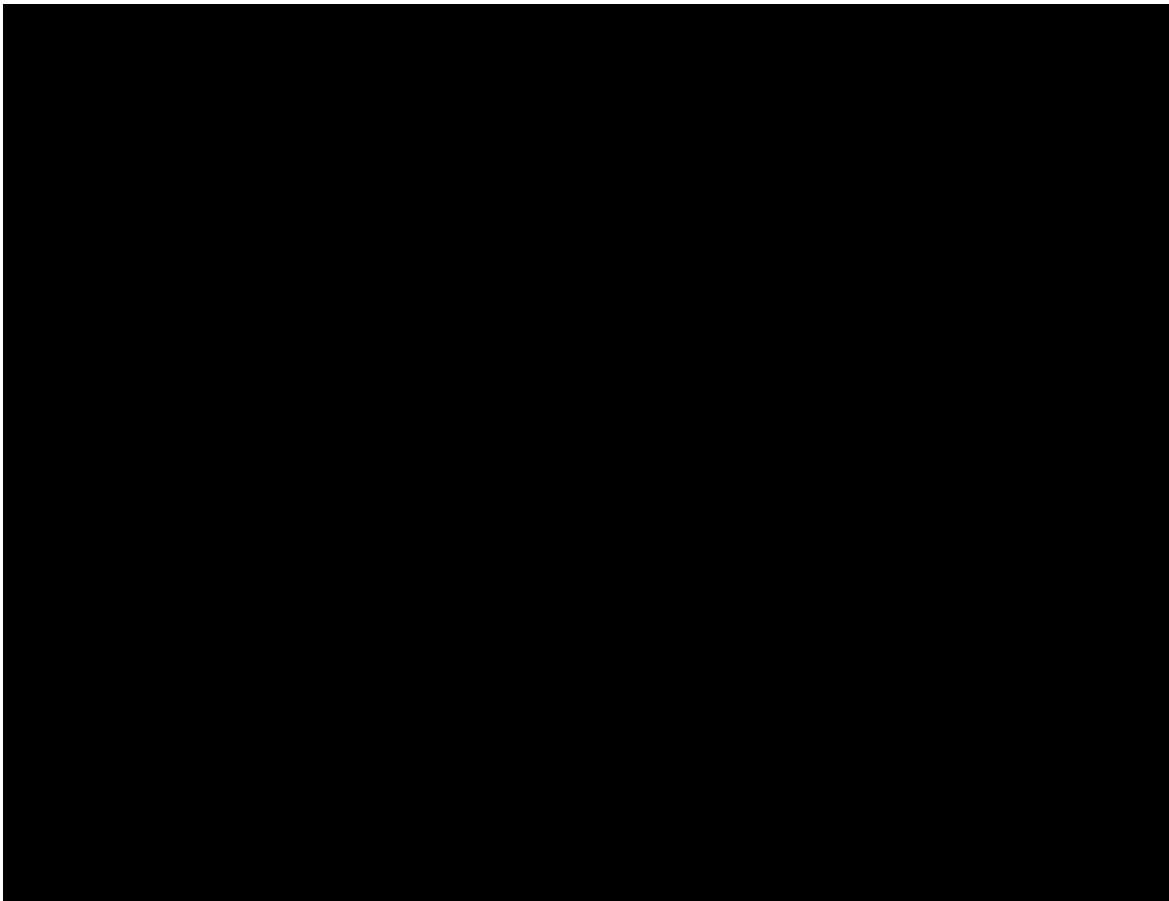


**Figura 3. Vía Mevalonica:** Inicia con acetil-CoA, donde intervienen las siguientes enzimas en cada reacción: acetil-coenzima A tiolasa **AACoAS**, 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa **HMGS**, 3-hydroxy 3 methylglutaril-CoA reductasa **HMGCsAR**, mevalonato cinasa **MEVK**, fosfo mevalonato cinasa **PMK**, difosfo-mevalonato descarboxilasa **MPDC** generando isopentenil difosfato y dimetilalil difosfato, para la síntesis de isoprenoides (Hemmerlin, Harwood, y Bach 2012).

### 1.2.3 La vía MEP

Los genes de la vía MEP inicialmente fueron identificados en *E. coli* y consecutivamente sus ortólogos en *A. thaliana* (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). Esta vía comprende 7 pasos biosintético, en el primer paso de la vía MEP el piruvato y el gliceraldehído 3-fosfato (GA3-P) se condensan a través de la acción de la enzima **1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS)**, produciendo 1-

desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP). En el segundo paso biosintético, el DXP es convertido a 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), por la acción de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reducto isomerasa (DXR), a través de la acción de otras cinco enzimas (Fig. 4) el MEP es convertido a IPP y DMAPP para la síntesis de isoprenoides plastídicos. Esta vía es la responsable de la producción del isopreno, monoterpenos, diterpenos (C20) como las giberelinas y tetraterpenos (C40) como los carotenoides (Fig. 5) (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002; Vranová *et al.*, 2013).



**Figura 4. Vía MEP:** Las enzimas que intervienen en cada reacción: **DXS** (1-desoxixilulosa-5-fosfato sintasa), **DXR** (1-deoxi-D-xilulosa 5 fosfato reductoisomerasa), **CMS** (4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa), **CMK** (4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritrol cinasa), **MCS** (Metil eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa), **HDS** (1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4 difosfato sintasa), **HDR**(1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4 difosfato reductasa), **IDI**(Isopentenil difosfato isomerasa) (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002).

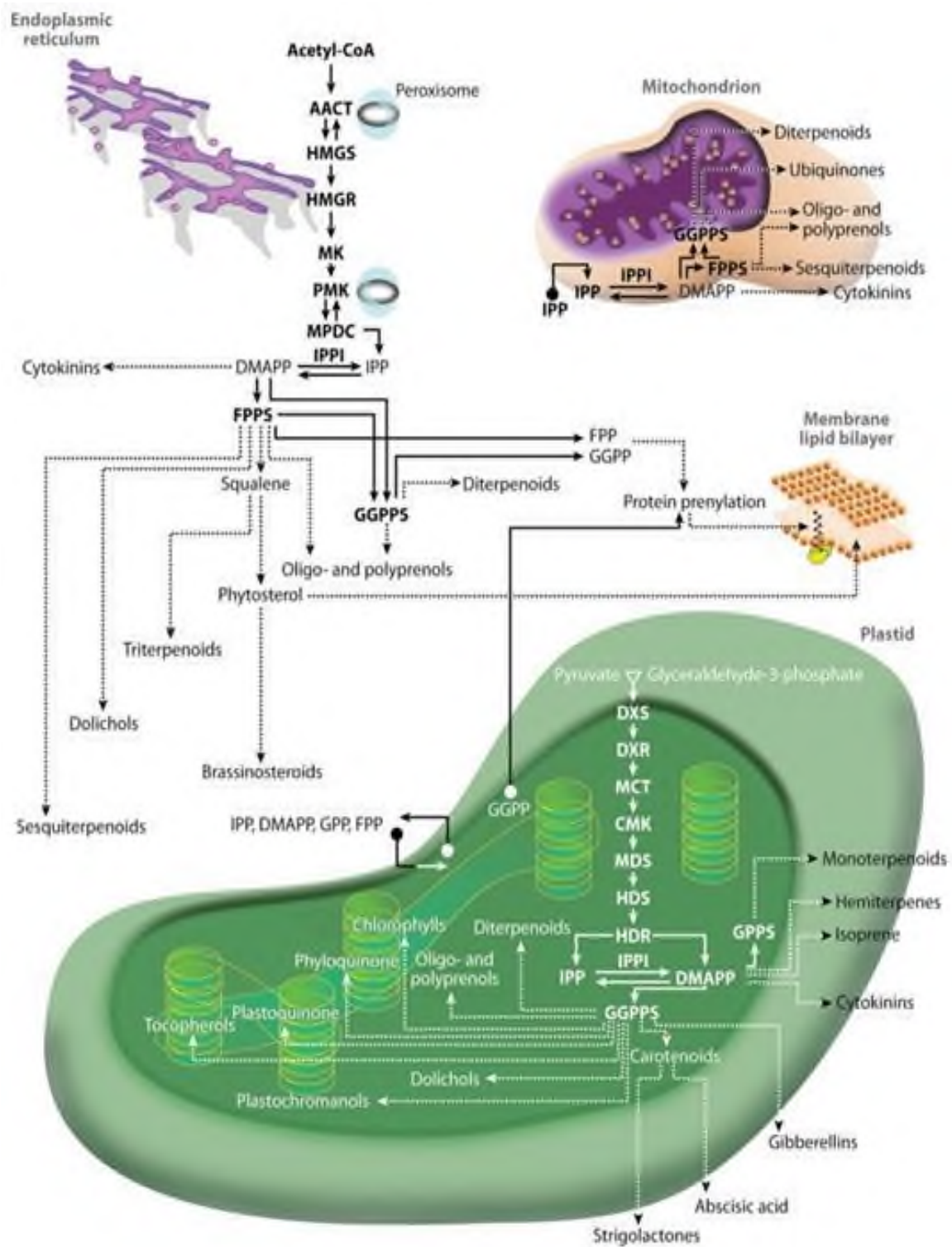


Figura 5. Representación de la biosíntesis de isoprenoides en los dos compartimentos subcelulares (Vranová *et al.*, 2013).

#### 1.2.4 La 1- desoxixilulosa-5-fosfato sintasa primera enzima de la vía MEP

Diversos estudios sugieren que DXS es una enzima crucial de la velocidad en la biosíntesis de isoprenoides, debido al impacto de esta enzima se ha estudiado en bacterias y plantas, principalmente. Sin embargo, el grado de control ejercido por cada enzima depende del organismo y las condiciones de crecimiento (Córdoba *et al.*, 2009).

La comisión de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) clasifica a 1- desoxixilulosa-5-fosfato sintasa (DXS) con el prefijo **EC: 2.2.1.7** donde el primer número corresponde a la clase de enzima, el segundo a la subclase, tercero sub-sub clase y cuarto el número de serie, por lo que se trata de una enzima de tipo transferasa que transfiere un grupo aldehído. La enzima requiere como cofactor al difosfato de tiamina para llevar acabo la actividad enzimática así como también de Mn o Mg, un pH de 7 a 9, una temperatura de 32°C a 45°C y cataliza los dos primeros sustratos de la vía MEP como se muestra en la Figura 4.

En el contexto de la ingeniería y modificaciones realizadas a DXS, por mencionar algunos trabajos, en *Arabidopsis thaliana* se ha mostrado que la sobreexpresión de DXS o la disminución de su actividad se acompaña de cambios correlativos en los niveles de productos terpenoides derivados de la ruta MEP como clorofilas y carotenoides (Estévez *et al.*, 2001). Así mismo, en fruto de tomate transgénico, la sobreexpresión de una enzima DXS bacteriana generó incrementos significativos en la producción de carotenoides (Enfissi *et al.*, 2005).

Quevedo *et al.*, 2010, realizaron la sobreexpresión de DXS en *Morinda citrifolia*, dichas plantas aumentaron los niveles de transcritos (ARNm) y la actividad de DXS en comparación con la línea celular de control.

Particularmente en la modificación de la secuencia, en 2011 Battilana y colaboradores, efectuaron una sustitución aminoacídica de lisina por asparagina en la posición 284 (K284N) para la DXS de *Vitis vinífera*. Esta sustitución influyó en la cinética de la enzima aumentando la eficiencia catalítica e incrementando los niveles de monoterpenos debido a la expresión heteróloga. Cabe resaltar que

actualmente existen secuencias reportadas del gen DXS, sus mRNAs y proteínas asociadas en diferentes organismos, por ejemplo; *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Nicotiana tabacum*, *Zea mays* y *Stevia rebaudiana*.

Aunque la información con respecto a la regulación de la ruta MEP en *Stevia* es escasa puede pensarse con cierta seguridad que DXS juegue un papel predominante en la regulación también en este organismo. Así, tomando como referencia los pasados datos puede fundamentarse el importante papel que tiene DXS en el control de flujo metabólico de los terpenoides y el potencial que tiene la ingeniería dirigida a esta enzima en particular para mejorar rendimientos.

### **1.3 La biosíntesis de los GE**

La síntesis de los GE en *Stevia rebaudiana* ocupa los precursores isoprenoides generados por la vía del MEP (Fig. 4) (Totté *et al.*, 2000). Una vez que se generaron el IPP y DMAPP, la ruta continúa hasta la formación del kaureno, que es el precursor para la formación del esteviol en el retículo endoplásmico (Brandle, 1998), posteriormente en el aparato de golgi las cadenas laterales de glucosa (ADP glucosa) se agregan al grupo hidroxilo del C13 y al grupo carboxilo del C19 del núcleo de esteviol por acción de dos enzimas glucosil transferasas (GTasa I y IIB). La GTasa I, cataliza la transferencia de la glucosa a esteviol y esteviolmonósido, mientras que la enzima GTasa IIB muestra una alta especificidad en la transferencia de las unidades de glucosa al esteviol para formar los principales edulcorantes; esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido C y dulcósido A, los cuales son transportados finalmente a las vacuolas para ser almacenados (Orozco *et al.*, 2010). En el caso particular de *Stevia rebaudiana* estos glucósidos se acumulan hasta 13.8% en hojas secas y de esta proporción se dividen el esteviósido (Est) con un 9.1% y rebaudiósido A (Reb A) con 3.8% seguido del rebaudiósido C (0.6%) y dulcósido A (0.3%) (Goyal *et al.*, 2010).

### **1.3.1 La regulación de la ruta de la biosíntesis**

La información disponible sobre la regulación de la biosíntesis de GE en *Stevia rebaudiana* es escasa, no obstante la regulación de terpenoides ha sido estudiada, principalmente por análisis de niveles de expresión, en otros sistemas vegetales como en Lavanda (*Lavándula latifolia*) (Muñoz *et al.*, 2006) y *Arabidopsis thaliana* (Estévez *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2014). Estos estudios han encontrado que existen pasos limitantes de transformación, principalmente en la formación de los precursores de isoprenoides producidos por la vía MEP (Estévez *et al.*, 2001, Wright *et al.*, 2014). Han sido reportados con mayor impacto en la regulación de la producción de GE y se ubican en las reacciones catalizadas por las enzimas DXS, DXR, MCS y HDR (Estévez *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2011). Aunado a esto, se ha observado que en muchas plantas, incluida *Stevia rebaudiana*, los precursores de isoprenoides son un factor limitante para la síntesis de terpenoides y que son provenientes de la vía MEP (Mahmoud y Croteau, 2002).

En *Arabidopsis thaliana*, utilizando análisis de control metabólico (MCA) se determinó que el coeficiente de control metabólico para la enzima DXS es de 0.82 (Wright *et al.*, 2014), y de acuerdo con el teorema de adición de los flujos del MCA indica claramente que es la enzima que mayor influencia tiene sobre la regulación del flujo metabólico en la ruta MEP.

### **1.4 Propiedades biológicas y comerciales de los GE**

*Stevia rebaudiana* se ha convertido en una planta muy valiosa por producir glucósidos de esteviol que son ampliamente utilizados en medicamentos, bebidas y diversos productos. Estos compuestos han sido de gran interés por sus aplicaciones múltiples y propiedades biológicas, dentro de los cuales los más importantes comercialmente son el esteviósido que es 110-270 veces más dulce que la sacarosa y rebaudiósido A de 150-320 veces más dulce (Jarma 2008). Se ha demostrado que los GE no tienen efectos secundarios al consumirlo, además son antimicrobianos y no tóxicos.

### **1.4.1 Los GE como edulcorantes**

Los glucósidos de esteviol son edulcorantes naturales y con propiedades funcionales superiores a muchos otros edulcorantes artificiales, además que son absorbidos en el tracto gastrointestinal, por lo que son hidrolizados y no aportan calorías, además previene la caries dental (Yong-Heng *et al.*, 2014) siendo una alternativa en la dieta diaria para disminuir la obesidad e hipertensión, considerando que son los principales trastornos por consumo de edulcorantes artificiales o sacarosa.

En el 2011 la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) autorizó a los glucósidos de esteviol como edulcorantes comerciales y se consideran no cancerígenos o asociados con cualquier toxicidad reproductiva y desarrollo, por lo que se han realizado pruebas de toxicidad (*in vitro* e *in vivo* estudios en animales y algunos estudios de tolerancia humanos). Así mismo el Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) estableció una ingesta diaria aceptada (ADI) para los glucósidos de esteviol (expresado como equivalentes de esteviol) de 4 mg / kg de peso corporal / día (JECFA 2008).

Así mismo, existen estudios sobre la aplicación de los GE como edulcorantes, por mencionar Ruiz *et al.*, (2015) elaboraron pan de trigo endulzados con 50% de extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* realizando una comparación con pan de trigo tradicional, teniendo como resultado un pan más blando, crecimiento microbiano menor durante su estudio de vida útil. Con respecto a lo nutricional el contenido de carbohidratos es menor y el contenido de fibra dietética mayor. Por lo que el pan es adecuado como alimento funcional en la nutrición humana y se demuestra que los GE son estables y beneficiosos.

### **1.4.2 Glucósidos de esteviol antidiabético**

Por otro lado, México ha trascendido de ser un país de enfermedades infecciosas, desnutrición a un país con problemas de obesidad y diabetes, esto derivado a una mala nutrición y a la inactividad física entre otros. Se ha documentado que desde el año 1980 al 2000 se incrementó la mortalidad por diabetes mellitus tipo 2,

actualmente la diabetes mellitus tipo 2 es la tercera causa de mortalidad en México según lo indica el INEGI en el 2016, y una de las primeras razones por las que muere la población adulta mayor (Mendoza, 2003), se trata de un desorden metabólico crónico resultado de un defecto en la secreción de insulina. Los GE en particular el esteviósido son una alternativa de los edulcorantes calóricos para las personas con esta enfermedad ya que estos compuestos reducen el exceso de glucosa en la sangre (Anton *et al.*, 2010) potenciando la secreción de insulina y regulando positivamente la actividad de genes del metabolismo de los ácidos grasos (Lailerd *et al.*, 2004) lo que hace del esteviósido un compuesto potente antidiabético.

## **1.5 La biotecnología vegetal y sus aplicaciones**

La biotecnología vegetal se define como la aplicación de herramientas de cultivo *in vitro*, metabólicas y genéticas para el mejoramiento de plantas o para producir nuevos productos (Calva *et al.*, 2005). Es una de las áreas con mayor potencial en el desarrollo productivo, en especial en la búsqueda de optimizar los rendimientos a partir de las denominadas “producciones sustentables”, minimizando la degradación del ambiente y protegiendo los recursos naturales.

La biotecnología vegetal moderna se apoya básicamente en la puesta en práctica de la ingeniería genética, que consiste en introducir información genética nueva en un organismo para dotarlo de capacidades que no poseía para su posterior reproducción, obteniendo individuos modificados y asignados para ese uso o función.

### **1.5.1 Cultivo de células y tejidos vegetales**

El cultivo de células y tejidos vegetales comprende un grupo heterogéneo de técnicas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, libres de microorganismos en un medio de composición química definida e incubados en condiciones ambientales controladas (Calva *et al.*, 2005).

De entre los cultivos de órganos vegetales existen dos tipos que comúnmente son cultivados para la producción de metabolitos secundarios: raíces y brotes; éstos se

caracterizan por tener un modelo metabólico muy similar al de los órganos en la planta y pueden o no estar transformados genéticamente. Con respecto a las células no transformadas el tejido se obtiene a partir de un explante utilizando una combinación apropiada de reguladores de crecimiento mientras que los órganos transformados se obtienen utilizando *Agrobacterium rhizogenes* en el caso de raíces, o *Agrobacterium tumefaciens* en el caso de brotes ( Satdive *et al.*, 2007).

Las raíces transformadas, son utilizadas para estudiar el metabolismo secundario en plantas para la producción de compuestos biológicamente activos. Tienen un crecimiento acelerado comparado con el de raíces no transformadas, son genéticamente homogéneas y morfológicamente estables (Twyman *et al.*, 2004).

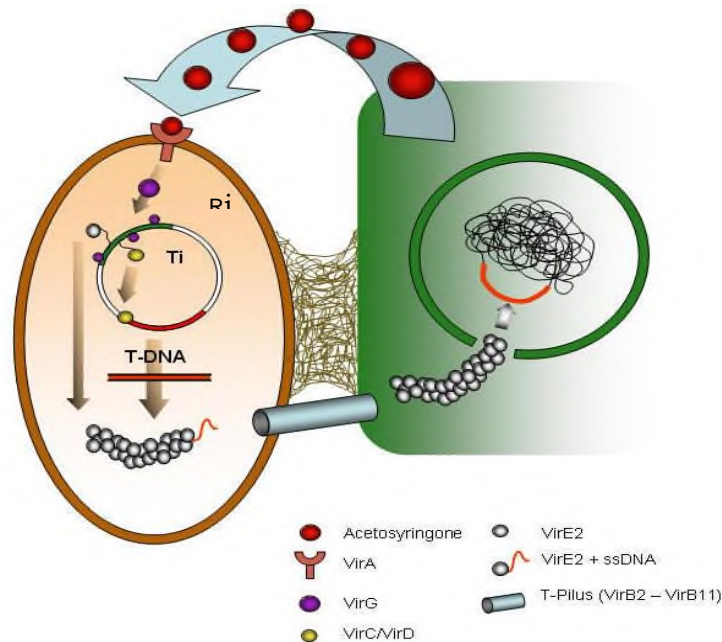
### **1.5.2 Transformación genética de plantas**

La transformación genética en plantas ha tenido un gran impacto no sólo en la biología molecular sino como estrategia para el mejoramiento genético de los cultivos *ex vitro* e *in vitro*. Algunos estudios describen la transferencia estable y la expresión de genes foráneos en plantas de interés medicinal que producen compuestos de actividad farmacológica (Zhu *et al.*, 2009).

Entre los métodos más usados para introducir fragmentos de ADN dentro de una célula vegetal, están la biobalística y el uso de *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Primeramente la biobalística consiste en bombardear a las células que se desean transformar con partículas de metal (oro) cubiertas con las moléculas de los genes que se desea introducir a la célula, el bombardeo se realiza a altas velocidades y presión, utilizando aire o helio comprimido (Sanford, 2000). Los tejidos a transformar pueden ser fragmentos de hojas, tallos, raíz, meristemas o callos. Debido a la fuerza y presión que se ejerce en esta técnica muchas de las células mueren por el impacto mecánico, salvo que las partículas metálicas que contiene el material genético penetran hasta el núcleo de la célula sin dañarlas, estas tienen la posibilidad de que el ADN exógeno se incorpore al material genético de la célula vegetal y sea transformada. Cabe mencionar que la

inserción del fragmento de ADN exógeno puede darse en cualquier región del ADN (al azar), ya que la técnica no tiene control sobre el sitio de inserción.

El segundo método empleado es mediante *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* (Broothaerts *et al.*, 2012), por resaltar *Agrobacterium rhizogenes* es una bacteria gram-negativa que se encuentra de manera natural en el suelo e induce raíces pilosas en plantas por lo general dicotiledóneas, esta bacteria introduce un fragmento de ADN, conocido como ADN de transferencia (T-ADN) foráneo en la célula vegetal que se incorpora al ADN genómico de la planta (Fig. 6). Naturalmente el T-ADN contiene genes característicos (*rolA*, *rolB* y *rolC*) los cuales causan el desarrollo de las raíces pilosas durante la infección, induciendo genes involucrados en la proliferación celular (Gelvin, 2009). Se ha aplicado la capacidad de transferencia del fragmento de ADN de la bacteria a la planta mediante la sustitución de los genes que se localizan en el fragmento de T-ADN por genes de interés, como por ejemplo la introducción de un gen con capacidad de resistencia a herbicidas (Senior *et al.*, 2002).



**Figura 6. Proceso de agrotransformación.** Inicia con la liberación de compuestos fenólicos por la herida (acetosiringona), se activan los genes *vir*, prosigue con la transferencia e integración del T-DNA, expresión del T-DNA y desarrollo de tejidos transformados.

El cultivo de raíces transformadas por *A. rhizogenes* presenta muchas ventajas en comparación con el cultivo de células y de raíces sin transformar. Algunas de estas ventajas son: mayor estabilidad genética; en muchos casos un crecimiento acelerado y una mayor productividad de metabolitos secundarios (Nobukazu 1997). Las raíces pilosas o transformadas se han utilizado para diversos propósitos desde la producción de proteína recombinante (Ono y Tian, 2011) hasta la ingeniería metabólica.

Existen diferentes factores que intervienen en la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* determinando el éxito o fracaso en la transferencia del gen de interés y su posterior integración y expresión. Estos factores varían de acuerdo a la especie vegetal pero se deben tener en cuenta los siguientes aspectos: edad de la planta, tipo de tejido a transformar, cepa de *Agrobacterium* seleccionada para transformar, tiempo y condiciones de inoculación del tejido con *Agrobacterium*, densidad y período de precultivo de la bacteria y presencia de necrosis en el tejido de la planta causada por *Agrobacterium* (Ko *et al.*, 2003).

Posterior al tipo de transformación que se opte de las técnicas anteriormente descritas, se puede elegir por la regeneración de una planta completa a partir de las células transformadas o bien al establecimiento de cultivos de tejidos transformados, en donde las células son manipuladas para que durante su división formen diferentes tejidos y órganos, esto requiere combinar, en un medio de cultivo sintético, diferentes fitoreguladores como por ejemplo auxinas y citoquininas, dando como resultado la división, diferenciación y organización de las células en un órgano, como raíz, hoja o brote (Henry *et al.*, 1994).

## 2. Justificación

La demanda de productos naturales con interés farmacéutico y alimentario, como los GE obtenidos de *S. rebaudiana*, se ha incrementado en los últimos años. Esto hace que el estudio de los metabolitos presentes en las plantas sea un enorme reto y que plantee la necesidad de utilizar diversas tecnologías para su identificación, caracterización y mayor producción. Por tal motivo en este trabajo se pretende, mediante la implementación de la ingeniería metabólica y técnicas de biotecnología vegetal, estudiar el efecto de la expresión heteróloga de una DXS modificada en raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* sobre la producción de GE.

## 3. Hipótesis

La sobreexpresión de DXS modificada en raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* aumentará la producción de glucósidos de esteviol comparada a las raíces no transformadas.

## 4. Objetivos

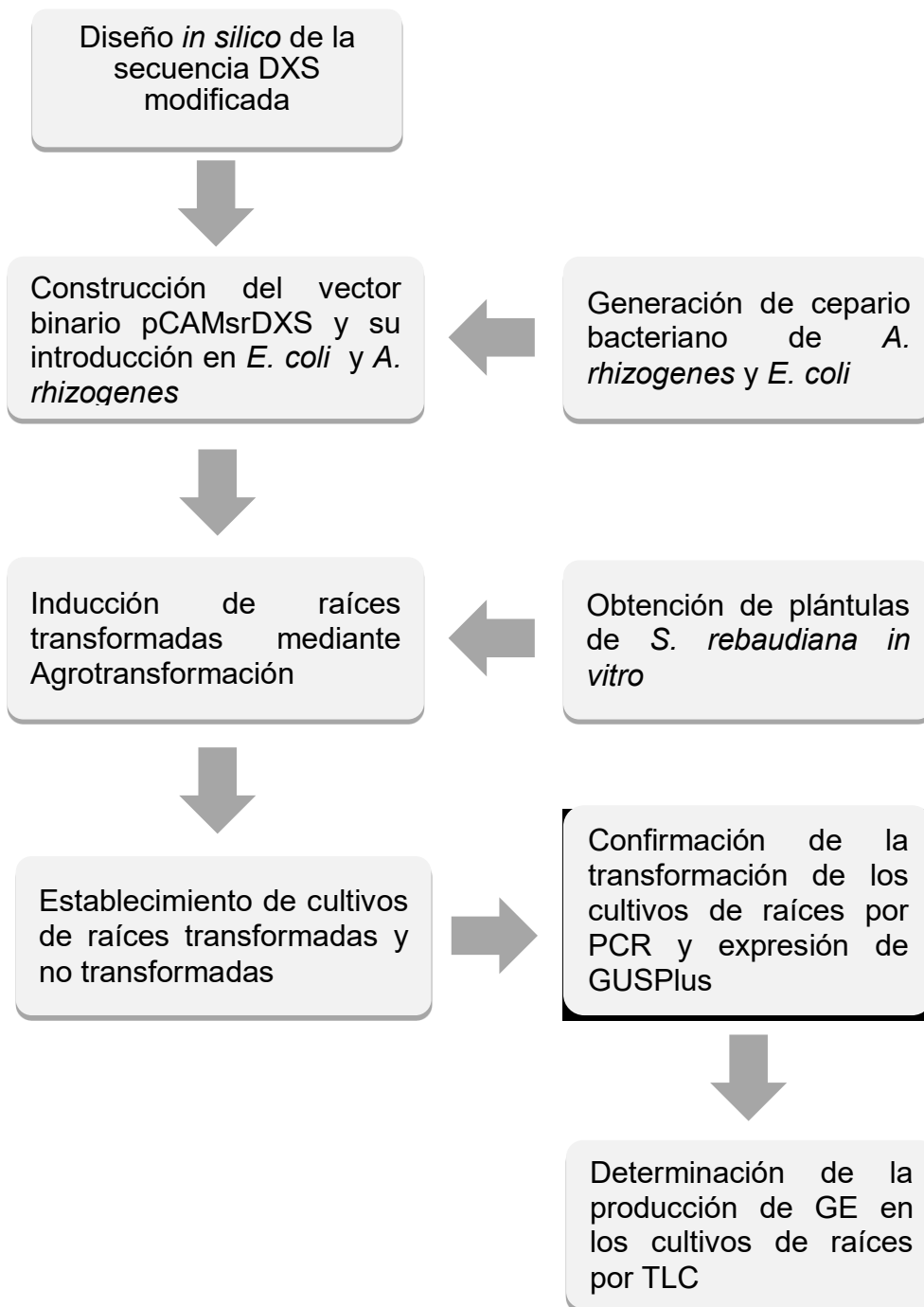
### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de DXS modificada en raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* sobre la producción de glucósidos de esteviol.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Diseñar la secuencia modificada de DXS (srsDXS)
2. Construir el vector binario pCAMsrDXS
3. Implementar el método de agrotransformación en *Stevia rebaudiana*
4. Confirmar la transformación de los cultivos de raíces *Stevia rebaudiana* mediante PCR y expresión del gen reportero GUSPlus
5. Comparar la producción y productividad de GE de los cultivos de raíces transformadas por cromatografía de capa fina y análisis de intensidad de bandas.

## 5. Estrategia experimental



## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado fueron plántulas de *S. rebaudiana* crecidas *in vitro* de dos meses de edad generadas en el laboratorio de cultivos vegetales (Montes *et al.*, 2016) de la Universidad del Papaloapan, fueron utilizadas completas y como explantes.

#### 6.1.2 Medio de cultivo para células vegetales

Medio de cultivo en medio MS (1000 ml)

El medio de cultivo que se utilizó para el mantenimiento del material vegetal fue el medio MS con la siguiente formulación (Tabla 2) (Murashige y Skoog 1962).

Sales MS	2.2 g/L
Sacarosa	20 g/L
Fitigel	2.2 g/L
Vitaminas	10 ml/L
pH	5.8

En un matraz Erlenmeyer de acuerdo a la cantidad necesaria, se mezclaron todos los compuestos de la solución antes mencionados y estuvo en continua agitación para ajustar el pH a un valor de 5.8, posteriormente se agregó el fitigel como agente gelificante, seguidamente se calentó la solución hasta la fusión del fitigel y se colocó en frascos tipo gerber, finalmente se procedió a esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 1 atmósfera de presión y 121 °C (Borgues *et al.*, 2009). Una vez el medio esterilizado, los cultivos se realizaron e incubaron a,  $25 \pm 2$  °C, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad. La línea vegetal fue subcultivada cada 15 días.

### 6.1.3 Stock de Vitaminas 100X

La solución de vitaminas se preparó de manera independiente con un factor de concentración 100X de acuerdo a la siguiente formulación (Tabla 3).

Glicina	20mg
Ácido nicotínico	5 mg
Piridoxina-Hcl	5 mg
Tiamina	1 mg
Mionisitol	1000 mg (1 g)

Los compuestos se disolvieron en 70 ml de H<sub>2</sub>O estéril, más 30 ml de etanol al 96% y se refrigeró a 4°C en alícuotas hasta el momento de su uso.

### 6.2 Material bacteriano

Se utilizaron las cepas LBA9402, AR4 y K599 de *Agrobacterium rhizogenes* y la cepa de *E. coli* DH5α proporcionada amablemente por el Dr. Graciano Calva Calva, del CINVESTAV-IPN unidad Zacatenco.

#### 6.2.1 Medio de cultivo para *Agrobacterium rhizogenes* y *E. coli*

Para reactivar las cepas y verificar su pureza de *A. rhizogenes* y *E. coli* DH5α se cultivó en medio líquido Luria Bertani (Tabla 4).

**Tabla 4. Medio de cultivo LB**

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Nacl	10 g/L
Agar	15 g/L
pH	7

Previo a la inoculación, la cepa mantenida en conservación a 4°C se puso a crecer en cajas petri con el medio de crecimiento antes mencionado. Posteriormente se

inoculó y se dejó crecer por 48 h a 28°C y 120 rpm. El mismo procedimiento es seguido para *E. coli*, sin embargo, las condiciones fueron dejar crecer por 24 h para que esté en su fase exponencial, a 37°C y a 180 rpm.

### **6.3 Obtención células electrocompetentes**

Para la transformación de células de *E. coli* y *A. rhizogenes* con el plásmido pCAMsrDXS es necesario que la bacteria se encuentre en estado de competencia es decir que presente alteraciones en su pared y membrana celular para que permita la entrada de ácidos nucleicos en la célula.

Para ello, se cultivó por 24 h en un tubo de 5 ml con LB a 28°C a 120 r.p.m en el caso de *Agrobacterium* y 37°C 180 r.p.m en *E. coli*, posteriormente se inoculó con un centésimo (50 µl) en un matraz de 25 ml con LB, se monitoreó la densidad óptica con respecto a *A. rhizogenes* hasta 0.3-0.4 nm y *E. coli* 0.5 nm, una vez alcanzada la densidad deseada se enfrió el matraz en hielo por 30 minutos. Se continuó centrifugando en tubos falcon de 15 ml a 5000 r.p.m. y se desechó el sobrenadante, se resuspendió en el volumen inicial (10 ml) con agua estéril fría y centrifugó el cultivo a 5000 r.p.m por 10 minutos y se desechó el sobrenadante, se resuspendió en la mitad del volumen inicial con agua estéril y se procedió a centrifugar a 5000 r.p.m. y desechó el sobrenadante, se resuspendió con 1/10 (1 ml) del volumen inicial con glicerol al 10% frío, volvió a centrifugarse a 5000 r.p.m. y desechó el sobrenadante, nuevamente se resuspendió 1/100 (300 µl) del volumen inicial con glicerol 10% frío, se alícuoto con 50 µl en tubos eppendorf estériles se congeló con nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C.

### **6.4 Diseño *in silico* y síntesis DXS modificada**

Como parte de la caracterización de la secuencia de ARNm silvestre de la enzima 1-desoxixilulosa-5-fosfato sintasa (DXS) de *Stevia rebaudiana* (número de acceso en NCBI FJ214107.1) se realizó un análisis general tomando en cuenta los siguientes rubros: índice de adaptación codónico (CAI), número efectivo de codones (Nc) y % de GC mediante el software Visual Gene Developer (VGD) 1.3 (<http://www.visualgenedeveloper.net/Download.html>) así como la localización del

péptido de tránsito plastídico con la ayuda de la herramienta bioinformática PrediSi (<http://www.predisi.de/index.html>). Después de estos análisis se procedió a realizar la optimización de codones mediante el software VGD utilizando la tabla de uso codónico del cloroplasto de *S. rebaudiana* obtenida de la base de datos Kazusa (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>), puesto que la mayoría de especies tienen diferentes codones preferidos para la traducción de proteínas, el principio es que los codones desfavorables puedan ser reemplazados con codones favorables mientras se mantiene la misma secuencia aminoacídica.

Una vez realizada la optimización codónica se realizó un alineamiento múltiple de secuencia de nucleótidos y proteínas con respecto a la secuencia silvestre de *S. rebaudiana* para conocer el porcentaje de identidad en ambos casos y puntualizar la modificación correspondiente.

La modificación puntual se introdujo sobre la secuencia previamente optimizada sustituyendo el triplete AAG por AAC en la posición nucleotídica 905 para lograr el cambio aminoacídico K281N basado en una sustitución reportada en DXS de *Vitis vinifera* involucrada en el aumento de la actividad enzimática (Battilana *et al.*, 2011).

Una vez definida la secuencia optimizada y modificada de DXS a la cual se le nombró srDXS, se diseñó el cassette de expresión para la movilización del T-ADN en el vector pCAMsrDXS al genoma de *S. rebaudiana* (Fig.7). Este cassette incluye al promotor fuerte y constitutivo CaMV35S (presente en el vector pCAMsrDXS), la señal de tránsito a cloroplasto (CTP), la secuencia srsDXS y finalmente la secuencia TNOS y T35S, terminadores de *A. tumefaciens* (presentes en el plásmido binario).



**Figura. 7** Cassette de expresión diseñado para srsDXS a) promotor CaMV35S b) señal de tránsito a cloroplasto posición 36 de la secuencia c) secuencia optimizada y modificada srsDXS d) secuencia terminadora.

El vector binario base para la construcción fue el **pCAMBIA 1105.1** (Fig. 8 y 9) que contiene el gen de resistencia a higromicina (*aph*) para la selección de plantas y el gen reportero *GUSPlus* como reportero para investigar la transferencia de genes. P35S y Pe35S, promotor y potenciador más 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 T-ADN.

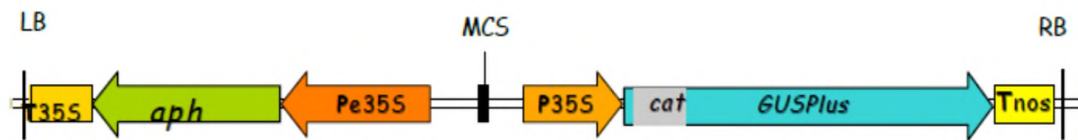


Figura 8. Disposición de las secuencias en el T-ADN del vector pC1105.1

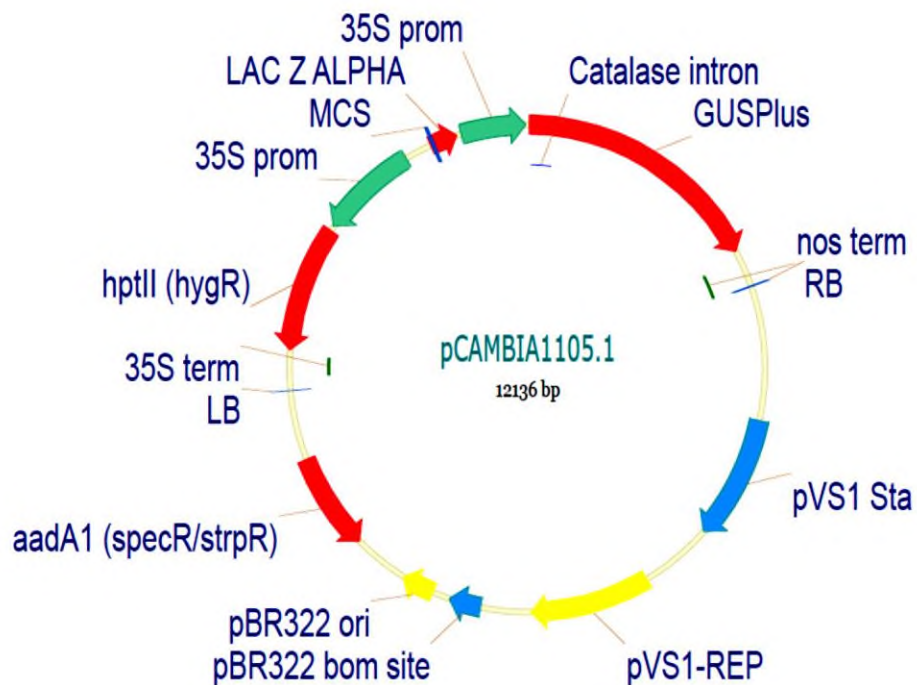


Figura 9. Diagrama del vector pCAMBIA 1105.1

El siguiente paso fue la síntesis y clonación de srDXS en el plásmido binario pCAMBIA 1105.1 mediante el proveedor GenScript teniendo como resultado pCAMsrDXS, por otra parte se clonó en el plásmido pUC57.

### **6.5 Electroporación de *E. coli* y *A. rhizogenes***

La transformación permite introducir plásmido en bacterias ya que las células competentes captan ADN libres presentes en el medio, la técnica más utilizada es la electroporación que consiste en la aplicación de un pulso eléctrico muy breve e intenso que permite la permeabilidad de la membrana plasmática celular.

Para llevar a cabo la electro transformación en *E. coli* con pCAMsrDXS con el fin de obtener copias del mismo plásmido y verificar su autenticidad así como también en *A. rhizogenes* con el objetivo de insertar el plásmido pCAMsrDXS y posteriormente infectar a plántulas de *S. rebaudiana*, en un tubo con 50 µl de células se añadió de 1 a 5 µl (1 µl) de ADN (pCAMsrDXS) se mezcló bien y se dejó reposar en hielo por 1 minuto. Se transfirió la mezcla de células y ADN (pCAMsrDXS) a una celda de electroporación fría de 0.2 cm y electroporó según las condiciones establecidas en el equipo para *E. coli* 1.80 Kv 5 ms y *A. rhizogenes* 2.20 Kv 5 ms, se removió la celda del electroporador y se añadió de inmediato 1 ml de LB sin antibiótico a la celda, se resuspendieron las células y transfirió la suspensión a un tubo de 1.5 ml. Se procedió a incubar para *Agrobacterium* por 3 h a 30°C a 250 r.p.m y *E. coli* a 37°C por una hora a 225 r.p.m posteriormente se plaqueó las células en cajas petri con medio LB con estreptomycin a 100 µg/ml e incubó por 24 h a 37°C en el caso de *E. coli* y 48 h 28°C para *Agrobacterium rhizogenes*.

### **6.6 Extracción de ADN plasmídico**

Con el fin de verificar si se llevó acabo bien la transformación con el plásmido en las bacterias, se procedió con la extracción mediante el protocolo descrito por Sambrook 2001.

La bacteria conteniendo el plásmido se inoculó en 5 ml de medio LB e incubó a 28°C 120 r.p.m. por 48 h para *A. rhizogenes* y a 37°C 180 r.p.m por 24 h con

respecto a *E. coli*, transcurriendo este lapso de tiempo se centrifugó a 13 000 r.p.m durante 2 minutos formando un pellet de bacterias, se descartó el sobrenadante y se resuspendió cada pellet en 100 µl de la solución I (Tabla 5) y se transfirió a un tubo de 2 ml estéril, posteriormente se aplicó vortex por 30 segundos e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió 200 µl de la solución II a cada tubo, se tapó y mezcló bien por inversión e incubó en hielo por 5 minutos. Nuevamente se añadió 150 µl de la solución III (fría), se tapó el tubo, se mezcló por inversión dando vortex por 30 segundos e incubó en hielo por 5 minutos. Enseguida se efectuó vortex por 30 segundos y centrifugó por 5 minutos a 13,000 r.p.m. Se transfirió el sobrenadante a un eppendorf estéril. Añadiendo 500 µl de etanol 100% y se mezcló invirtiendo el eppendorf, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por 5 minutos a 13,000 rpm y descartó el sobrenadante cuidadosamente. Se lavó el sedimento añadiendo 1 ml de alcohol al 70% (etanol) y se mezcló invirtiendo varias veces, se centrifugó por 3 minutos a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante cuidadosamente. Se dejó secar el etanol para que no quedara restos en las paredes del tubo (5-10) min. Se resuspendió el sedimento en 50 µl de agua desionizada estéril.

La cuantificación de ADN se realizó en un espectrofotómetro nanodrop ND2000 thermo scientific, mediante la determinación de los valores de absorbancia a 260 nm para nucleótidos y 280 nm para proteínas, la relación de absorbancia 260/280 fue tomada como parámetro de pureza considerando un valor mínimo de calidad de 1.8. Los valores se calcularon usando la relación de 1 unidad de densidad óptica equivalente a 50 µg/ml de ADN en la muestra. Este fue el procedimiento seguido rutinariamente para la determinación de ADN genómico y plasmídico y por último se procedió a almacenar a -20°C.

**Tabla 5. Solución I Glucosa/Tris/EDTA (GTE)**

Glucosa	50 Mm
Tris Base	25 Mm
EDTA	10 mM

**Nota:** La solución I debe permanecer en hielo

**Tabla 6. Solución II NaOH/SDS**

NaOH	0.2 N
SDS	1% (w/v)

**Tabla 7. Solución III Acetato de potasio 5M**

Ácido acético glacial	29.5 ml
KOH	En grano hasta pH de 4.8
Agua destilada estéril	Hasta 100 ml

### 6.6.1 Patrones de digestión del ADN plasmídico

Se realizó un análisis de digestión *in silico* con el software Vector Nti express Designer y con la secuencia del plásmido pCAMsrDXS con el fin de visualizar las bandas que se observarían en el gel de electroforesis.

Las enzimas de restricción, también llamadas endonucleasas, son enzimas que cortan enlaces fosfodiéster del material genético a partir de una secuencia que reconocen. Primeramente se realizó una digestión con *EcoR1*, para realizar la digestión se consideró 1 µg de ADN, 0.5 µl de enzima *EcoR1*, 2 µl de Buffer H y agua desionizada estéril para completar los 20 µl de reacción e incubando a 37°C por una hora en el termociclador. Y por último se realizó electroforesis con gel de agarosa al 1% para plásmidos sin digerir y digerido cargando para ambos 0.5 µg.

Para el caso de pCAMsrDXS extraído de *E. coli* se realizó una digestión doble con *XbaI* y *SpeI*, se utilizaron 3 µg de ADN, 2 µl de *SpeI* de una dilución 1/10, 0.5 µl de *XbaI*, 2 µl de Buffer M, 2 µl de BSA y el resto de agua desionizada completando la reacción de 20 µl. Así mismo se procedió con electroforesis con gel de agarosa al 1% considerando 1.5 µg de ADN y 1 µl de marcador de peso molecular (MPM).

Por otro lado la digestión de PUC 57 con pCAMsrDXS se realizó con *PstI* considerando 3 µg de ADN, *PstI* 3.5 µl, 2 µl de Buffer H y agua desionizada para 20 µl de reacción.

Considerando que se realizó la transformación con el plásmido pCAMsrDXS en las tres cepas 9402, AR4 y K599 de *Agrobacterium rhizogenes* se procedió con la digestión haciendo uso de la enzima PstI, tomando 10 µg de ADN, 3.5 µl de PstI de una dilución 1/10, 2 µl de buffer H y agua desionizada estéril para 20 µl de reacción.

## **6.7 Agrotransformación**

El procedimiento descrito a continuación fue utilizado para todos los tipos de plásmidos binarios, silvestres, vector vacío (pCAMBIA 1105.1) y la construcción que contiene la secuencia de DXS modificada (pCAMsrDXS). Explantes de hipocotilos provenientes de plántulas de *S. rebaudiana* se infectaron por inmersión en una suspensión de *A. rhizogenes* de 48 h de crecimiento (fase exponencial), posteriormente fueron colocados en medio MS suplementado con sacarosa al 2% y vitaminas, sin reguladores de crecimiento y se mantuvieron en fotoperiodo 16/8 horas de luz/oscuridad a 25°C hasta la aparición de raíces pilosas. Paralelamente a plántulas *in vitro* se les cortó la parte aérea y se infectaron en la herida de la forma antes descrita (García E. *et al.*, 2014). Las raíces presuntamente transformadas emergidas en los puntos de infección fueron escindidas de los explantes y colocadas en frascos con medio MS semisólido con cefotaxima (300 µg/ml) para eliminar las bacterias remanentes. Se realizaron resiembras cada 5 días para evitar la colonización de *Agrobacterium rhizogenes* y así establecer cultivos axénicos (García E. *et al.*, 2010).

### **6.7.1 Extracción de DNA genómico de raíces putativas**

Posterior a la infección con las cepas LBA9402, K599 Y AR4 de *Agrobacterium rhizogenes*, las líneas de raíces putativas o presuntamente transformadas, que crecieron independientemente en medio MS semisólido, se procedió a la extracción de ADN para continuar con la verificación en PCR.

La extracción de ADN genómico (ADNg) se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Edwards *et al.*, 1991, con modificaciones; 200 mg de raíz fueron triturados en un mortero estéril con nitrógeno líquido hasta la obtención de un

polvo fino. Se añadieron 500µl de buffer de extracción (SDS 0.5%, NaCl 250 mM, Tris-HCl pH 8 1M, EDTA 0.5 M), posteriormente se transfirió el material a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se incubó por 30 minutos a 65°C transcurrido este tiempo se le agregó 500 µl de cloroformo isoamilico en una proporción 24:1, se homogenizó dándole vortex por 30 segundos y se centrifugó a 14800 r.p.m. por 10 minutos a temperatura ambiente (RT). Se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril y se añadió un volumen igual de isopropanol (500 µl), se mezcló por inversión, las muestras se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 14800 r.p.m. por 15 minutos RT. Se decantó el isopropanol y se agregó 750 µl de etanol al 70% y se homogenizó en vortex para posteriormente centrifugar a máxima velocidad por 7 minutos. Se retiró el etanol con cuidado y se dejó secando el exceso de etanol a temperatura ambiente colocando los tubos sobre una toalla de papel absorbente limpio. La pastilla libre de etanol se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril y se almacenó a 4°C para su uso inmediato.

### **6.7.2. Verificación de la transformación en raíces vía PCR**

La verificación de la transformación en las diferentes raíces putativas se realizó vía PCR, en el caso de las raíces obtenidas mediante la infección de plántulas e hipocotilos con las cepas de *A. rhizogenes* silvestre, se amplificaron los genes rol B y rol-D de *A. rhizogenes* en el ADN de las líneas de raíces presuntamente transformadas, debido que en el T-ADN contiene los genes rol A, B, C y D, estos genes tienen un papel fundamental en la inducción de la raíz pilosa. Para la amplificación de los genes se diseñaron los cebadores descritos en la tabla 8. Así mismo, se diseñaron cebadores para raíces putativas obtenidas mediante la infección en plántulas con *A. rhizogenes* pCAMBIA 1105.1 (plásmido vacío) amplificando a 35S y para K599 pCAMsrDXS (plásmido con la construcción) la secuencia srDXS.

**Tabla 8. Descripción de cebadores para las diferentes raíces putativas**

Tipo de raíz	Cebadores		TM	Amplificación
Obtenida de infección con <i>A. rhizogenes</i> silvestre	Rol B	Directo 5'-tccagcaggtgaatgaacaa-3'	60 °C	150 pb
		Reverso 3'-gaccacgatgcaaccctatc-5'		
	Rol D	Directo 5'-gggtacctggatccaacaga-3'		
		Reverso 3'-ataagctaagggcccatcca-5'		
Obtenida de infección con <i>A. rhizogenes</i> pCAMBIA 1105.1	35 S	Directo 5'- gaactcgccgtaaagactgg-3'	64 °C	250 pb
		Reverso 3'-agccaccttcttctttccact-5'		
Obtenida de infección K599 pCAMsrDXS	srDXS	Directo 5'-cctcagtctctctaactcgatctt-3'	64 °C	162 pb
		reverso 3'-ttcagcgtctgaattcgttg-5'		

Los componentes que se utilizaron en las mezclas de reacción para la PCR se describen en la tabla 9.

**Tabla 9. Componentes PCR**

Kits KAPA3G Planta PCR	Final [ ]	20 µl reacción PCR
ADN polimerasa (2.5 U/µl)	1U/20 µl	0.8 µl
Buffer con dNTPs y MgCl <sub>2</sub> (2X)	1X	10 µl
Enhancer (100X)	1X	1 µl
Cebadores rol B y D (10 µM)	0.2 µM	0.8 µl
<b>ADN</b>		
<b>Agua</b>		
<b>Total reacción</b>		20 µl

Las etapas para la PCR punto final fue primeramente desnaturalización fase 1: 95°C por 1 minuto, fase 2: 95°C 15 segundos 40 ciclos, para el alineamiento se realizó un gradiente de temperatura 55°C, 58°C y 61°C por 15 segundos y extensión 72°C 30 segundos. Mientras para pCAMBIA 1105.1 y srDXS el gradiente de temperatura para el alineamiento fueron de 62°C, 64°C, 66°C y 68 °C.

## 6.8 Análisis electroforéticos

Para revisar la integridad del ADN y evaluar el producto de PCR se utilizó geles de agarosa de 0.8 % y 1.2 % ( p/v) respectivamente, buffer de corrida TAE 1X, buffer de carga azul de bromofenol a 100 Volts por 45 minutos, para el revelado bromuro de etidio [final] 0.5 µg/ml por 5 minutos y para retirar el exceso de bromuro se enjuago en agua desionizada. Así mismo, se observó el gel en un fotodocumentador marca syngene el cual esta acoplada a una computadora y por medio del software se logra observar el gel exponiéndolo a luz media UV en cierto periodo.

**Tabla 10. Buffer TAE 10X**

Tris	24.2 g 40mM
Ácido acético	5.71 ml
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	3.72 g 2mM
Agua desionizada estéril	500 ml

**Tabla 11. Buffer carga 6X**

Azul de bromofenol	25 mg
Glicerol	3 ml
Agua desionizada estéril.	10 ml

**Tabla 12. Bromuro de etidio 20X (10 mg/ ml)**

Bromuro de etidio	50 mg	10 mg
Agua destilada	5 ml	1 ml

**Tabla. 13 Preparación Agarosa**

		TAE 10X	Agua desionizada
Agarosa 0.8%	0.8 g	10 ml	90 ml
Agarosa 1.2%	1.2 g	10 ml	90 ml

**Nota:** El bromuro de etidio es sensible a luz preparar la solución en frasco ámbar y tomar precauciones al momento de preparar.

## **6.9 Tinción histoquímica de $\beta$ -glucuronidasa**

La actividad de glucuronidasa fue determinada de acuerdo a lo reportado por Jefferson (1987) y Sundaresan *et al.*, (1995), con algunas modificaciones. Los explantes de raíz (1-2 cm) fueron puestos en tubos Eppendorf de 200  $\mu$ l con 100  $\mu$ l de buffer de tinción GUS compuesto por 100 mM fosfato de sodio, pH 7, 10 mM EDTA (pH 8), 0.1% Tritón X-100, y 2 mM 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronato de ciclohexil-amonio; (X-Gluc B8049 Sigma Aldrich). Los tubos fueron sometidos a vacío por 10 minutos en un desecador para permitir la infiltración del reactivo-sustrato X-Gluc dentro del tejido radicular. El vacío se rompió lentamente y se repitió el procedimiento 2 veces más. Después de la infiltración, los tubos fueron incubados toda la noche a 37°C.

## **6.10 Extracción de glucósidos de esteviol de raíces**

Para la extracción de GE en raíces *in vitro* transformadas y no transformadas de *S. rebaudiana*, las raíces se pesaron y congelaron a -4 °C, posteriormente se liofilizaron (LABCONCO, modelo freeZone 4.5 PLUS) y almacenaron en tubos falcon (previamente en peso constante) a -4 °C, hasta su análisis. La biomasa liofilizada se maceró y homogenizó con metanol al 80%, se sonicó por 30 min y se incubó en agitación constante durante 24 h, a continuación las muestras se centrifugaron a 15000 r.p.m. durante 15 min, en seguida se separó el sobrenadante en tubos estériles (peso constante) y se dejó secando a 50 °C hasta la obtención del extracto completamente seco. Los extractos se concentraron y almacenaron de acuerdo a lo descrito previamente por Bondarev *et al.*, (2001).

## **6.11 Cromatografía en capa fina (TLC) y análisis de intensidad de imagen**

El extracto obtenido de raíces de *S. rebaudiana* se resuspendió en 100 $\mu$ l de MeOH al 80%, posteriormente se utilizaron placas de sílica gel 60 F25 Merck y para la separación de las muestras, se colocaron las placas en una cámara cromatográfica, los estándares utilizados fueron rebaudiósido A (1432-Sigma Aldrich) y esteviósido (50956-Sigma Adrich), se usó como disolvente (fase móvil) mezcla de acetato de etilo-EtOH-Agua (10:2:4:4) (Londhe y Nanaware 2013). Para

el revelado se realizó con la solución de orcinol (01875 Sigma Aldrich) al 5% que consistió en una mezcla de ácido sulfúrico (95:5) (Reis *et al.*, 2011). Posteriormente de haber aplicado el revelador, las placas se calentaron con la ayuda de una secadora para cabello por 20 segundos. La identificación de los GE presentes en las muestras se comprobó por la comparación del factor de retención ( $R_f$ ) de los estándares utilizados y se calculó con la distancia recorrida por el frente disolvente entre la distancia recorrida por el soluto.

Las placas de TLC fueron digitalizadas y analizadas en el software GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com>) donde se obtuvieron los valores de intensidad de bandas y se interpolaron en una curva patrón construida en TLC para los compuestos Est y RebA en el intervalo de 0 hasta 1.7 mg/ml.

## **6.12 Análisis estadísticos**

El análisis estadístico de los diseños experimentales se realizó usando el modelo lineal general con significancia del 5% en el software MINITAB 16 y análisis de comparación múltiple de medias (Tuckey).

## **7. Resultados y discusión**

### **7.1 Diseño *in silico* de secuencia srsDXS y construcción del vector pCAMsrDXS**

#### **7.1.1 Análisis de la secuencia endógena de DXS y optimización de uso codónico**

La DXS es, hasta el momento, la enzima que predominantemente regula la primera parte de la biosíntesis de GE, es decir, la síntesis de los precursores isoprenoides. Es por esta principal razón que en este trabajo se propuso analizar y modificar la enzima DXS para evaluar su efecto *in vivo* y ofrecer información sobre posibles mecanismos de regulación que afectan a esta enzima. Así, a partir de la secuencia nucleotídica de la enzima DXS nativa de *S. rebaudiana* obtenida de la

base de datos GenBank (FJ214107.1), correspondiente al ARNm completo con una extensión de 2,430 pb.

El diseño *in silico* del gen srsDXS, se inició con la caracterización y la posterior optimización del uso codónico en el programa Visual Gene Developer, utilizando la tabla de uso codónico del cloroplasto de *S. rebaudiana* obtenida de la base de Datos de Uso Codónico del Kazusa DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/codón/>).

La secuencia de DXS tuvo un índice de adaptación codónico (CAI) de 0.7315 y %GC de 45.83. El parámetro CAI es un indicativo de la preferencia de uso de codones en la secuencia analizada (Sharp *et al.*, 1987). Se consideran valores de referencia óptimos de estos parámetros tendientes a CAI mayor a 0.7 y %GC 50.

Seguidamente, se utilizó la función de optimización codónica en el software antes mencionado y se ejecutaron rondas iterativas de optimización hasta y alcanzar un aumento en el valor de CAI de 5% (Tabla 14). El porcentaje de GC también se modificó en consecuencia del cambio en los codones pasando de 45.83% a 43.46% en la tercera iteración de optimización.

**Tabla 14. Valores de CAI y %GC de la secuencia tras las iteraciones de optimización.**

<b>Secuencia/Iteración</b>	<b>CAI</b>	<b>%GC</b>
Secuencia original	0.7315	45.83
Primera iteración	0.7346	45.49
Segunda iteración	0.7362	45.72
Tercera iteración	0.7685	43.46

Se observó que la secuencia original de DXS de *Stevia rebaudiana* pudo ser optimizada a pesar de ser una secuencia perteneciente de manera endógena a *S. rebaudiana*, sin embargo, fue importante considerar las limitaciones en el aumento del CAI pues valores de CAI por encima de 0.9 llegan a favorecer sesgo de uso codónico que puede llegar a afectar de manera negativa la expresión de la secuencia (Gustafsson *et al.*, 2004).





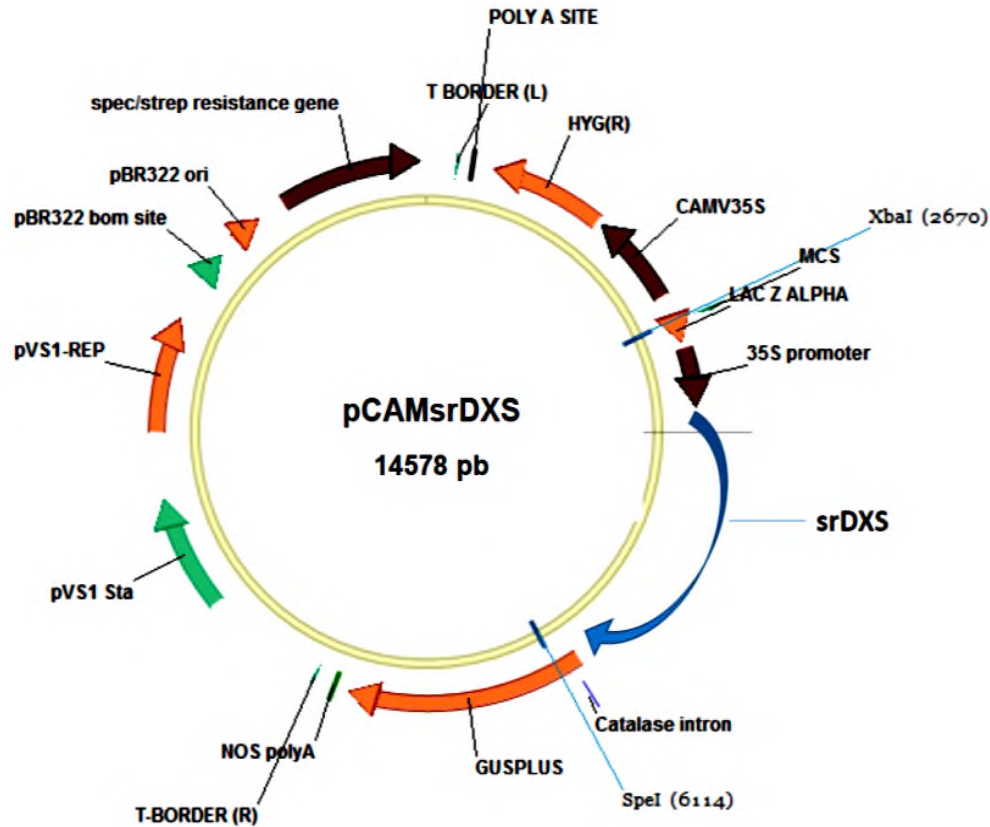
Por otro lado, de acuerdo a lo encontrado por Battilana *et al.*, (2011) que introdujeron la sustitución aminoacídica K284N en la DXS de *Vitis vinifera* y que estuvo involucrada en el aumento de la actividad enzimática, las secuencias de ambas enzimas (DXS de *V. vinifera* y DXS modificada de *S. rebaudiana*) se alinearon y se sustituyó el triplete AAG por AAC en la posición nucleotídica 905 basada para lograr el cambio aminoacídico K281N en la posición adecuada (Fig. 12).

Score	Expect	Method	Identities	Positives
1044 bits(2699)	0.0	Compositional matrix adjust.	489/654(75%)	564/654(86%)
Query 57	KVEFAGEKPVTPLLDITINYPVHMKNLTTQDLEQLAAELRQDIVYSVANTGGHLSSSLGVV			116
Sbjct 60	+ E+ ++P TPLLDTINYP+HMKNL+ ++L+QLA ELR D+V++V+ TGGHL SSLGVV			
Query 117	ELSVLHHVFNTPDCKIIVDVGHQAYPHKILTGRRSKMHTIRKTSGLAGFPKRDESAHDA			176
Sbjct 120	EL+VALH+VFN P D+I+WDVGHQ+YPHKILTGRR +MHT+R+T GLAGF KR ES +D			
Query 177	ELTVALHYVFNAPQDRILWVGHQSYPHKILTGRRDQMHTMRQTDGLAGFTKRSESEYDC			179
Query 237	FGAGHSSTISAGLGMVGRDLLGKTNVVISVIGDGAMTAGRAYEAINNAGFLDSNLIVV			236
Sbjct 180	FG GHSST+ISAGLGMVGRDL GK NNVI+VIGDGAMTAG+AYEA+NNAG+LDS++IV+			239
Query 297	FGTGHSSTTISAGLGMVGRDLKGGKNNVIAVIGDGAMTAGQAYEAMNNAGYLDSMIVI			239
Query 237	LNDNKQVSLPTATLDGPATPVGALSGLSKLQASTKFRKLREAAK <sup>281</sup> ITKQIGPQAHEVAA			296
Sbjct 240	LNDNKQVSLPTATLDGP PVGALS ALS+LQ++ R+LRE AK <sup>284</sup> +TKQIG HE+AA			299
Query 297	LNDNKQVSLPTATLDGPIPPVVALSSALSRLQSNRPLRELREVAK <sup>281</sup> SVTKQIGGPMHELAA			299
Query 297	KVDEYARGMISASGSTLFEELGLYYIGPVDGHNVEDLVNIFEKVKSMPPAPGPVLIHIVTE			356
Sbjct 300	KVDEYARGMIS SGSTLFEELGLYYIGPVDGHN++DLV I ++VKS GPVLIH+VTE			359
Query 357	KVDEYARGMISGSSTLFEELGLYYIGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTKTTGPVLIHVTE			359
Query 357	KGKGYPPAEAAAADRMHGVVKFDVPTGKQFKTKSPTLSYTQYFAESLIKEAEADNKIVAIH			416
Sbjct 360	KG+GYP AE AAD+ HGV KFD TGKQFK+ +PT SYT YFAE+LI EAE D IVAIH			419
Query 417	KGRGYPYAEKAADKYHGVTKFDPATGKQFKSSAPTQSYTTYFAEALIAEAEVDKDIVAIH			419
Query 417	AAMGGGTGLNYFQKKCPERCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRGYDQV			476
Sbjct 420	AAMGGGTGLN F ++ P RCFDVGIAEQHAVTFAAGLA EG+KPFCAIYSSF+QR YDQV			479
Query 477	AAMGGGTGLNLFHRRFPTRCFDVGIAEQHAVTFAAGLACEGIKPFCAIYSSFMQRAYDQV			479
Query 477	VHDVDLQKLPVRFAMDRAGLVGADGPTHCGAFDITYMACLPNMVVMAPADEAELMHMVAT			536
Sbjct 480	VHDVDLQKLPV+FAMDRAGLVGADGPTHCGAFD+T+MACLPNMVVMAPADEAEL HMVAT			539
Query 537	VHDVDLQKLPVKFAMDRAGLVGADGPTHCGAFDVTFMACLPNMVVMAPADEAELFHMVAT			539
Query 537	AAAIDDRPSCFRFPRGNGIGAPLPPNKGPIEVGKGRILLEGTRVAILGYGSIVQECLG			596
Sbjct 540	AAAIDDRPSCFR+PRGNG+G LPP NKGPIEVG+GRIL+EG RVA+LYG+ VQ CL			599
Query 597	AAAIDDRPSCFRYPRGNGVVELPPGNKGPIEVGRGRILIEGERVALLGYGTAVQSCLV			599
Query 597	AASLLQAHMVSATVADARFCKPLDTGLIRRLANEHEVLLTVEEGSIGGFGSHVAHFLSIN			656
Sbjct 600	A+SLL+ H + TVADARFCKPLD LIR LA HEVL+TVEEGSIGGFGSHVA FL++N			659
Query 657	AASLLQAHMVSATVADARFCKPLDHALIRSLAKSHEVLITVEEGSIGGFGSHVAQFLALN			659
Query 657	GLLDGLKLRAMTLPDKYIDHGAPQDQLEETGLSSKHICSSLLSLLGKPKALQ			710
Sbjct 660	GLLDG K M LPD+YIDHGAP DQL GL+ HI +++ ++LG+ +EAL+			713
Query 657	GLLDGTKNWSPMVLPRYIDHGAPADQLAMAGLTPSHIAATVFNILGQTRALE			713

**Figura 12. Alineamiento aminoacídico de DXS modificada de *Stevia rebaudiana* (Query) y DXS *Vitis vinifera* (Sbjct).** El recuadro rojo indica el aminoácido Lisina en la posición 281 de *S. rebaudiana* y 284 de *V. vinifera*.

### 7.1.2 Construcción del vector pCAMsrDXS

Finalmente, a través del proveedor GenScript se sintetizó srDXS y clonó en el plásmido pCAMBIA 1105.1 obteniendo **pCAMsrDXS** (Fig. 13) de forma liofilizada.



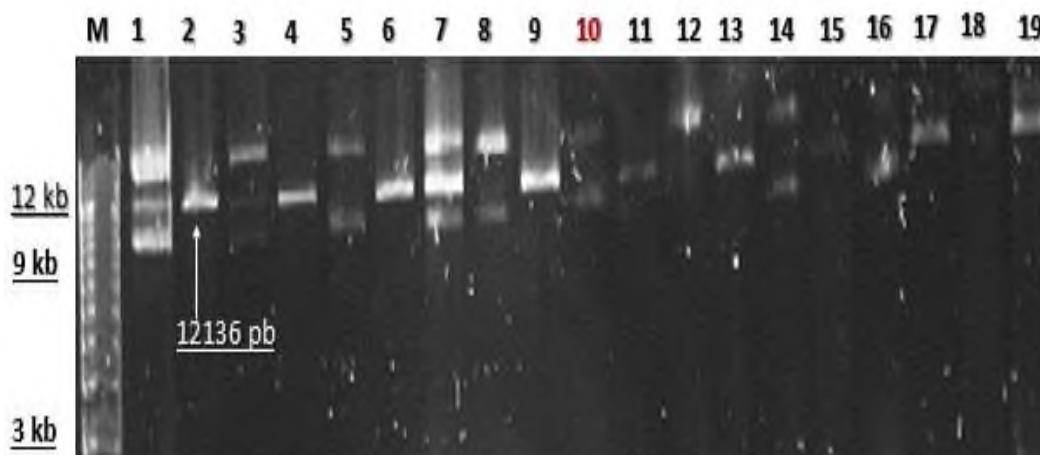
**Figura. 13.** Diagrama del vector pCAMsrDXS. La secuencia srDXS se insertó entre el promotor constitutivo y GUSPLUS.

## 7.2 Electroporación de *E. coli* y *A. rhizogenes*

### 7.2.1 Inserción del vector pCAMBIA 1105.1 en *E. coli* y *A. rhizogenes*

Posterior a la síntesis de pCAMsrDXS y la recuperación del vector vacío (pCAMBIA 1105.1), se procedió con la transformación de estos plásmidos en células competentes de *E. coli* y *A. rhizogenes* para su posterior utilización en el proceso de agrotransformación.

Así, primeramente, plásmidos pCAMBIA 1105.1 extraídos de las colonias resultantes de la transformación, tanto de *E. coli* como de *A. rhizogenes*, fueron analizados por patrones de digestión con la enzima EcoRI de único corte, seguidos de electroforesis (Fig. 14).



**Figura 14. Productos de digestión del plásmido pCAMBIA 1105.1 con la enzima de restricción EcoRI.** Agarosa 1% 100 V 45 minutos. **M** marcador de peso molecular, carril 1,3,5 y 8 pertenece al plásmido pCAMBIA 1105.1 sin digerir extraído de *E. coli*, por otro lado los carriles 2,4,6 y 9 se trata del plásmido antes mencionado digerido con EcoRI, mientras que los carriles 10,12,14,16 y 18 corresponden al plásmido pCAMBIA 1105.1 sin digerir extraído de *Agrobacterium rhizogenes* K599. Por último los carriles 11, 13, 15,17 y 19 corresponden al plásmido digerido con EcoRI.

Del gel anterior se comprueba el tamaño del plásmido pCAMBIA 1105.1 (12,136 pb), dado que en el producto de digestión, el plásmido digerido con la enzima de restricción EcoRI tiene como resultado la forma linealizada de dicho plásmido y corresponde al tamaño de éste.

Por otra parte, se comprobó la transformación de la cepa K599 con el plásmido pCAMBIA 1105.1 y dicha cepa se utilizó posteriormente para la infección de plántulas de *S. rebaudiana* para la obtención de raíces transformadas y hacer la comparación final de producción de glucósidos de esteviol con raíces no transformadas, raíces transformadas con cepas silvestre de *A. rhizogenes* y raíces transformadas con pCAMsrDXS, esto con el objetivo de evaluar qué tipo de raíz presenta una mayor producción de GE.

## 7.2.2 Inserción del vector pCAMsrDXS en *E. coli* y *A. rhizogenes*

Así mismo, se efectuó la clonación del plásmido pCAMsrDXS, primeramente, en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  con el fin de comprobar su integridad y propagar dicho plásmido para posteriores trabajos. Para ello previo se realizó un análisis *in silico* de digestión (Fig. 15) con las enzimas de restricción XbaI y SpeI, teniendo como resultado 2 bandas, una de 3444 pb y otra de 11,134 pb.

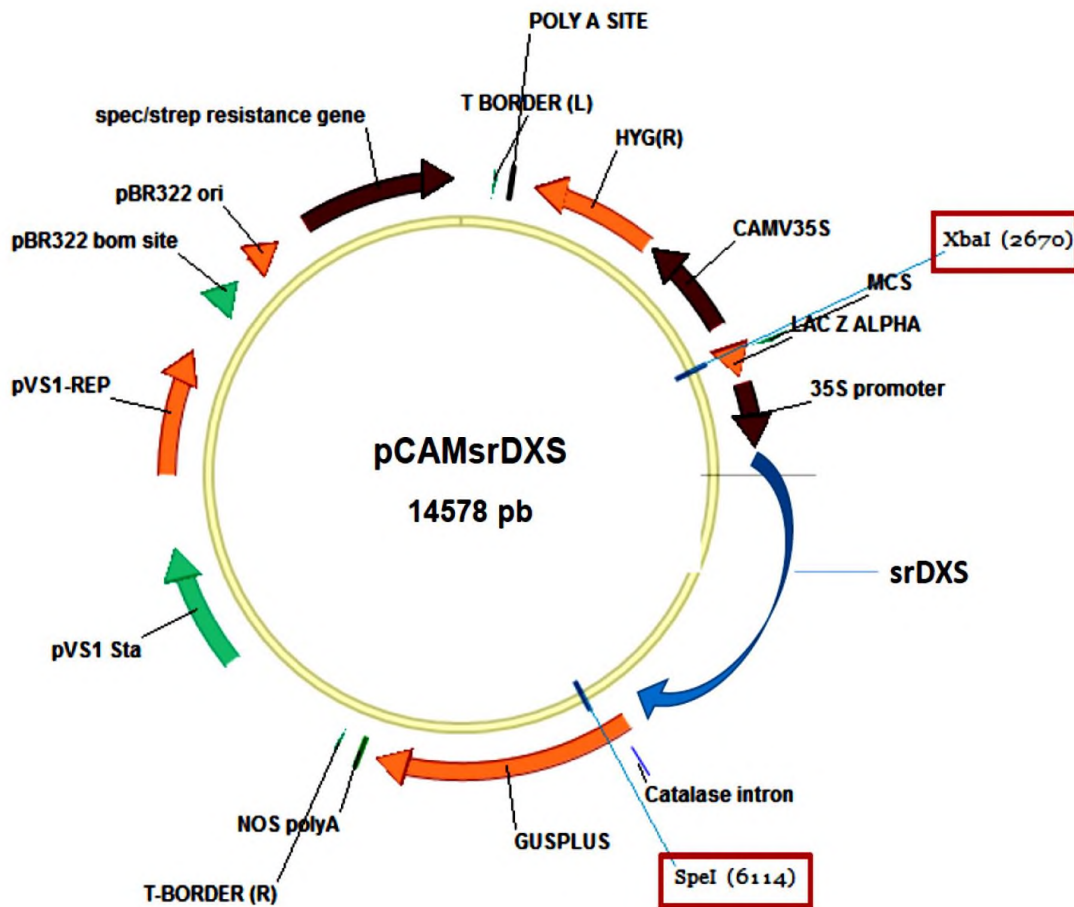
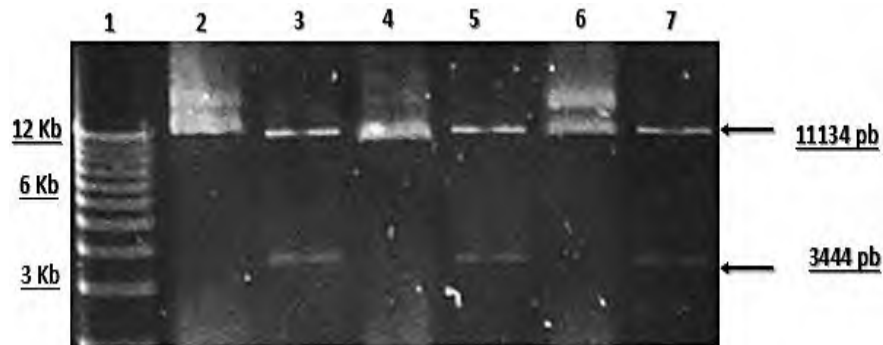


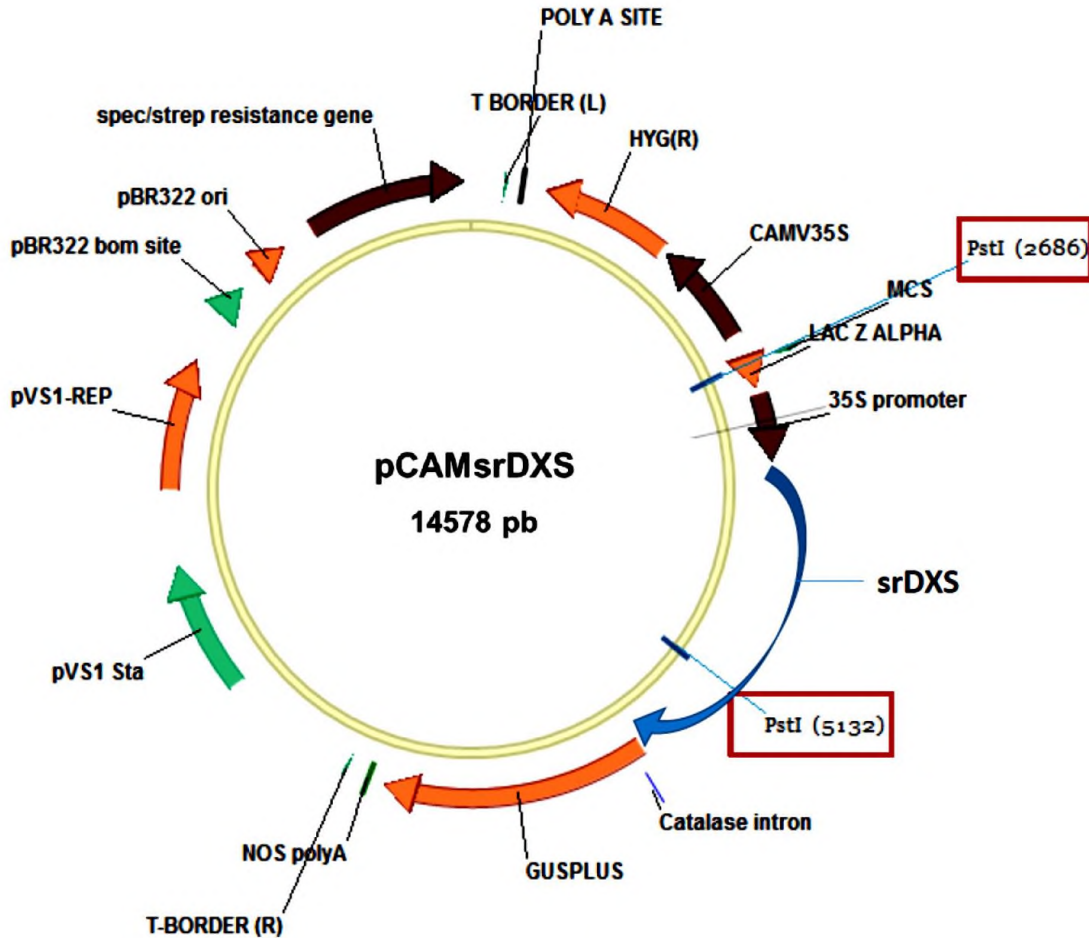
Figura 15. Sitios de corte de las enzimas XbaI y SpeI en el vector pCAMsrDXS dando como resultado 2 bandas de 3444 pb y 11,134 pb.

Así, se procedió con la comprobación de transformación de pCAMsrDXS en diferentes colonias de *E. coli* a través de las dobles digestiones mencionadas anteriormente (Fig. 16). En este gel las bandas observadas en los carriles 3,5 y 7 fueron las esperadas y correspondieron con el previo análisis *in silico* comprobando la identidad e integridad del vector transformado en *E. coli*. Estas colonias fueron criopreservadas y adicionadas al cepario del laboratorio.



**Figura 16 Producto de Doble Digestión del Plásmido pCAMsrDXS con las enzimas de restricción XbaI Y SpeI en *E. coli*.** El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Carril 2,4 y 6 concierne a pCAMsrDXS sin digerir mientras que los carriles 3,5 y 7 se tratan del plásmido binario digerido con las enzimas XbaI y SpeI.

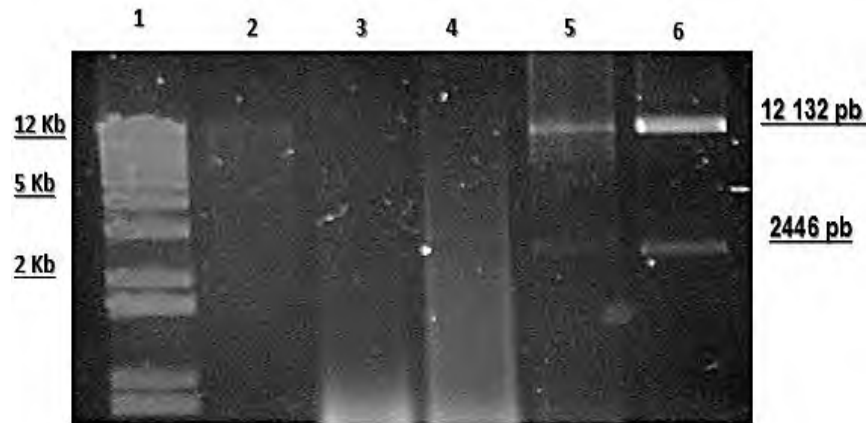
Por otra parte, inmediatamente de la transformación de las cepas LBA9402, AR4 y K599 de *A. rhizogenes* con el vector pCAMsrDXS, se extrajeron plásmidos de las colonias resultantes para ser digeridos con la enzima PstI. Aquellas colonias que fueron positivas a la integración del vector mostraron como resultado de la digestión dos bandas, una de 12,132 pb (aproximadamente el vector base pCAMBIA 1105.1) y otra de 2,446 pb (aproximadamente el tamaño de la secuencia srDXS) (Fig. 17).



**Figura 17. Sitios de corte por la enzima PstI en el vector pCAMsrDXS dando como resultado 2 bandas de 12,132 pb y 2,446 pb.**

Los productos de digestión (Fig. 18) mostraron que solo 2 colonias de la cepa K599 captaron el plásmido pCAMsrDXS ya que liberan las bandas correspondientes al análisis *in silico* por lo que se puede comprobar que estas colonias están transformadas, mientras que las cepas LBA9402 y AR4 no captaron dicho plásmido, esto muy probable debido a que las células que se utilizaron para la electroporación no se encontraban en estado óptimo de competencia.

De esta manera, los experimentos subsecuentes de agrotransformación de *S. rebaudiana* se realizaron con la cepa K599 de *A. rhizogenes* que albergan el vector pCAMsrDXS, cepa que se denominó K599DXS.



**Figura 18. Productos de digestión del plásmido pCAMsrDXS con la enzima de restricción PstI provenientes de cepas de *A. rhizogenes*.** Carril 2 y 3: pCAMsrDXS en la cepa LBA9402 de *A. rhizogenes*, carril 4: pCAMsrDXS en la cepa AR4 de *A. rhizogenes*, carril 5 y 6 pCAMsrDXS en la cepa K599 de *A. rhizogenes*.

### 7.3 Agrotransformación de plántulas de *Stevia rebaudiana* con cepas silvestres

La generación y el cultivo de raíces transformadas son de gran importancia para la producción de productos naturales o metabolitos secundarios mediante *A. rhizogenes*, que fundamentalmente se trata la transferencia del T-ADN del plásmido *Ri* al genoma de la célula vegetal, en este estudio fue *S. rebaudiana*.

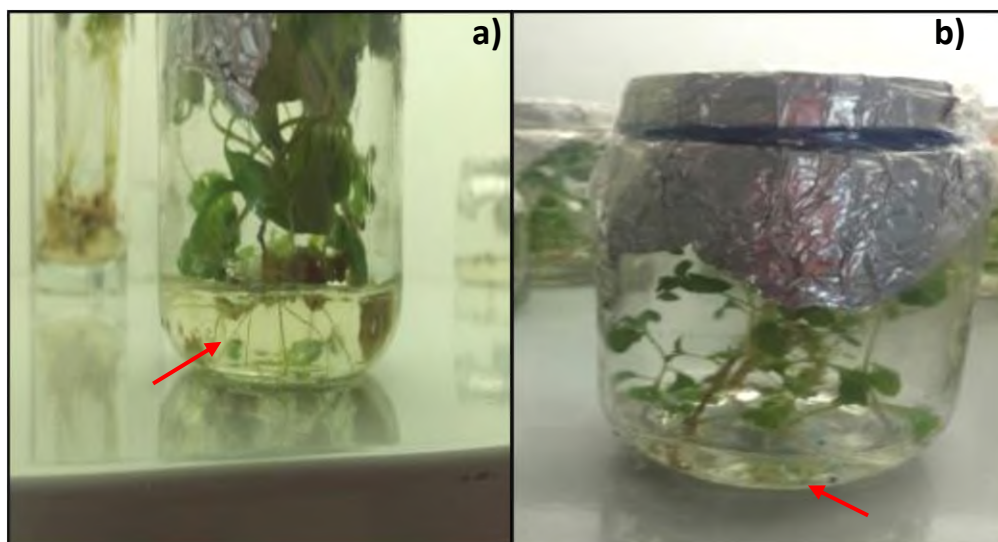
Así, se cocultivaron explantes con una cepa silvestre de *A. rhizogenes* que contenía aparte del plásmido *Ri* un vector binario con srDXS con la finalidad de aumentar la producción de GE, concretamente Esteviósido y Rebaudiósido A.

Es por ello que primeramente se evaluó el efecto de tres cepas de *A. rhizogenes* en plántulas e hipocótilos de *S. rebaudiana* para la obtención de raíces transformadas, así como también, la infección con *A. rhizogenes* con el plásmido pCAMBIA 1105.1, esto con la finalidad de establecer cultivos que sirvieran de referencia de los efectos sobre la producción de glucósidos ejercida por diferentes eventos de transformación.

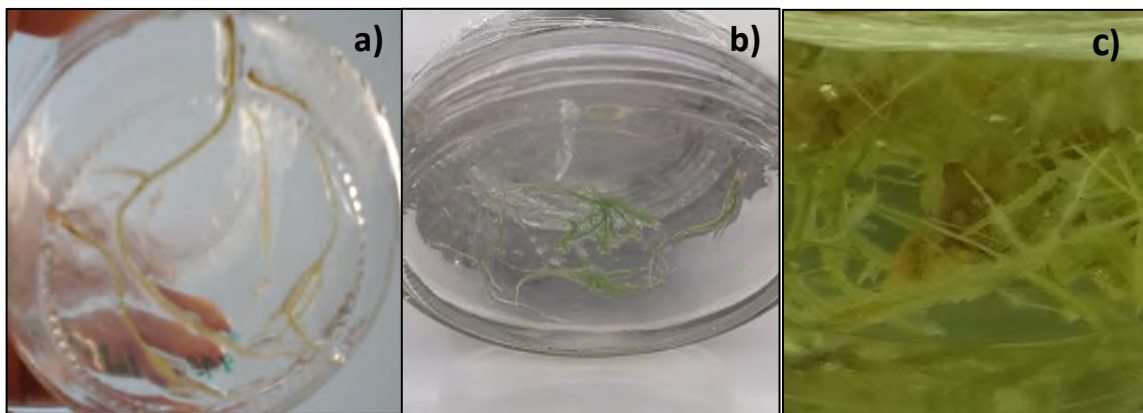
Como resultado de la primera parte de la agrotransformación con las cepas silvestres LBA9402, AR4 y K599, las plántulas e hipocótilos expuestos

desarrollaron raíces en los puntos de infección, presentando la mayor generación de raíces en plántulas infectadas con la cepa LBA9402 a los 7 días posteriores a la infección (Fig. 19), seguidamente de la cepa AR4 y K599, manifestando las características morfológicas típicas de las raíces transformadas como rápido crecimiento comparado con las raíces normales, gran ramificación y vellosidad abundante (Fig. 20), estas raíces en su momento se llamaron putativas antes de comprobar su transformación y se escindieron para propagarlas independientemente para mantener la homogeneidad genética de los cultivos que serían establecidos.

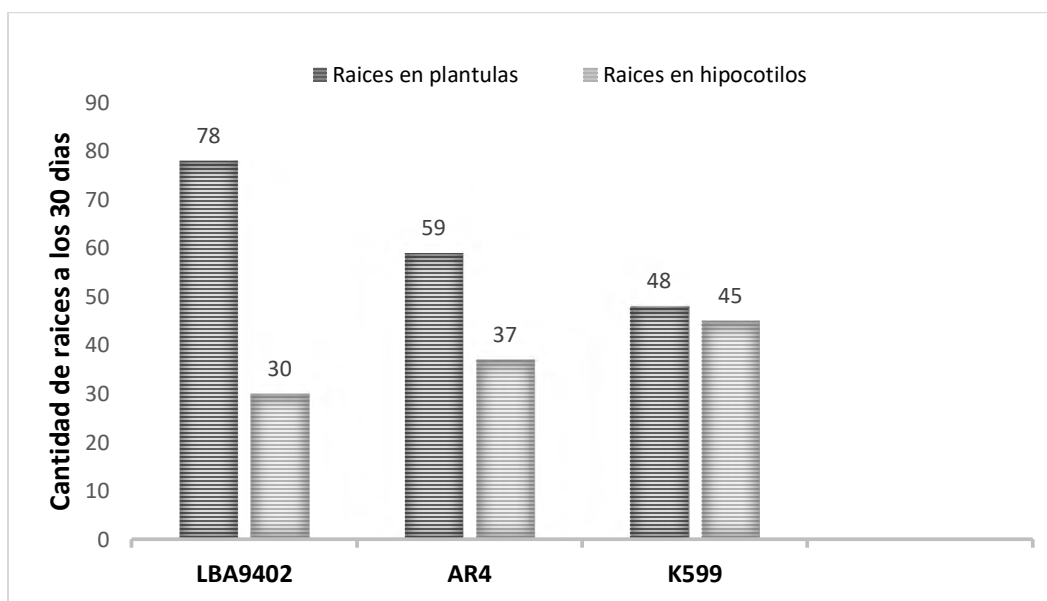
A los 30 días posteriores a la infección se realizaron los conteos totales de raíces emergidas independientemente por cepa y tipo de explante (Fig. 21), siendo las plántulas el tipo de material vegetal de partida que presentó mayor generación de raíces en todas las cepas y la cepa LBA9402 la que tuvo mayor virulencia hacia *S. rebaudiana*, es decir, la que indujo la mayor cantidad de raíces en menor tiempo.



**Figura 19: Raíces emergidas a los 7 días posterior a la infección.** a) Raíces emergidas en plántulas infectadas con la cepa LBA9402, b) raíces emergidas en hipocótilos infectados con la cepa LBA9402.



**Figura 20. Raíces putativas obtenidas por infección con cepas silvestres de *A. rhizogenes*** a) línea de raíces inducida con la cepa LBA9402 b) línea de raíces inducida con la cepa K599 c) línea de raíces inducida con la cepa AR4.



**Figura 21. Raíces en plántulas e hipocótilos a los 30 días posterior a la infección.**

Después del análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 15) considerando como factores al tipo de cepa y tipo de explante, se determinó que ambos factores influyeron significativamente en la inducción de raíces por lo que se infiere que la virulencia de *Agrobacterium rhizogenes* hacia *S. rebaudiana* depende del tipo de explante con el que se trabaja así como de la cepa, esto concuerda con las recomendaciones de Ko *et al.*, 2003. No obstante, las medias de inducción de

raíces fueron aceptables entre cada cepa, por lo que se concluyó que las tres cepas tienen una virulencia similar hacia *S. rebaudiana*. También se observó en otro análisis de varianza que incluyó al tiempo como factor que su efecto es significativo puesto que al pasar de los días se observa un incremento de raíces emergidas este efecto indica que la planta no despliega mecanismos para impedir la transformación, al menos en el período de tiempo evaluado, favoreciendo que esta especie no sea considerada recalcitrante a la transformación genética mediada por *Agrobacterium*.

**Tabla 15. Análisis de varianza del efecto del tipo de cepa y tipo de explante sobre la inducción de raíces usando cepas silvestres.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
<b>Tipo de cepa</b>	63.281	1	63.28125	20.754026	9.33666 E-05
<b>Tipo de explante</b>	47.531	1	47.53125	15.58858	0.000482687
<b>Interacción</b>	0.281	1	0.28125	0.0922401	0.763593848
<b>Error</b>	85.375	28	3.049107143		
<b>Total</b>	196.468	31			

Análisis realizado con  $\alpha = 0.05$  y  $n = 8$

En la literatura hay hasta el momento escasos estudios sobre la agrotransformación de *S. rebaudiana*, sin embargo se han encontrado resultados similares al de este trabajo en el estudio reportado por Michalec-Warzecha *et al.*, 2016 con respecto a *S. rebaudiana*, donde la mayor virulencia y eficiencia de transformación fue dada por la cepa LBA9402 sobre explantes de hojas en los cuales aparecieron raíces pilosas a los 13 días después de la infección tiempo semejante al reportado en este trabajo, no obstante con el protocolo actual se logró la inducción a los 7 días posterior a la infección, por lo que LBA9402 es una de las cepas silvestres de *A. rhizogenes* más virulentas hacia *S. rebaudiana* y cabe resaltar que para obtener mayor eficiencia de transformación es recomendable hacer uso de plántulas u hojas ya que hipocótilos o entrenudos en

lo que se recuperan por el estrés ocasionado por la bacteria tardan mayor tiempo en presentar la respuesta.

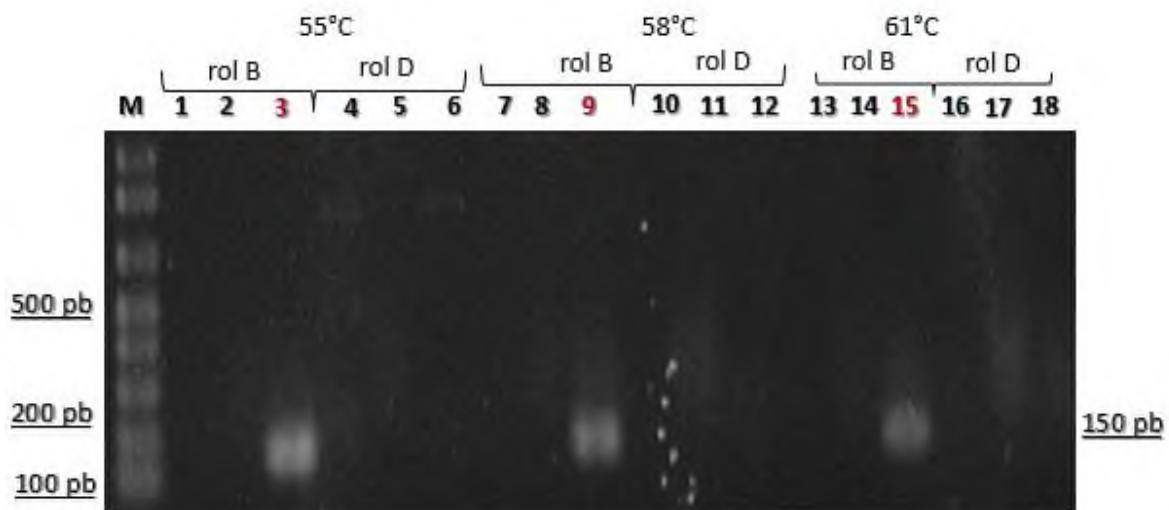
### **7.3.1 Verificación de la transformación de los cultivos de raíces inducidos con cepas silvestres de *A. rhizogenes***

Como se mencionó anteriormente, los genes *rol* están presentes en el plásmido *Ri* de *A. rhizogenes* y tienen gran importancia en la inducción de raíces transformadas, por lo que la presencia de estos genes suele ser utilizada como indicativo para confirmar la transformación. En este trabajo una vez que las raíces putativas crecieron independientemente y se contaba con suficiente biomasa, aproximadamente 200 mg, para la extracción de ADNg se procedió a confirmar la integración del T-ADN de *A. rhizogenes* por análisis de PCR.

En la Figura 22 se muestra un análisis de PCR de tres líneas establecidas, una con cada cepa, que sobrevivieron a los subcultivos y al estrés de ser escindidas del explante de donde fueron inducidas y se logró comprobar que solamente sobre DNAg proveniente de las raíces inducidas con la cepa AR4 (línea designada M5R4) se observó el amplificado esperado (150 pb) con los cebadores para el gen *roIB* en todas las temperaturas con el gradiente de temperaturas de alineamiento utilizados (55°C, 58°C y 61°C), aunque dicho gradiente no fue adecuado para la amplificación del fragmento del gen *roID*; no obstante la falta de amplificación de este último gen no fue restricción para confirmar estas raíces como transformadas, ya que se sabe que la amplificación del gen *roIB* es suficiente para validar la transformación del tejido, puesto que estos genes, junto con otros de la familia *rol*, son transferidos conjuntamente en el proceso de agrotransformación, por lo tanto la presencia de uno conlleva a la presencia de los demás.

Por otro lado las líneas inducidas con las cepas LBA9402 y K599 no amplificaron con ninguno de los cebadores antes mencionados evidenciando que no estaban transformadas, este resultado coincide con lo observado en el laboratorio posterior

a un mes de la infección, ya que dichas raíces no crecieron de una forma acelerada como lo hicieron las raíces de la línea M5R4 y eran susceptibles a estrés por corte al momento de los subcultivos en medio MS y consecuentemente perdían viabilidad, este resultado puede ser debido a que existen factores que intervienen en la transformación de plantas por *Agrobacterium* por lo que se debe de tener en cuenta la edad de la planta, tipo de tejido a transformar, tipo de cepa de *Agrobacterium* y sobre todo las condiciones de inoculación, el tipo de herida o el lugar de la infección y densidad de la bacteria (Salas *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2003).



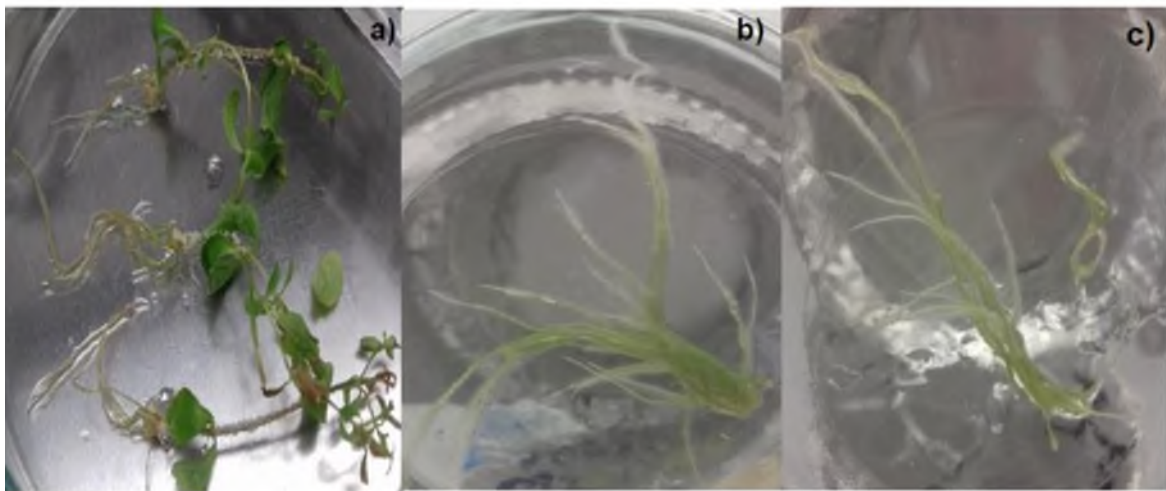
**Figura 22. Resultado de amplificación de los genes *rolB* y *D* por PCR sobre ADNg.** Los carriles 3, 9 y 15 muestran la banda de 150 pb esperada de la amplificación del gen *rolB* para todas las temperaturas del gradiente. Para cada condición de amplificación se cargaron secuencialmente mezclas de reacción provenientes de DNAg de raíces inducidas con LBA9402, K599 y AR4.

#### **7.4 Infección de plántulas con la cepa K599 albergando el vector pCAMBIA 1105.1 y el vector pCAMsrDXS**

Con lo observado anteriormente en la infección con cepas silvestres y notando que las plántulas fueron la mejor opción para inducir raíces putativamente transformadas, se siguió trabajando con el mismo protocolo, sin embargo en este caso se optó por la cepa K599 albergando el vector pCAMBIA 1105.1 (K599.1) ya que, como se observó previamente, *S. rebaudiana* fue susceptible a todas las

cepas a las que fue expuesta; además de que K599 fue la única cepa que captó dicho plásmido y se logró comprobar su integridad.

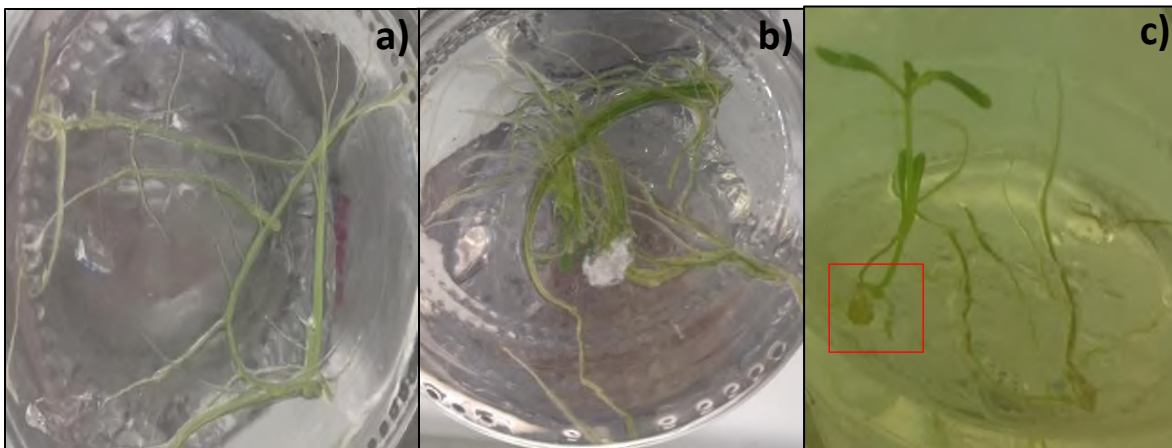
Es así como a los 6 días posteriores a la infección con la cepa K599.1 emergieron raíces en las plántulas infectadas, al cabo de 15 días se escindieron y se propagaron independientemente en medio semisólido MS adicionado con cefotaxima, estas raíces presentaban características típicas de las raíces transformadas como crecimiento acelerado comparado con las raíces no transformadas, vellosidad y ramificación abundante (Fig. 23). Al cabo de 30 días se tenían 26 raíces putativas creciendo independientemente, sin embargo solo 3 líneas (m2, m5 y m8) conservaron las características antes mencionadas; y la mayoría de las restantes no lograron sobrevivir a los subcultivos una vez escindidas del explante del que emergieron.



**Figura 23. Raíces putativas inducidas con la cepa K599.1** a) raíces escindidas a los diez días posteriores a la infección b) raíces propagadas independientemente en medio semisólido MS c) raíces con características típicas de las raíces transformadas.

Por otro lado, con respecto a la agrotransformación de plántulas de *S. rebaudiana* con K599DXS, a los 5 días posteriores a la infección se generaron raíces putativas y a los 10 días estas raíces presentaban las características típicas de las raíces transformadas como rápido crecimiento, gran ramificación y vellosidad abundante. Después de 30 días se contaba con 50 líneas de raíces creciendo

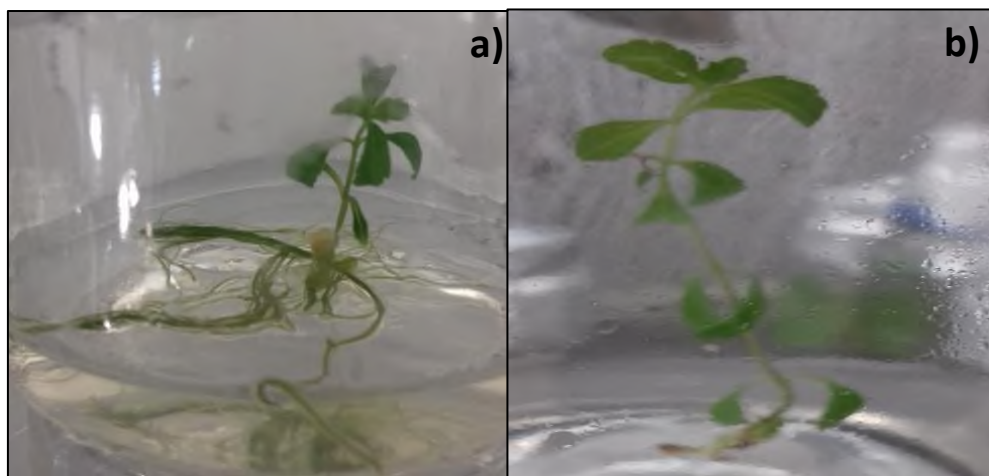
independientemente y 4 líneas (m1, m3, m5 y m7) conservaron dichas características; al igual que lo observado en la inducción de raíces con K599.1, la gran mayoría de estas líneas no pudieron mantenerse viables en el transcurso de los subcultivos denotando señales de estrés derivadas de la manipulación. No obstante, las raíces que sobrevivieron proliferaron y algunas de ellas desarrollaron callos en el meristemo apical y fueron de color verde intenso debido a que crecieron con luz que a su vez estimuló la producción de clorofila (Fig. 24).



**Figura 24. Líneas de raíces inducidas con la cepa K599DXS** a) raíces putativas a los cinco días posteriores a la infección b) A los diez días presentaban características típicas de raíces transformadas como rápido crecimiento, vellosidad abundante y ramificación c) generación de plántula a partir de raíces putativas a los diecisiete días, el cuadro rojo remarca el callo donde se formó dicha plántula.

La línea m7 de estas últimas raíces a diferencia de las obtenidas con las cepas silvestres y de la infección con K599.1; después de 17 días mostró respuesta de regeneración de parte aérea de la plántula con mayor vigor, crecimiento y otras características deseables como hojas más grandes y tallos más gruesos comparadas con las plántulas originales *in vitro* de las que se partió para la inducción de raíces. Todas las características antes mencionadas sin la necesidad del suplemento adicional de reguladores de crecimiento, dicha plántula presentó enraizamiento sin presencia de fitohormonas (Fig. 25), lo que permite tener en las raíces pilosas un punto de partida para la generación de plantas transgénicas completas. La regeneración de plantas completas a partir de raíces transformadas, se ha reportado con anterioridad y se teoriza que la integración del T-ADN,

presente en los plásmidos silvestres inductores de raíces (*Ri*) y en muchos vectores binarios, favorece la correcta diferenciación celular (David *et al.*, 1984) y frecuentemente sin la necesidad de la adición de reguladores de crecimiento vegetal, de acuerdo a lo observado en este estudio. Además de lo anterior, se han observado menor ocurrencia de fenotipos aberrantes frecuentemente observados en eventos de regeneración a partir de *A. tumefasciens* y otros procesos de mutagénesis química o física (Chen y Otten 2017). La regeneración de plántulas a partir de tejido transformado ha sido reportada recientemente aunque no con raíces transformadas como tejido de partida como en este trabajo, tal es el caso de Khan *et al.*, (2016) que reportaron la generación de brotes transformados de *S. rebaudiana* usando métodos de transformación física, como la radiación gamma y métodos de transformación química usando metanosulfonato de etilo, no obstante dicha regeneración de plántulas necesitó de la adición de 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de ácido  $\alpha$ -naftalén acético (NAA), a diferencia de lo observado en este trabajo. Otro caso fue el reportado por Mubarak *et al.*, (2015), que reportaron el desarrollo de brotes transformados a partir de tejido transformado Biobalística con mejores características fisiológicas que las plántulas no transformadas usadas como control; al igual que el reporte de Khan *et al.* (2014) requirieron de la adición de fitoreguladores de crecimiento (0.5 mg/L de BA) para lograr esta respuesta.

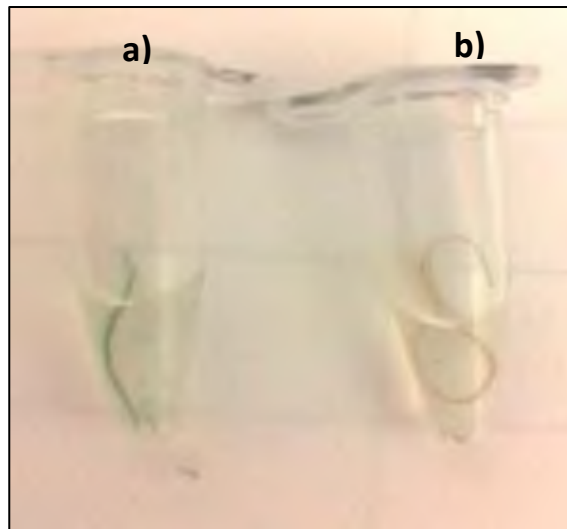


**Figura 25. Regeneración de plántula a partir de raíces putativas inducidas con K599DXS.**a) Plántula de *S. rebaudiana* creciendo a partir de callo en raíz putativa b) plántula creciendo independientemente después de 15 días de escindida del explante.

#### 7.4.1 Análisis de la expresión del gen reportero GUSPlus en raíces inducidas con K599.1 y K599DXS

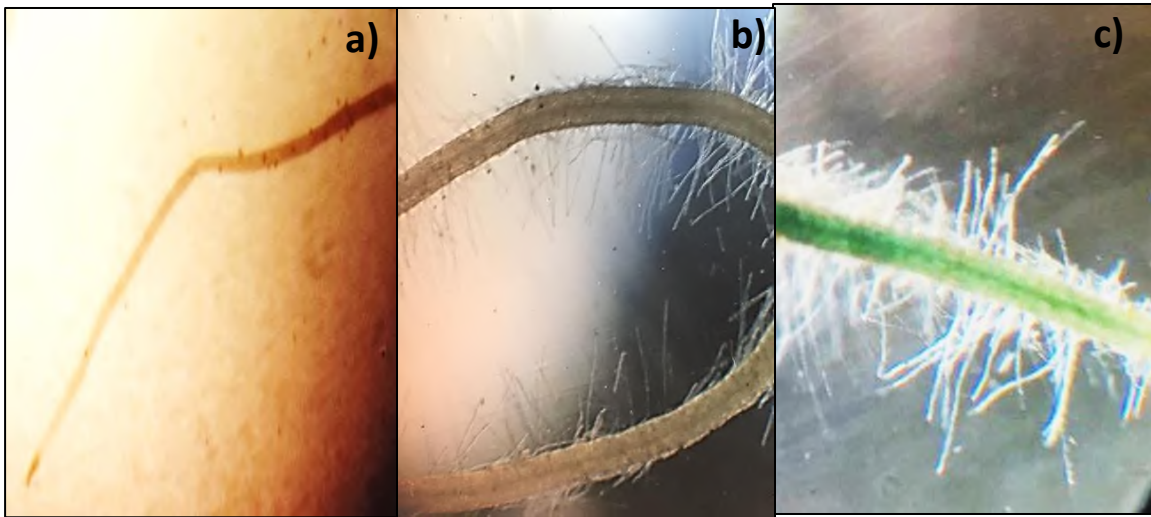
Con el fin de comprobar si las raíces inducidas con K599.1 y K599DXS estaban transformadas, primeramente, se evaluó la expresión del gen reportero GUSPlus codificante para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa y que está presente en ambos vectores.

Dicha expresión seguida a través de una tinción histoquímica usando como sustrato el compuesto X-Gluc que genera un precipitado azul en el sitio de actividad de la enzima. En la Figura 26 se muestra un ejemplo de contraste de expresión entre un explante de raíz transformado y uno no transformado proveniente de plántulas *in vitro*, estos cultivos fueron usados posteriormente como controles para los siguientes análisis provenientes de los cultivos putativos.



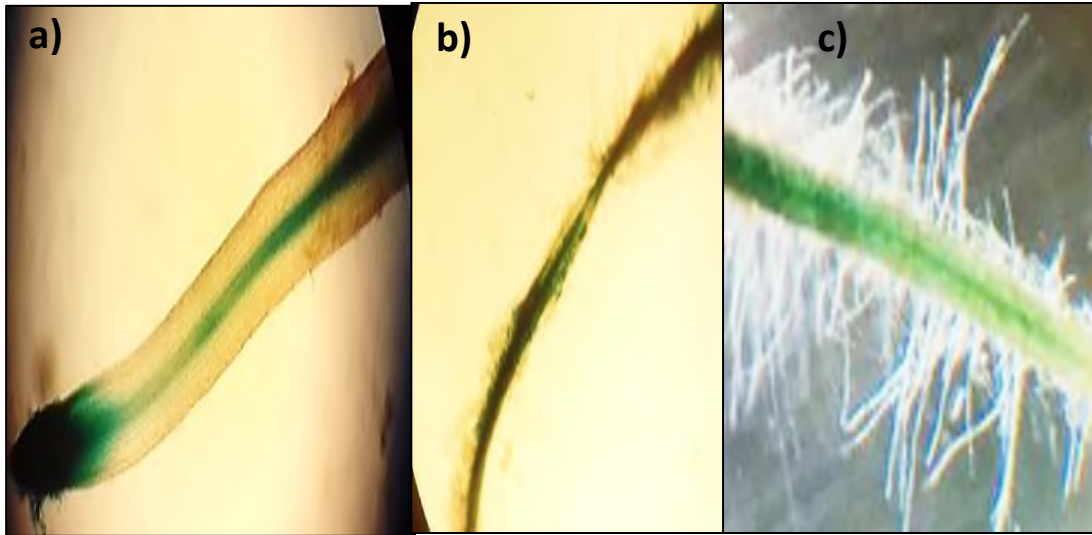
**Figura 26. Actividad enzimática de  $\beta$ -glucuronidasa a) explante transformado b) explante no transformado.**

Primeramente, derivado de la transformación con la cepa K599.1, se analizaron 3 líneas mencionadas anteriormente m2, m5 y m8. En la Figura 27c se muestra la única línea (m2) que expresó el gen GUSPlus a través de la coloración azul debida a la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa. Este resultado está contrastado con el obtenido de un cultivo de raíces normales o no transformadas (Fig. 27a) y un cultivo de raíces transformadas con cepas silvestres (Fig. 27b); ninguno de ellos posee el gen GUSPlus y no se observó la coloración.



**Figura 27. Análisis de expresión de  $\beta$ -glucuronidasa para confirmar la transformación con K599.1.** a) Raíz no transformada b) raíz transformada con *A. rhizogenes* silvestre y c) raíz transformada con la cepa K599.1.

Por otro lado, con la actividad enzimática de  $\beta$ -glucuronidasa en raíces inducidas con la cepa K599DXS, se comprobó la transformación de 3 de las 4 líneas establecidas con anterioridad (m1, m3 y m7) (Fig. 28). Así, considerando que srDXS se colocó en medio de 35S y la secuencia del gen GUSPlus se puede concluir que estas células expresan a srDXS, observando una expresión estable en haz vascular, meristemo apical y uniforme en el tejido analizado, esto demostró adicionalmente la homogeneidad de la transformación en las células que integran el tejido.



**Figura 28. Análisis de expresión de  $\beta$ -glucuronidasa para confirmar la transformación con K599DXS. a) Línea m1, b) m3 y c) m7.**

Por otra parte, se evaluó la expresión del gen GUSPlus en la línea de plántulas (Fig. 29) regeneradas a partir de una de las raíces transformadas con K599DXS que mostró la coloración azul característica de la actividad enzimática del reportero, lo cual indica que efectivamente se trató de una plántula transformada. Esta línea se propagó y se mantuvo para estudios posteriores a nivel de plántulas completas.

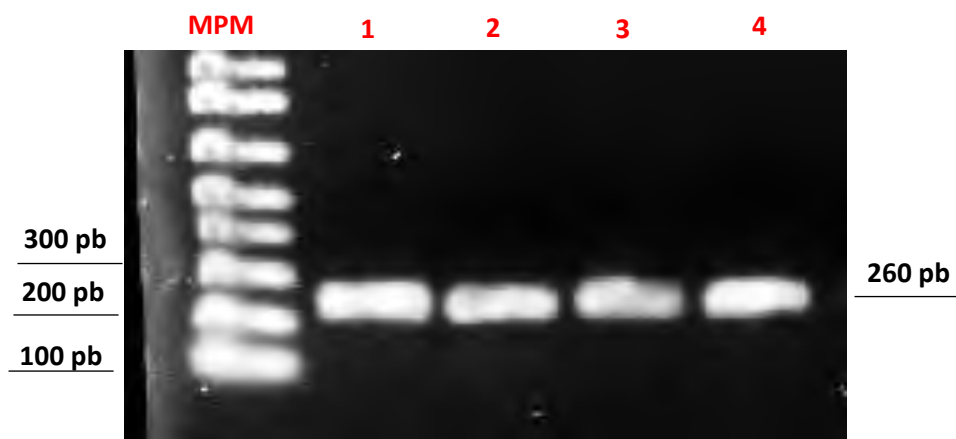


**Figura 29. Análisis de expresión de  $\beta$ -glucuronidasa sobre explantes de hoja de la línea de plántulas regeneradas de raíces transformadas de m1srDXS. a) y b) análisis de expresión del gen GUSPlus en diferentes iluminaciones. Las flechas indican la coloración azul más intensa.**

#### 7.4.2 Verificación de la transformación de las raíces inducidas con las cepas K599.1 y K599DXS por PCR

Para obtener mayor evidencia de transformación de los pasados cultivos, aquellos que expresaron el gen reportero GUSPlus se les extrajo ADN genómico y se procedió a la verificación vía PCR; amplificando para el caso de la cepa K599.1 un fragmento del promotor 35S, mientras que para la cepa K599DXS un fragmento de la secuencia srDXS. Para ambos análisis de expresión se realizó un gradiente de temperaturas de alineamiento a 60°C, 62°C, 64°C y 66°C.

Primeramente, para las amplificaciones provenientes de la línea establecida con la cepa K599.1, se observa en la Figura 30 que el amplicón de 260 pb esperado estuvo presente en las cuatro temperaturas de alineamiento usadas indicando la presencia del promotor 35S en el genoma de la línea m2, confirmando así la transformación del tejido esta vez por PCR.



**Figura 30. Amplificación del fragmento 35S en ADNg de raíces inducidas por la cepa K599.1 Carril 1: línea m2 a 60°C Carril 2: línea m2 a 62°C Carril 3: línea m2 a 64°C y Carril 4: línea m2 a 66°C.**

En el caso de los análisis de amplificación a partir del ADN genómico de las líneas inducidas con la cepa K599DXS, las tres líneas de raíces amplificaron el fragmento esperado de 162 pb, indicando su transformación (Fig. 31). Cabe

mencionar que los iniciadores utilizados fueron diseñados para que solo amplificaran la secuencia modificada y no la endógena de la planta.

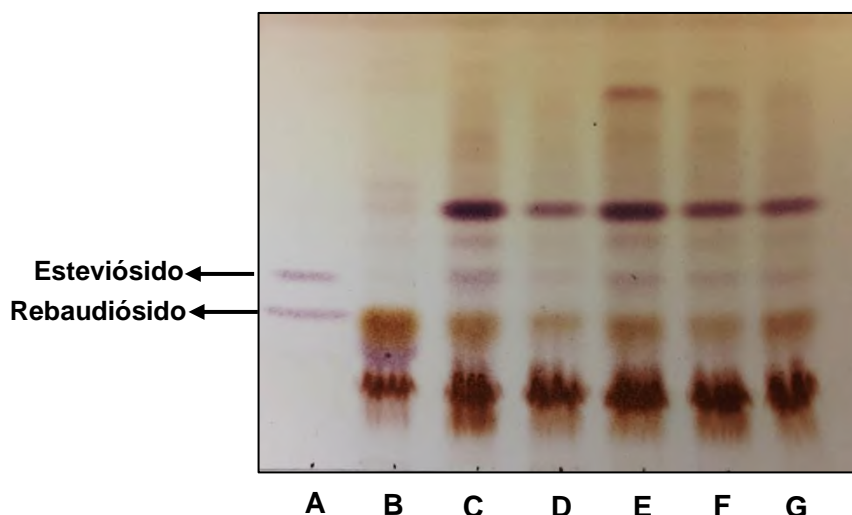


**Figura 31. Amplificación del fragmento srDXS en ADNg de raíces inducidas con K599DXS. Carril 1: línea m1 Carril 2: línea m3 Carril 3: línea m7**

### 7.5 Producción de GE en los diferentes cultivos de raíces por TLC

Los cultivos de raíces establecidos y cuya transformación se confirmó anteriormente fueron comparados en términos de su capacidad para producir y acumular GE. Los cultivos analizados fueron las raíces no transformadas (NT), raíces transformadas línea m5 obtenidas de la infección de plántulas con la cepa silvestre AR4 (M5R4), raíces transformadas línea m2 con K599.1 plásmido vacío (M2PV) y raíces transformadas con K599DXS (M1sDXS, M2sDXS y M7sDXS).

En la Figura 32 se observa la separación por TLC (sílica gel 60 F<sub>254</sub>) con cantidad normalizada de los extractos correspondientes a los cultivos anteriormente mencionados y que muestra los perfiles típicos obtenidos de compuestos glucosidados en estos extractos después de 30 días de crecimiento en condiciones homogéneas. De manera general se puede observar que los extractos provenientes de todos los cultivos revelan bandas a lo largo de cada carril desde las tonalidades moradas a las cafés típicas de la reacción de compuestos glucosidados con el compuesto revelador orcinol. De manera particular, en todos los carriles se logran definir bandas de los glucósidos de referencia, es decir, el esteviósido y rebaudiósido A, con RFs 0.43 y 0.34 respectivamente, aunque con intensidades diferentes.



**Figura 32. Cromatografía en capa fina de los diferentes extractos de GE. Carril A:** Estándares de esteviósido (Est) y rebaudiósido A (Reb A), **Carril B:** extracto de raíces no transformadas (NT), **Carril C:** extracto de raíces M5R4 control de agrotransformación, **Carril D:** extracto de raíces vector vacío, **Carril E:** extracto de raíces M1sDXS, **Carril F:** extracto de raíces M2sDXS y **Carril G:** extracto de raíces M7sDXS

De acuerdo a lo reportado por Morlock *et al.*, (2014), reportan un perfil detallado de GE en formulados de *Stevia*, las bandas que se observaron más intensamente sobre la banda identificada como Est, en la figura 32, podrían ser rebaudiósido B (Reb B) y dulcósido A (Dulc A) respectivamente, con RFs 0.5 y 0.6 que fueron similares a los determinados en este trabajo para las bandas hipotéticas de estos compuestos Reb B RFs 0.54 y Dulc A 0.62

Por otro lado, en los extractos provenientes de raíces no transformadas, el esteviósido se logra detectar con una banda muy tenue lo que indica una baja concentración comparada con los otros cultivos de raíces, especialmente contra el cultivo M5R4 y el M1sDXS donde se observan las bandas más intensas, por lo que cualitativamente se observa que estos últimos cultivos producen mayor cantidad de esteviósido.

Para el caso de la banda del rebaudiósido A, esta se ve interferida probablemente por la presencia de aductos glucosilados (observados como bandas o manchas marrones) presentes en todos los extractos y debe e interfiere con la determinación de la intensidad de banda del rebA, por lo que los resultados

semicuantitativos de este compuesto deben examinarse considerando este efecto y en estudios posteriores optar por técnicas cuantitativas como HPLC.

La intensidad de las bandas en la Figura 32 fue analizada mediante el software GelAnalyzer y correlacionándola con una curva patrón (Anexo 3) de los compuestos de referencia que permitió la determinación semicuantitativa de la producción (Tabla 16) y la productividad (Tabla 17) de GE en los diferentes tipos de cultivos de raíces. Así los análisis de varianza mostraron que el efecto del tipo de cultivo de raíces o, en otras palabras, el evento de transformación que las originó tuvo efecto significativo en la producción y productividad de GE (Anexo 1).

**Tabla 16. Producción de esteviósido y rebaudiósido A en los diferentes extractos de raíces de la figura 31 después de 30 días.**

<b>Tipo de cultivo</b>	<b>Esteviósido (mg/gPF)</b>	<b>Rebaudiósido A (mg/gPF)</b>
<b>NT</b>	<0.01 <sup>e</sup>	50.60 ± 6.07 <sup>d'</sup>
<b>M5R4</b>	108.63 ± 13.03 <sup>a</sup>	549.71 ± 60.46 <sup>b'</sup>
<b>M2PV</b>	24.6 ± 2.70 <sup>c,d</sup>	291.14 ± 34.93 <sup>c'</sup>
<b>M1sDXS</b>	93.07 ± 11.16 <sup>a</sup>	368.99 ± 40.58 <sup>c'</sup>
<b>M2sDXS</b>	69.21 ± 7.61 <sup>b</sup>	302.26 ± 36.27 <sup>c'</sup>
<b>M7sDXS</b>	14.23 ± 1.70 <sup>d</sup>	716.53 ± 78.81 <sup>a'</sup>

**Las letras indican diferencia significativa entre las medias en una prueba de Tukey con P<0.05**

Los datos calculados y utilizados para realizar los mencionados análisis de varianza y después de un análisis de comparación múltiple de medias de Tukey indican que las raíces transformadas de las líneas M5R4 y M1sDXS acumulan la mayor cantidad de esteviósido, mientras que para el caso de RebA fueron las líneas M5R4 y M7sDXS las que tuvieron la mayor producción. Cabe hacer la mención que los aumentos en producción de Est fueron altamente significativos si se toma en cuenta que en el caso de las raíces no transformadas la banda no alcanzó los límites de detección de la técnica. Reis *et al.*, (2011) tuvieron similares utilizando cultivos de raíces adventicias (no transformadas) de *S. rebaudiana*, en

los cuales, de igual manera, no lograron detectar esteviósido. Yamazaky *et al.*, (1991), en uno de los primeros estudios sobre la producción de GE en raíces transformados de *Stevia* tampoco encontraron GE en cultivos de raíces incubados en oscuridad, que tenían una coloración amarilla/blanca a diferencia de la tonalidad verde observada en este estudio.

**Tabla. 17 Productividad de esteviósido y rebaudiósido A en los diferentes extractos de raíces de la figura 31.**

Tipo de cultivo	Esteviósido (mg/gPF*día)	Rebaudiósido A (mg/gPF*día)
NT	1.04 ± 0.11 <sup>c</sup>	1.68 ± 0.20 <sup>d</sup>
M5R4	3.62 ± 0.43 <sup>a</sup>	18.32 ± 2.01 <sup>b</sup>
M2PV	0.82 ± 0.09 <sup>c,d</sup>	9.70 ± 1.16 <sup>c</sup>
M1sDXS	3.10 ± 0.37 <sup>a</sup>	12.29 ± 1.35 <sup>c</sup>
M2sDXS	2.30 ± 0.25 <sup>b</sup>	10.07 ± 1.20 <sup>c</sup>
M7sDXS	0.47 ± 0.05 <sup>d</sup>	23.88 ± 2.62 <sup>a</sup>

Las letras indican diferencia significativa entre las medias en una prueba de Tukey con P<0.05

En términos de la productividad, para el caso del Est las líneas M5R4 y M1sDXS fueron las que obtuvieron los valores más altos, y las líneas M5R4 y M7sDXS exhibieron las mejores productividades de RebA; cabe mencionar que fueron los mismos patrones observados en productividad.

Las raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* han sido estudiadas por otros autores como Abdy *et al.*, (2016) y Pandey *et al.*, (2016); y también detectaron GE, aunque no cuantificaron o semicuantificaron los contenidos; pero apoyan la suposición de que los cultivos de raíces transformadas de *S. rebaudiana* son capaces de producir GE en mayor cantidad que sus contrapartes no transformadas.

Los tres tipos de cultivos transformados que se establecieron teóricamente permitirían aislar el efecto de la sobreexpresión de srDXS del efecto de la

inserción de los genes *rol* y del ADN-T del vector binario pCAMBIA1105.1, de esta manera se esperaba que las raíces que sobreexpresaban srDXS acumularan mayor contenido de esteviósido y rebaudiósido A comparadas con las otras raíces transformadas, sin embargo, se observó que se comportan de manera similar, particularmente la línea M1sDXS, al cultivo transformado con cepa silvestre M5R4 que no sobreexpresa DXS pero que si tiene los genes *rol*. El cultivo M2PV tuvo valores de acumulación de GE por debajo de los observados en los otros cultivos mencionados sugiriendo que la inserción del T-ADN del vector binario *vacío* no tuvo un efecto potenciador por sí mismo en este particular evento de transformación. Sin embargo, cabe mencionar, que todos los cultivos transformados tuvieron significativamente mejor producción y productividad que los cultivos de raíces normales, lo que soporta el efecto positivo de la transformación genética mediada por *A. rhizogenes* en la producción de metabolitos secundarios, que de acuerdo a lo reportado por Murthy *et al.*, (2014) dicha producción aumentada en cultivos de raíces transformadas es afectada por la incorporación de los genes presentes en el T-ADN al genoma del hospedero y el tamaño o nivel de ploidía del genoma de las células a las que se incorpora.

Si bien el efecto de la sobreexpresión de srDXS no se pudo ver directamente relacionado con el aumento de la producción y productividad de GE, debido a la similitud estadística entre el cultivo M5R4 y el cultivo M7sDXS, dicha sobre expresión pudo haber beneficiado a la ruta de biosíntesis de las giberelinas, recordando que la hidroxilación del ácido *ent*-kaurenóico en la posición C13 es el punto de divergencia para la síntesis del esteviol y las giberelinas (Brandle 1998). No obstante, en otros trabajos la sobreexpresión de la enzima DXS se ha encontrado correlación directa con el aumento de metabolitos secundarios derivados de los precursores que produce, tal es el caso de lo reportado por Quevedo *et al.*, (2010), que obtuvieron un aumento de la producción de antraquinona (AQ) por la sobreexpresión de la 1-desoxi-D-xilulosa- 5-fosfato sintasa de *Catharanthus roseus* en cultivos de células transgénicas en suspensión de *Morinda citrifolia*, esta línea celular aumentó la producción de AQ en aproximadamente un 24% en comparación con la línea celular de control.

Battilana *et al.*, (2011) en el sistema de *Vitis vinifera* derivado de la sobreexpresión de una DXS modificada, con la mutación implementada en este estudio K284N, también encontraron una correlación positiva con la acumulación de monoterpenos relacionados con el aroma del fruto y sugirieron que adicionalmente al efecto de sobreexpresión; la modificación realizada a la secuencia influyó la actividad catalítica de la enzima al aumentar su eficiencia. Si solo se considera la comparación entre la producción de Est en los presentes cultivos de raíces no transformadas y la línea M1sDXS el efecto de la sobreexpresión podría estar aumentando dicha producción más de 9,000 veces.

Otro aspecto interesante sobre el posible papel regulador de DXS en la síntesis de GE y otros compuestos es discutido por Kim *et al.*, (2015) que encontraron cuatro genes o variantes codificantes de DXS en *Stevia rebaudiana* designados como SrDXS1-SrDXS4 que aparentemente tienen diferentes papeles regulatorios, destacando que SrDXS4 era la única secuencia reportada de esta enzima para *S. rebaudiana* por Totté en 2003. Los autores argumentan que el producto de SrDXS1 puede estar involucrado en el metabolismo primario dado que pertenece al clado DXS1 de la clasificación de las enzimas DXS, mientras que SrDXS2 y SrDXS4 probablemente están relacionados con el metabolismo secundario dado su pertenencia al clado DXS2. Dada la disponibilidad de secuencias durante el arranque de este estudio la secuencia nativa utilizada muy probablemente fue análoga a SrDXS4 puede explicar que la sobreexpresión de srDXS haya dirigido su efecto regulatorio a la biosíntesis de diterpenoides de ácido giberélico (GA) que es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas más que a potenciar directamente la producción de GEs, como lo soporta la similitud de la producción entre el cultivos M1sDXS y los transformados con el plásmido inductor de raíces silvestre solamente. El efecto en la producción de giberelinas pudo haber sido también el responsable de la regeneración espontánea y el fenotipo de las plántulas transgénicas (hojas más grandes y verdes, tallo grueso y posiblemente mayor acumulación de GE en sus hojas) mostradas anteriormente. Por otra parte, en el análisis de la separación cromatográfica en capa fina de extractos de GE (Fig. 33), específicamente los extractos provenientes de raíces

transformadas M5R4, M2PV, M1sDXS, M2sDXS y M7sDXS denotan una banda muy intensa con Rf de 0.427, que debido a la coloración que desarrolló, puede ser otro tipo de glucósido, ya que *Stevia rebaudiana* produce no solo un grupo de glucósidos diterpenoides, sino también otros diterpenoides de tipo labdano, por lo que resulta interesante en estudios posteriores analizar e identificar de qué tipo de posibles diterpenoides se trata y las posibles aplicaciones.

## 8. Conclusiones

Se logró el establecimiento de un protocolo de transformación, reproducible, de *Stevia rebaudiana* mediada por *A. rhizogenes* con las cepa silvestres LBA9402, AR4 y K599 y las cepas transformadas K599.1 y K599DXS.

La secuencia modificada srDXS, fue optimizada cuyo uso codónico se mejoró significativamente a pesar de partir de una secuencia endógena de DXS.

Se establecieron cinco diferentes tipos de cultivos de raíces de *S. rebaudiana*, cuya transformación fue confirmada por PCR y expresión del gen reportero GUSPlus, que permitieron aislar estudiar los efectos de diferentes eventos de transformación en la producción y productividad de GE.

Basados en la determinación semicuantitativa de GE en los diferentes tipos de cultivo, las raíces transformadas de la línea M5R4 y M1sDXS acumulan la mayor cantidad de Est y son significativamente similares; aunque la mayor cantidad de RebA la acumuló la línea M7sDXS.

El efecto regulador que se esperaba ver de la sobreexpresión de srDXS hasta el momento puede relacionarse más con la mejora de las características fenotípicas de los cultivos de raíces que con el aumento de producción de GE, lo que sugiere otros mecanismos regulatorios sobre la enzima DXS además de la sobreexpresión.

## 9. Sugerencias y perspectivas

Evaluar la actividad enzimática de DXS en los diferentes cultivos establecidos para poder determinar concretamente el efecto de la modificación aminoacídica en la secuencia modificada de DXS sobre su actividad enzimática y eficiencia catalítica.

Determinar los niveles de expresión de la DXS endógena y modificada en los cultivos establecidos para validar la sobreexpresión y sus efectos.

Generar un protocolo de regeneración de plántulas reproducible, a partir de raíces transformadas para contar con un sistema más amigable para la extracción de GE en las cantidades necesarias para la cuantificación por métodos analíticos

Evaluar el crecimiento de estos cultivos transformados en diferentes condiciones experimentales para mejorar la producción de GE y determinar sus parámetros cinéticos.

Utilizar el vector de binario pCAMsrDXS en la transformación de otras especies vegetales y estudiar su efecto en la producción de metabolitos secundarios, particularmente los terpenoides.

## 10. Bibliografía

**Abdy I., Morteza M., Mansour O. (2016).** Production of stevioside by hairy root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Sh. Veheshti University, international, congress Center, Tehran I. R of Iran.

**Aranda-González, I., Segura-Campos, M., Moguel-Ordoñez, Y., & Betancur-Ancona, D. (2013).** *Stevia rebaudiana* Bertoni. Un potencial adyuvante en el tratamiento de la diabetes mellitus. *CyTA- Journal of Food*, 12(3): 218–226. doi:10.1080/19476337.2013.830150

**Anton, S.; Martin, C.; Han, H.; Coulon, S.; Cefalu, W.; Geiselman, P. (2010).** Effects of *Stevia*, aspartame, and sucrose on food intake, satiety and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite* 55: 37–43.

**Arias, Mario, Aguirre, Ana, Angarita, Mónica, Montoya, Carolina, y Restrepo, Juan. (2009).** Aspectos del cultivo ingenieriles *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna*, 76 (157), 109-121.

**Battilana, J., Emanuelli, F., Gambino, G., Gribaudo, I., Gasperi, F., Boss, PK, y Grando, MS (2011).** Efecto funcional de la vid 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa sustitución K284N en la formación de sabor moscatel. *Revista de Botánica Experimental*, 62 (15), 5497 a 5.508.

**Bayraktar, M., Naziri, E., Akgun, IH et al. Plant Cell Tiss Organ Cult (2016) 127:** 289. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1049-7>

**Blanco M., Valverde R., Gómez L. (2004).** Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense* 27(1): 19-28.

**BRANDLE J. *Stevia rebaudiana*: Its Agricultural, Biological, and Chemical Properties (1998);**Can J Plant Sci. 78(4):527-536.

**Brandle J, Richman A, Swanson A, Chapman B. (2002)** Leaf ESTs From *Stevia rebaudiana*: A Resource for Gene Discovery in Diterpene Synthesis. *Plant Mol Biol.*; 50:613-622.

**Bondarev, N.I., O.V. Reshetnyak y A.M. Nosov. 2001.** Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Sci.* 161: 155-163.

**Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodríguez-Concepción M, Ferrer A, Boronat A, Campos N. (2002).** Expresión y análisis molecular de la Arabidopsis *DXR* gen que codifica reductoisomerasa 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato, la primera enzima comprometido de la 2- *C-metil-D-eritritol vía 4-fosfato*. *Plant Physiol* 129: 1581 a 1591.

**Calva, G., & Pérez, J. (2005).** Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1-16.

**Córdoba E, Salmi M, León P. (2009).** Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *J Exp Bot* 60:2933-43.

**Chen, K., y Otten, L. (2017).** Transformantes naturales de *Agrobacterium*: resultados recientes y algunas consideraciones teóricas. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1600. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.01600>.

**David, C., Chilton, M.D., & Tempe, J. (1984).** Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. *Nat Biotechnol*, 2, 73-76.

**Estévez, J.M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S. and León (2001).** 1-Deoxy-D-xylulose-5 Phosphate syntase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J Biol Chem*, 276: 22901-22909.

**EI JECFA (Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios) Compendio de especificaciones para aditivos alimentarios. (2008).** (Monografía 5. glucósidos de esteviol). [Http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/details.html?id=898](http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/details.html?id=898).

**Garcia E., Ramos .E. G., Gómez O. y Calva G. (2013).** MALDI-TOF Characterization of hGH1 Produced by Hairy Root Cultures of *Brassica oleracea* var. italica Grown in an Airlift with Mesh Bioreactor. *American Institute of Chemical Engineers* 30:161–171.

**Gershenzon J, Croteau R. (1993).** Terpenoid biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. En: T. S. Moore., ed. *Lipid metabolism in plants*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, Estados Unidos de América: p. 340-388.

**Gertrud E. Morlock, Stephanie Meyer, Benno F. Zimmermann, Jean-Marc Roussel, (2014).** High performance thin-layer chromatography analysis of steviol glycosides in Stevia formulations and sugar-free food products, and benchmarking with (ultra) high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1350:102-111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.016>.

**Goldstein J. L., Marrón EM (1990)** Reglamento del mevalonato vía. *Naturaleza*; 343: 425 – 430.

**Goyal, S.; Samsher; Goyal, R. 2010.** Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 61: 1–10.

**Gustafsson Claes., Govindarajan Sridhar, Minshull Jeremy (2004).** Desviación del codón y expresión de proteína heteróloga. *Trends in Biotechnology*. **22: 346-353.**

**Hemmerlin, A., J. L. Harwood, y T. J. Bach. 2012.** "A Reason D'etre for Two Distinct Pathways in the Early Steps of Plant Isoprenoid Biosynthesis?" *Prog Lipid Res* 51, no. 2 (Apr): 95-148. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.001>.

**Jarma A. (2008).** Estudios de adaptación y manejo integrado de *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. *Rev Colomb Cienc Hortic.*; 2(1):109-120.

**Jefferson R. (1987)** Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep*. 5(4):387-405.

**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.

**Kim K, Sawa y, Shibata H. (1996)** Hydroxylation of ent-Kaurenoic Acid to Steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni-Purification and Partial Characterization of the Enzyme. *Archiv Biochem Biophys.*; 332(2):223-230.

**Kim, M. J., Jin, J., Zheng, J., Wong, L., Chua, N.-H., & Jang, I.-C. (2015).** Comparative Transcriptomics Unravel Biochemical Specialization of Leaf Tissues of *Stevia* for Diterpenoid Production. *Plant Physiology*, 169(4), 2462–2480. <http://doi.org/10.1104/pp.15.01353>.

**Ko, TS., Lee, S., Krasnyanski, S. y col. Theor Appl Genet (2003)** 107: 439. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1264-6>.

**Lailerd, N.; Saengsirisuwan, V.; Sloniger, J.; Toskulkao, C.; Henriksen, E. (2004).** Effects of stevioside on glucose transport activity in insulin-sensitive and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Metabolism* 53: 101–107.

**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: p. 1121–1132.

**Lichtenthaler H. (1999)** The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*; 50:47-65.

**Li X, Li S, Lang Z, Zhang J, Zhu L, Huang D. (2013).** Chloroplast-targeted expression of the codon-optimized truncated cry1Ah gene in transgenic tobacco confers a high level of protection against insects. *Plant Cell Reports* 32(8):1299-1308.

**López, E. G., Guzmán, O. G., Ramos-Ramírez, E. G., Ariza-Castolo, A., Pérez-Vargas, J., & Calva, G. C. (2010).** Expresión de la hormona de crecimiento humano en cultivos de raíces aéreas de *Brassica oleracea* var. *italica*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, 1-5.

**Mendoza VM. (2003).** Aspectos psicosociales de las enfermedades crónicas en la vejez. In: Salgado N y, Wong R., editors. *Envejeciendo en la pobreza*. México: Instituto nacional de Salud Pública.

**Montes-Palmeros., Alvarado-Orea., Pavón-Orozco., García-López., Huerta-Heredia. (2016).** Steviol glucosides production in micropropagated seedlings of *Stevia rebaudiana* elicited with methyl jasmonate. *Mexican Journal of Biotechnology*, 1(1):113-119.

**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.

**Murashige T., Skoog F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 31:129-139.

**Murthy NH., Lee EJ., Paek KY (2014).** Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 118:1–16.

**Orozco, A. J., Camacho, M. E., y Fischer, G. (2010).** Síntesis de esteviósidos en *Stevia (Stevia rebaudiana bert.)*. *Acta biológica colombiana*, 15(1), 263-267.

**Ono NN, Tian L. (2011)** La multiplicidad de cultivos de raíces peludas: posibilidades prolíficas . *Plant Sci* 180 : 439-446.

**Pal, P. K., Kumar, R., Guleria, V., Mahajan, M., Prasad, R., Pathania, V. Ahuja, P. S. (2015).** Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC Plant Biology*, 15, 67. <http://doi.org/10.1186/s12870-015-0457-x>.

**Pandey H, Pandey P, Pandey SS, 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 Tiss Organ Cult*. 126:511–52.

**Quevedo, C., Perassolo, M., Alechine, E. y col. Biotechnol Lett (2010)** 32: 997. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0250-8>.

**Reis R., Borges A., Chierrito T., Souto E., et al. (2011).** Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*, 106, 329-335.

**Royal Academy of Engineering: Synthetic Biology (2009):** Scope, applications and implications. Report. Available [http://www.raeng.org.uk/news/publications/list/reports/Synthetic\\_biology.pdf](http://www.raeng.org.uk/news/publications/list/reports/Synthetic_biology.pdf) (Abril, 2015).

**Ruiz-Ruiz, JC, Moguel-Ordoñez, YB, y Segura-Campos, MR (2015).** Actividad biológica de *Stevia rebaudiana* Bertoni y su relación con la salud. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (12), 2680-2690. Doi: 10.1080 / 10408398.2015.1072083

**Salvador-Reyes, Rebeca; Sotelo-Herrera, Medali; Paucar-Menacho, Luz (2014).** Estudio de la *Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni)* como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. *Scientia Agropecuaria*, Trujillo, v. 5, n. 3. 157-163.

**Salas, M., Park, S., Srivatanakul, M. et al. Plant Cell Rep (2001)** 20: 701. <https://doi.org/10.1007/s002990100374>.

**Sundaresan V, Springer P, Volpe T, Haward S, Jones JD, Dean C, Ma H, Martienssen R. (1995)** Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev*. 9(14):1797-810.

**Sudesh Kumar Yadav y Praveen Guleria (2012)** Steviol Glycosides de *Stevia*: Biosynthesis Pathway Review y su aplicación en Alimentos y Medicina, *Críticas Críticas en Ciencia de los Alimentos y Nutrición*, 52:11, 988-998, DOI: [10.1080 / 10408398.2010.519447](https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519447).

**Sharp, PM, y Li, WH (1987).** El índice de adaptación del codón: una medida del uso del codón sinónimo direccional y sus posibles aplicaciones. *Nucleic Acids Research* , 15 (3), 1281-1295.

**Totté N, Charon I, Rohmer M, Compennolle F, Baboeuf I, Geuns J. (2000)** Biosynthesis of the Diterpenoid Steviol, an Entkaurene Derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, Via the Methylerythritol Phosphate Pathway. *Tetrahedron Lett.* 41:6407-6410.

**Twyman R. (2004).** Systems and Expression Strategies for Molecular Farming. Host Plants. Rainer Fischer y Stephan Schillberg (eds) *Molecular Farming*. 191-216

**Tzfira T, Li J, Lacroix B, Citovsky V (2004).** *Agrobacterium* T-ADN integration: molecules and models. *Trends Genet*, 20:375-383.

**Vranová E., Coman D., Gruissem W. (2012).** Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol. Plant* 5, VOL 5 NUM 2, 318–333.

**Vranová E., Coman D., Gruissem W. (2013).** Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* VOL 64, 665–700. Doi: 10.1146 / annurev-arplant-050312-120116.

**Wright, L. P., Rohwer, J. M., Ghirardo, A., Hammerbacher, A., Ortiz-Alcaide, M., Raguschke, B., Phillips, M. A. (2014).** Deoxyxylulose 5-Phosphate Synthase Controls Flux through the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 165(4), 1488–1504.

**Yamazaki T., Flores H. E., Shimomura K., y Yoshihira, K. (1991).** Examination of steviol glucosides production by hairy root and shoot cultures of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Natural Products*, 54(4), 986-992.

**Yadav, AK, Singh, S., Dhyani, D., y Ahuja, PS (2011).** Una revisión sobre la mejora de la stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 91 (1), 1-27. Doi: 10.4141 / cjps10086.

**Yong-Heng, Y.; Su-zhen, H.; Yu-lin, H.; Hai-yan Y.; Chun-sun, G. (2014).** Base substitution mutations in uridinediphosphate-dependent glycosyltransferase 76G1 gene of *Stevia rebaudiana* causes the low levels of rebaudioside A Mutations in UGT76G1 A key gene of steviol glycosides synthesis. *Plant Physiol Biochem* 80: 220-225.

#### **Referencias informáticas**

<http://www.predisi.de/index.html> (Mayo, 2015)

<http://www.kazusa.or.jp/codon/> (Mayo, 2015)

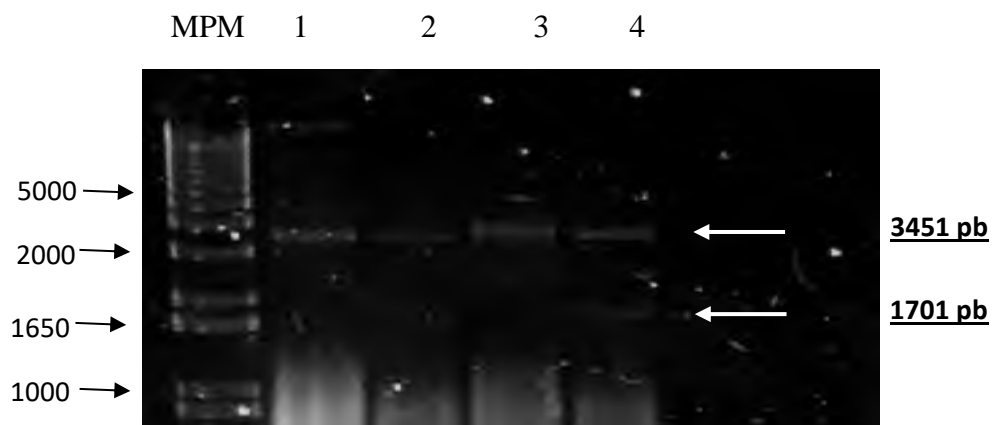
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alignInfo> (Octubre, 2015)

## Anexos

### Anexo 1

#### Comprobación de liberación del inserto srDXS del vector de clonación comercial pUC57

El proveedor GenScript quien sintetizó la secuencia srDXS, clonó dicha secuencia en el vector pUC57 adicionalmente al vector pCAMsrDXS, por lo que se realizó una digestión con la enzima de restricción PstI de doble corte (Fig. A1), con el objetivo de comprobar la presencia de la secuencia srDXS en el vector, pUC57 tiene una longitud de 2,710 pb y está optimizado por la cepa *DH5α* de *E. coli*, mientras que la secuencia sintetizada srDXS tiene una longitud de 2,442 pb. El producto de digestión con PstI generó 2 bandas, una de 3,451 pb y otra de 1,701 pb confirmando la identidad e integridad de la secuencia srDXS.



**Figura A1. Producto de digestión del Vector pUC57srDXS con la enzima PstI.** Agarosa 1.2 % 100 Volts 50 minutos. **Carril 1:** Colonia 1 pUC57srDXS sin digerir **Carril 2:** Col 1. pUC57srDXS digerido con PstI **Carril 3:** Col. 2 pUC57srDXS sin digerir **Carril 4:** Col.2 pUC57srDXS digerido PstI.

## Anexo 2

### Análisis de varianza para la evaluación del efecto del tipo de cultivo sobre la producción y productividad de EST y RebA

#### ANOVA unidireccional: Producción EST vs. Tipo de cultivo

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tipo de cultivo	5	15428.6	3085.7	177.81	0.000
Error	6	104.1	17.4		
Total	11	15532.7			

S = 4.166 R-cuad. = 99.33% R-cuad.(ajustado) = 98.77%

#### ANOVA unidireccional: Producción RebA vs. Tipo de cultivo

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tipo de cultivo	5	533435	106687	85.75	0.000
Error	6	7465	1244		
Total	11	540900			

S = 35.27 R-cuad. = 98.62% R-cuad.(ajustado) = 97.47%

#### ANOVA unidireccional: Productividad EST vs. Tipo de cultivo

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tipo de cultivo	5	17.1429	3.4286	177.81	0.000
Error	6	0.1157	0.0193		
Total	11	17.2586			

S = 0.1389 R-cuad. = 99.33% R-cuad.(ajustado) = 98.77%

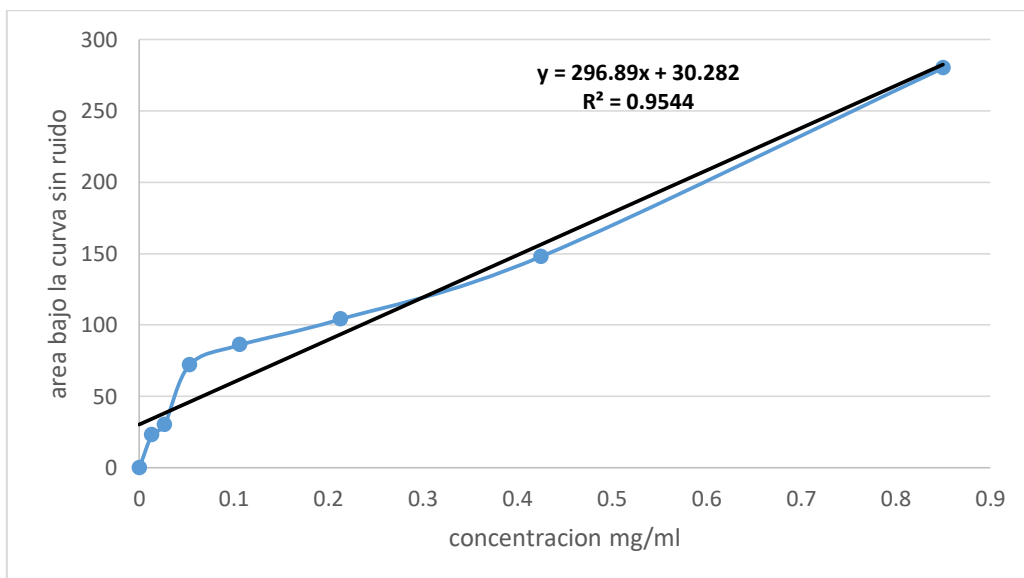
#### ANOVA unidireccional: Productividad RebA vs. Tipo de cultivo

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tipo de cultivo	5	592.71	118.54	85.75	0.000
Error	6	8.29	1.38		
Total	11	601.00			

S = 1.176 R-cuad. = 98.62% R-cuad.(ajustado) = 97.47%

### Anexo 3

#### Curva patrón para análisis de TLC



**Figura A2.** Compuestos de referencia que permitió la determinación semicuantitativa de la producción de GE en raíces no transformadas, raíces transformadas m5AR4, raíces transformadas con plásmido vacío y raíces transformadas con srDXS.