

Universidad del Papaloapan
Campus Tuxtepec

**“Evaluación del efecto de elicitación con metil-
jasmonato en cultivos de *Stevia rebaudiana* sobre los
niveles de expresión de los genes SrDXS, SrIDI y
SrKS1-1 de la ruta de biosíntesis de esteviósidos”**

Tesis para obtener el título de:

Ingeniero en Biotecnología

Presenta

Juan Ramón González Vergara

Director de Tesis

Dr. Edgar García López

Tuxtepec, Oaxaca, 2017



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales y el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la dirección del Dr. Edgar García López, para el cual se contó con el apoyo de la beca CONACyT Ciencia Básica CB-No. de proyecto 2012/183958.

A mi familia...

“La familia no es algo importante, lo es todo”

-Michael J. Fox.

Agradecimientos

A dios por brindarme salud a mí y a mis seres queridos, por contar con las facultades necesarias para afrontar los obstáculos y el esfuerzo que propuso la realización de este trabajo.

A mis padres por ser siempre un apoyo incondicional, por las horas de desvelo cuando pequeño, por todos los consejos para convertirme en un hombre de bien, por mi educación y sobre todo por creer en mí en todo momento. A mi padre Policarpo González León por protegernos y cuidarnos a toda costa, por motivarnos a dar lo mejor de nosotros día con día y por el trabajo duro que realizó para sacarnos adelante. A mi madre Victoria Vergara Cordero por ser el pilar de la familia, mi amiga y consejera, por haberse superado como persona luchando siempre por brindarnos lo mejor y darnos cuanto ha tenido en sus manos, quiero decirle que siempre estaré profundamente orgulloso de ella. A mis hermanos Lucía y Jesús, al mayor por enseñarme la fortaleza para salir adelante y a las más pequeña por ser la alegría de nuestras vidas.

A la Dra. Jacqueline Capataz Tafur por ser una persona íntegra, por guiarme y aconsejarme, por apoyarme durante todo el transcurso de la tesis, pero sobre todo por su labor desinteresada para formar profesionistas honestos, responsables y productivos.

Al Dr. Edgar García López por todo su asesoramiento y paciencia, pero sobre todo por siempre estar dispuesto a brindar su apoyo de una manera amable y respetuosa.

A mi comité tutorial por todo su asesoramiento y comentarios durante el desarrollo de este trabajo.

A mi novia Keila, por escucharme, por comprenderme y apoyarme, pero sobre todo por alegrar mis días con todos los momentos que hemos pasado juntos.

A mis amigos Armando, Polo, Claudio, Yamil, Javier, Luis Ángel y Amiel por compartir su tiempo, conocimientos y lealtad, pero sobre todo por brindarme una amistad sincera y desinteresada, agradezco sobre todo a mi amigo Armando. También agradezco a mis amigas Raquel, Sarahí, Alyn, Laura y Rebeca por su compañerismo y cariño, agradezco especialmente a mi amiga Raquel.

A mis compañeros del laboratorio, por la camaradería, por generar un ambiente de trabajo positivo, agradezco especialmente a mi compañero Mauro Montes por toda su orientación.

A todos los doctores que se encargaron de formar mi educación universitaria, yendo en muchas ocasiones más allá de lo que el deber dicta.

Índice

1. Introducción	2
2. Antecedentes	4
2.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	4
2.1.1. Clasificación de <i>S. rebaudiana</i>	5
2.2. Componentes bioquímicos de <i>S. rebaudiana</i>	6
2.3. Requerimientos para el cultivo de <i>S. rebaudiana</i>	8
2.3.1. Fotoperiodo y duración del día	8
2.3.2. Temperatura de cultivo.....	8
2.3.3. Disponibilidad de nutrientes.....	9
2.4. Propagación de <i>S. rebaudiana</i>	9
2.4.1. Propagación <i>in vivo</i>	9
2.4.2. Propagación <i>in vitro</i>	10
2.5. Relevancia de los glucósidos de esteviol.....	11
2.6. Acumulación diferencial de esteviósidos en <i>S. rebaudiana in vivo e in vitro</i> ... 11	
2.7. Biosíntesis de los glucósidos de esteviol.....	12
2.7.1. La vía MEP	14
2.8. La elicitación	17
2.8.1. La elicitación como estrategia de mejoramiento de producción	17
2.8.1.1. Respuesta al MeJA.....	18
2.9. Reacción en cadena de la polimerasa y transcripción inversa	21
3. Justificación.....	22
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivo General.....	24
6. Objetivos específicos	24
7. Materiales y Métodos	25
7.1. Estrategia experimental de trabajo.....	25
7.2. Material vegetal.....	26
7.2.1. Inducción de Brotes	26

7.2.2.	Obtención de plántulas.....	26
7.3.	Elicitación con MeJA.....	26
7.3.1.	Cinéticas de elicitación	27
7.4.	Extracción de ARN	28
7.5.	Cuantificación del ARN.....	29
7.6.	Determinación de la integridad del ARN.....	29
7.7.	Síntesis de ADNc.....	30
7.8.	PCR semicuantitativa.....	31
8.	Resultados	35
8.1.	Regeneración de plántulas <i>in vitro</i>	35
8.1.1.	Inducción de brotes	35
8.1.2.	Multiplicación de plántulas.....	36
8.2.	Respuesta fisiológica ante la elicitación con MeJA	37
8.3.	Corroboración y diseño de oligos	39
8.4.	Extracción, cuantificación y análisis de integridad de ARN total	41
8.5.	Estandarización de las condiciones de PCR.....	44
8.6.	Análisis semicuantitativo de las curvas de amplificación	46
8.6.1.	Efecto de la elicitación con etanol.....	46
8.6.2.	Efecto de la elicitación con MeJA	47
8.6.2.1.	Efecto de la elicitación con MeJA en la cinética exploratoria	47
8.6.2.2.	Efecto de la elicitación con MeJA en la cinética específica	50
8.7.	Determinación de los patrones de expresión por análisis de imagen	54
9.	Conclusiones.....	57
10.	Perspectivas.....	58
11.	Bibliografía.....	59
12.	Apéndice: Preparación de reactivos.....	67

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>S. rebaudiana</i>	6
Tabla 2. Principales compuestos bioquímicos identificados en <i>S. rebaudiana</i>	7
Tabla 3. Principales compuestos minerales identificados en <i>S. rebaudiana</i>	7
Tabla 4. Genes de estudio pertenecientes a la ruta de síntesis de los GE en Stevia.....	16
Tabla 5. Elicitación con MeJA de plantas en cultivo <i>in vitro</i>	20
Tabla 6. Preparación del master mix para la síntesis de ADNc.....	30
Tabla 7. Programa para síntesis de cDNA	31
Tabla 8. Iniciadores de ADNc para la PCR semiconstitutiva	33
Tabla 9. Preparación del Master Mix para la amplificación de ADN	34
Tabla 10. Valores de concentración y pureza de las extracciones de RNA total de la cinética de exploración (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M).	42
Tabla 11. Valores de concentración y pureza de las extracciones de RNA total de la cinética a una sola concentración (25 μ M).	42
Tabla 12. Barrido de temperaturas sobre los oligos seleccionados.....	44

Índice de figuras

Fig. 1. Pasos en común para la síntesis de giberelinas y glucósidos de esteviol.	13
Fig. 2. Vía de síntesis de los glucósidos de esteviol en <i>S. rebaudiana</i>	15
Fig. 3. Posible respuesta de la planta ante la elicitación con MeJA.....	19
Fig. 4. Estrategia experimental de trabajo.	25
Fig. 5. Brotes de <i>S. rebaudiana</i> después de dos semanas de crecimiento.....	36
Fig. 6. Inducción de raíces y generación de plántulas <i>in vitro</i>	37
Fig. 7. Respuesta fisiológica de las plántulas elicidadas con diferentes concentraciones de MeJA (25 μ M, 50 μ M y 100 μ M), y plántulas elicidadas con etanol	38
Fig. 8. Ubicación gráfica de los oligo directo y reverso utilizados para las amplificaciones en este trabajo	40
Fig. 9. Gel de integridad de ARN	43
Fig. 10. Verificación de los productos de la amplificación de PCR.....	45
Fig. 11. Expresión de los genes que codifican para las enzimas DXS, IDI y KS a 0 μ M de MeJA comparados contra las plántulas elicidadas con 100 μ M de etanol	47
Fig. 12. Expresión del gen que codifica para la enzima deoxilulosa sintasa	48
Fig. 13. Expresión del gen que codifica para la enzima Isopentil difosfato isomerasa.	49
Fig. 14. Expresión del gen que codifica para la enzima kaureno	49
Fig. 15. Análisis de expresión por absorbancia	51
Fig. 16. Análisis de expresión en gel de agarosa	55
Fig. 17. Análisis de expresión con el software ImageJ del gen que codifica para DXS ..	55
Fig. 18. Análisis de expresión con el software ImageJ del gen que codifica para IDI	56
Fig. 19. Análisis de expresión con el software ImageJ del gen que codifica para KS	56
Fig. 20. Análisis de expresión con el software ImageJ del gen que codifica para actina	56

Lista de abreviaturas

BAP: Benciladenina

CMK: Citidina difosfato quinasa

CPPS: Copalil pirofosfato sintasa

DEPC: Dietil pirocarbonato

DXR: Xilulosa fosfato reductoisomerasa

DXS: Xilulosa fosfato sintasa

G: Gravedades

GA: Ácido giberélico

GE: Glucósidos de esteviol

GGDPS: Geranilgerenil difosfato sintasa

HDR: Didroxil difosfato reductasa

HDS: Hidroxil difosfato sintasa

IAA: Ácido indol acético

IBA: Ácido indol butiríco

IDI: Isopentil difosfato Isomerasa

JA: Ácido jasmónico

KAH: Kaureno hidroxilasa

KO: Kaureno oxidasa

KS: Kaureno sintasa

KN: Kinetina

MCT: Citidina difosfato sintasa

MDS: Metil ciclodifosfato sintasa

MeJA: Metil jasmonato

MEP: Biosíntesis del metileritritol-4 fosfato

Mg: Miligramos

MOPS: Ácido 4 - morfolinopropanosulfónico

MS: Murashige y Skoog

MVA: Biosíntesis del ácido mevalónico

NAA: Ácido naftalenacético

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

TRIZOL: Tiocianato de guanidinio fenol cloroformo

Resumen

Los glucósidos de esteviol (GE) son compuestos diterpénicos de gran interés económico y medicinal presentes en las hojas de la planta *S. rebaudiana*. Debido a estas cualidades algunos estudios han intentado analizar cómo se encuentra relacionada la expresión genética con la síntesis de los GE. Por otro lado, la elicitación con Metil Jasmonato (MeJA) es una estrategia que altera el metabolismo celular de las plantas que, por lo general, ocasiona un aumento en la producción de metabolitos secundarios. Este trabajo se realizó con el objetivo de evaluar los niveles de expresión de los genes SrDXS, SrIDI, SrKS1-1 que codifican para las enzimas 1-desoxi D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS), Isopentil difosfato isomerasa (IDI) y la kaureno sintasa (KS) de la ruta de biosíntesis de los GE, en plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana* en condiciones de elicitación con MeJA. Para ello se realizaron dos cinéticas elicitando con diferentes concentraciones de MeJA 25 μM , 50 μM y 100 μM , se extrajo ARN íntegro para evaluar la acumulación de transcritos, a continuación se sintetizó la cadena de ADN complementario (ADNc) y se amplificó por PCR punto final. Los amplificados fueron cuantificados por la determinación de absorbancia a 260 nm, estos resultados fueron usados para la determinación de la abundancia de transcritos y consecuentemente los niveles de expresión. Los geles con las muestras de amplificación sobre cDNA fueron analizados para determinar su intensidad mediante el software ImageJ (<https://imagej.net>).

De acuerdo a los resultados la elicitación con 25 μM de MeJA representa una estrategia confiable para aumentar representativamente el flujo de expresión de los tres genes de estudio, principalmente dentro de las primeras 24 horas de exposición. Al mismo tiempo se observó un aumento en la acumulación del esteviósido y el rebaudiósido A, principales metabolitos secundarios presentes en *S. rebaudiana*. El aumento en los perfiles de expresión de los genes que codifican para DXS, IDI y KS elicitados con MeJA, permite proponer que los genes responsables de la biosíntesis de GE están ampliamente regulados, principalmente por mecanismos transcripcionales.

1. Introducción

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta herbácea, que crece en forma de arbusto de forma perenne, pertenece a la familia de las plantas compuestas (Asterácea) y es originaria de ciertas regiones de América del Sur (Kinghorn., 2002). Esta planta se abrió camino por toda la costa del Pacífico hasta llegar a países como: México, Estados Unidos de América, Japón, China, Malasia, España, Italia y Reino Unido, hoy en día aún se pueden encontrar variedades de *Stevia* en estado silvestre en algunos países como Paraguay en el departamento de Amambay, donde es conocida por los nativos guaraníes por el sobrenombre de “kaa he-he” y en la provincia de Misiones Argentina (Kobus y Michalowska., 2015).

La principal aplicación de *S. rebaudiana* y su potencial interés económico se debe al contenido de los glucósidos de esteviol (GE), una familia de compuestos diterpénicos que representan del 4 % al 20 % del peso seco de la planta y que son responsables de brindarle una dulzura hasta 300 veces más intensa que la sacarosa (Kaur *et al.*, 2014). El esteviósido y el rebaudiósido A son los principales GE presentes en las hojas de *Stevia*, sin embargo también existen otros GE presentes en menor concentración como el esteviolbiósido, el rebaudiósido B, C, D, E, F y el dulcósido A (Geuns., 2003).

Debido a la importancia de los GE presentes en *S. rebaudiana* se ha profundizado en los mecanismos por los cuales son sintetizados, sugiriendo en un principio la implicación de diversas vías metabólicas, como la vía de síntesis del ácido mevalónico (MVA), sin embargo ensayos más recientes han demostrado que la biosíntesis de los GE se lleva a cabo, en un principio a través de una la vía metileritritol-4 fosfato (MEP) (Estévez *et al.*, 2001). Hasta ahora se han hecho estudios importantes para describir los pasos catalíticos por los cuales se sintetizan los esteviósidos teniendo en cuenta a las enzimas que se encuentran implicadas en este proceso (Guevara *et al.*, 2005). Sin embargo aún falta profundizar en la investigación enfocada hacia el área molecular, para describir

como se encuentra relacionada la expresión genética con la síntesis de los GE en Stevia (Rodríguez y Boronat., 2004). Algunos estudios previos demostraron que los genes que codifican para la copalil pirofosfato sintasa (CPPS), la kaureno sintasa (KS) y la kaureno oxidasa (KO) tienen un papel importante en la determinación del contenido de GE en la planta, esta conclusión se basó en la expresión relativa de estos genes y el volumen de GE en diferentes órganos de la planta (Richman *et al.*, 1999; Brandle y Telmer 2007).

Por otro lado, la elicitación es una estrategia que consiste en someter células, tejidos u organismos a un agente externo llamado elicitor, este compuesto altera el metabolismo celular de las plantas, desencadenando una serie de mecanismos de defensa que, por lo general, ocasiona un aumento en la producción de metabolitos secundarios (Ramírez Estrada 2016). Se sabe que la elicitación con Metil-Jasmonato (MeJA) modulan diversos procesos fisiológicos, los cuales incluyen: el crecimiento de la raíz, senescencia, síntesis de metabolitos secundarios y la respuesta de defensa por parte de la planta contra los patógenos y el ataque de insectos (Baenas., 2014). Estudios previos demostraron que la elicitación con MeJA en *S. rebaudiana* desencadena una serie de respuestas sobre la expresión genética en la ruta de biosíntesis de los glucósidos de esteviol (Kumar *et al.*, 2011).

Debido a estas razones en este trabajo se propuso como objetivo realizar un estudio sobre niveles de expresión de los genes SrDXS, SrIDI, SrKS1-1 que codifican para las enzimas 1-desoxi D-xilulosa-5-fosfato sintasa, Isopentil difosfato isomerasa y la kaureno sintasa respectivamente, en plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana* en condiciones de elicitación con MeJA (Kumar *et al.*, 2011).

2. Antecedentes

2.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni

El entorno natural de *S. rebaudiana* se localiza en las praderas tropicales, a una altitud de 200 a 500 metros sobre el nivel de mar, puede resistir temperaturas que abarcan desde los -6 °C hasta los 43 °C, sin embargo su estado de crecimiento óptimo se encuentra alrededor de los 23 °C (Brandle y Rosa., 1992).

La morfología de la planta está conformada por hojas en forma de elipse y flores blancas, llegando a alcanzar una altura de entre 20 a 65 cm (Lemus *et al.*, 2012). Las condiciones en que se desarrolla son muy variadas, crece en distintos tipos de suelo como son: húmedos, arenosos y limosos, llegando a crecer incluso a orillas de suelos pantanosos (Kobus y Michalowska., 2015).

Stevia es una anomalía en la plantas de este género, ya que en ninguna otra de las aproximadamente 230 especies de esta familia se ha podido demostrar hasta el momento, una producción de GE o algún homólogo con la misma capacidad edulcorante (Kinghorn., 2002). Pese a ello se ha logrado detectar en extractos de hojas secas, algunos GE presentes cantidades traza, procedentes de diferentes cultivares como: la *Stevia phlebophylla* en México, la *Rubus suavissimus* en China y la *Angelica keiskei* en Japón (Ceunen y Geuns., 2013).

Los extractos estandarizados de *Stevia* y el esteviósido purificado, se han utilizado como suplemento alimenticio en América del Sur, Japón, China, en diferentes países de la Unión Europea y Estados Unidos de América desde 1995 (Geuns *et al.*, 2003). En México según el Codex para los aditivos alimentarios publicado en el Diario Oficial de la Federación adaptado para el 2016, sólo se permite el empleo de los esteviósidos en mezclas, es decir, su uso está restringido como aditivo de bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados, no se permite su comercialización como extracto puro.

Tras su lanzamiento al mercado, los esteviósidos recibieron críticas severas que sugerían un posible potencial cancerígeno, sin embargo múltiples estudios han señalado que el consumo de productos obtenidos a partir de extractos de Stevia no se acumulan en el cuerpo humano, ingiriendo una dosis diaria por debajo de los 750 mg (Geuns *et al.*, 2003). Por el contrario, se ha demostrado que el consumo de esteviósidos brinda beneficios a la salud humana, en la mayoría de casos han sido utilizados como sustituto de la sacarosa en personas con diabetes tipo II, ayudando a mermar los niveles de glucosa en sangre hasta en un 35%, además de contribuir a disminuir la presión arterial en pacientes con hipertensión leve (Gregersen *et al.*, 2004). En base a los estudios anteriores, la Organización Mundial de la Salud reconoció que el consumo de los GE no resulta tóxico para el cuerpo humano, con un consumo diario por debajo de los 0.2 mg/Kg peso corporal (Beneford *et al.*, 2006).

2.1.1. Clasificación de *S. rebaudiana*

La primera clasificación botánica de *S. rebaudiana* (Tabla 1), se atribuye al M. S. Nicolás Bertoni, por su alta producción de esteviósidos, Stevia es una anomalía de los 950 miembros de la familia Asterácea, consiste en un grupo de hierbas anuales y arbustos perenes que habitan en las regiones montañosas, fronteras de ríos y valles (Soejarto., 2002).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *S. rebaudiana*

Dominio	Eucariota
Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Grupo	Monoclamídea
Orden	Asterales
Familia	Asterácea
Subfamilia	Asteroidea
Género	<i>Stevia</i>
Especie	<i>rebaudiana</i>

Fuente: Soejarto., 2002

2.2. Componentes bioquímicos de *S. rebaudiana*

Han sido muchos los estudios para determinar los constituyentes bioquímicos que componen a *S. rebaudiana*, un análisis proximal realizado en extractos de hojas secas reveló que los principales componentes bioquímicos incluyen el grupo de las proteínas, grasas y carbohidratos, a su vez los análisis para determinar el contenido de GE demostró que el esteviósido es el compuesto más abundante (Tabla 2) seguido del rebaudiósido A y C (Yadav *et al.*, 2012). El análisis mineral (Tabla 3) reveló que el potasio, calcio, magnesio, fósforo, sodio y azufre se encuentran presentes en mayor cantidad que el cobre, cobalto, manganeso, zinc, selenio y molibdeno (Mishra *et al.* 2010).

Tabla 2. Principales compuestos bioquímicos identificados en *S. rebaudiana*

Componentes	Valor (g/100 g peso seco de hoja)
Carbohidratos	35.2
Proteínas	12-20.42
Lípidos	2.7-4.34
Ceniza	13.12
Esteviósido	4-14
Rebaudiósido A	2-4
Rebaudiósido C	1-2
Dulcósido A	0.4-0.7
Rebaudiósido D, E, F: esteviolbiósido	>0.4

Fuente: Yadav., 2002

Tabla 3. Principales compuestos minerales identificados en *S. rebaudiana*

Mineral	Contenido (mg 100 g⁻¹) hoja seca <i>S. rebaudiana</i>
Calcio	464.4
Fósforo	11.4
Sodio	190
Potasio	1800
Hierro	55.3
Magnesio	34.9
Zinc	1.5

Fuente: Yadav., 2002

2.3. Requerimientos para el cultivo de *S. rebaudiana*

Stevia es una planta que no necesita requerimientos nutricionales exigentes para su desarrollo, ya que se adapta a distintas condiciones climáticas y de suelo, esto debido al entorno natural de dónde es endémica en su natal Paraguay, sin embargo existen algunos factores que pudieran llegar a influir en su desarrollo, principalmente el fotoperiodo, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes del suelo (Ramesh *et al*, 2006).

2.3.1. Fotoperiodo y duración del día

Stevia es una planta que necesita del sol, ya que habita principalmente en climas cálidos, se considera una planta de día corto, con una longitud de día crítico menor a 14 horas, lo cual provoca una floración alrededor de los 46 días de desarrollo (Valio y Rocha *et al* 1977). Se sabe que las condiciones de día largo prolongan el crecimiento vegetal mediante la anulación de la floración temprana, promoviendo el aumento de la longitud entre nudos, el área foliar y la biomasa de las hojas (Viana y Metivier., 1980).

El aumento en el tiempo de la exposición a luz en Stevia, se ha utilizado en el laboratorio como estrategia de cultivo *in vitro* para aumentar la producción de esteviósidos, ya que al aumentar la biomasa de las hojas, aumenta el contenido de carbohidratos, proteínas y por ende la síntesis de metabolitos secundarios, en plántulas *in vitro* el fotoperiodo óptimo para lograr una mayor producción de GE oscila en un rango de entre 16 y 20 horas de exposición a luz (Ceunen y Geuns., 2013).

2.3.2. Temperatura de cultivo

El rango de temperatura de cultivo *in vivo* de *S. rebaudiana* se encuentra entre los 15 °C y los 30°C, se sabe que Stevia soporta intervalos de temperaturas muy amplios, pudiendo adaptarse a diversas condiciones climáticas, existen reportes de plantas que sobrevivieron a temperaturas por debajo de los 0°C (Brandle y Rosa., 1992). La temperatura óptima para sistemas de cultivo *in vitro* en los que se ha requerido

umentar la producción de GE se encuentra en el rango de entre 20 °C y 25 °C (Ramesh *et al.*, 2006).

2.3.3. Disponibilidad de nutrientes

Debido a que *S. rebaudiana* prefiere suelos ácidos para crecer, podría garantizarse la presencia de algunos nutrientes esenciales en el suelo tales como: sodio, magnesio y nitrógeno. Los primeros estudios realizados en campo con respecto a la nutrición de Stevia, indicaron que la implementación de nitrógeno y potasio aumenta el tamaño y grosor del tallo, así como el número de ramificaciones en la planta (Kinghorn., 2002; Mitra y Pal., 2007). Los síntomas visuales con respecto a la deficiencia de nutrientes incluyen cambios de color verde a un amarillento si se trata de deficiencia de sodio, hojas de color negro por deficiencia de fósforo y un color café moteado por deficiencia de potasio (Ramesh *et al.*, 2006).

Con respecto a la relación entre los nutrientes y la producción de GE, los estudios indicaron que las deficiencias de potasio, calcio y sodio disminuyen la concentración de esteviósidos en las hojas (Utumi *et al.*, 1999).

2.4. Propagación de *S. rebaudiana*

2.4.1. Propagación *in vivo*

La propagación vegetal en campo se puede realizar a través de un corte en el tallo, la raíz o mediante la semilla, sin embargo, la propagación vegetal a través de la raíz requiere de una considerable cantidad de insumos y un costo de mano de obra elevado, por otro lado, la propagación vegetal en campo a través de la semilla resulta muy pocas veces viable debido a la baja tasa de germinación (Debnath., 2008). Es por ello que la propagación en campo a través de un corte en el tallo resulta ser el método tradicional ideal para cultivar Stevia, a grandes rasgos, se debe cortar una rama vigorosa desde la base de la planta, la cual se siembra en el campo manteniendo de dos a tres nodos por encima del suelo, el tallo se debe sumergir en aceite de neem o en cualquier otra fuente fúngica (Shock., 1982). Se sabe que el rendimiento de los esquejes con una altura de 15

centímetros o superior es mayor, comparada con esquejes de menor tamaño, esto debido a que los retoños de mayor tamaño extraen mayor cantidad de nutrientes del suelo, por lo que facilita el inicio del proceso de enraizamiento, con lo cual cuentan con mayores posibilidades de establecerse (Yadav *et al.*, 2010).

2.4.2. Propagación *in vitro*

La micropropagación *in vitro* resulta ser una alternativa viable para el establecimiento y multiplicación del cultivo, ya que podemos obtener plantas homogéneas y libres de patógenos en un sistema de cultivo bajo condiciones controlables (Sivaram y Mukundan., 2003).

La micropropagación en Stevia se puede realizar partiendo de diferentes tejidos como hojas, raíz, brotes axilares, primordios de lanzamiento, explantes nodales, callo embriogénico entre otros (Salahim *et al.*, 2007; Ejaz *et al.*, 2013). Los primeros cultivos *in vitro* de *S. rebaudiana* se reportaron a mediados de los años 90's, estos estudios partían del tallo como tejido cultivado en un medio de agar LS (Linsmaier y Skoog., 1965) suplementado con Kinetina, la cual es un tipo de citoquinina que promueve la división y la diferenciación celular (Linmaier y Skoog., 1964; Pande y Gupta., 2012). Se sabe que *S. rebaudiana* puede formar múltiples brotes a partir de explantes nodales, por lo que diversos protocolos han partido de este tejido para el establecimiento de material vegetal, por ejemplo los explantes se han cultivado en un medio basal MS suplementado con IAA (Ácido indol acético), Kinetina, BAP (Benciladenina) e IBA (Ácido indol butírico) con el objetivo de promover la proliferación y multiplicación de brotes (Murashige y Skoog., 1962; Miltra y Pal., 2007).

Debido a la importancia económica de Stevia, son muchos los protocolos de micropropagación que se han enfocado al mejoramiento en la producción de los GE. En estos estudios, los reguladores de crecimiento vegetal han tenido un impacto significativo en la composición del medio de cultivo, en la mayoría de los casos los reguladores de crecimiento vegetal como BAP y NAA (ácido naftalenacético) se

denominan como esenciales para el desarrollo de brotes y producción de esteviósidos (Laribi *et al.*, 2012; Pande y Gupta., 2012).

2.5. Relevancia de los glucósidos de esteviol

Los GE poseen un inmenso potencial económico, aplicable en distintos campos de la industria química, farmacéutica, alimenticia y medicinal (Mulabagal y Sheng., 2004). Japón fue el primer país en comercializar los esteviósidos como un edulcorante de uso común en los alimentos, desde entonces esta práctica se ha extendido a otros países del continente asiático como China, Malasia, Singapur, Corea del Sur, Taiwán y Tailandia (Chatsudthipong y Muanprasat., 2009).

Además del poder edulcorante, se ha demostrado que los GE son capaces de brindar beneficios terapéuticos a las personas que los consumen, ya que tiene un efecto antihiper glucémico, anti hipertensivo, antidiarreico, diurético e inmunomodulador (Lemus *et al.*, 2012). Desde hace unos años, se han recomendado a los GE como tratamiento contra enfermedades como la diabetes, caries dental, obesidad e infecciones del estómago (Debnath., 2008).

2.6. Acumulación diferencial de esteviósidos en *S. rebaudiana* in vivo e in vitro

La acumulación de los GE en Stevia varía dependiendo del órgano de la planta y la etapa de crecimiento en que se encuentre. Durante el desarrollo reproductivo la expresión del esteviósido y el rebaudiósido A en el tallo son menores que las del dulcósido A y el rebaudiósido C (Ceunen y Geuns., 2013). Un estudio en campo realizado en 300 ejemplares de Stevia, reveló que el contenido de GE varía de 0.5 a 3.7% en el estadio de plántula y de 6.7 a 18.6% en el tiempo de la cosecha (Bondarev *et al.*, 2002a).

La aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* en *S. rebaudiana* promueven una disminución sobre la cantidad de GE producidos comparados con el cultivo *in vivo*, siendo esta cantidad aproximadamente de 5 a 10 veces menor (Bondarev *et al.*, 2002b). Los sistemas de cultivo como los callos y células en suspensión solo han sido capaces

de producir pequeñas cantidades de algunos GE tales como el esteviósido A, el rebaudiósido B y cantidades aún más bajas del esteviolbiósido (Bondarev *et al.*, 2001). Para contrarrestar esta desventaja, las técnicas de cultivo *in vitro* se han apoyado en el uso de medios suplementado con fitoreguladores, con lo cual, se ha logrado mejorar el rendimiento y aumentar la síntesis de metabolitos secundarios, induciendo una producción similar promedio comparada con el cultivo *in vivo* (Gauchan *et al.*, 2014).

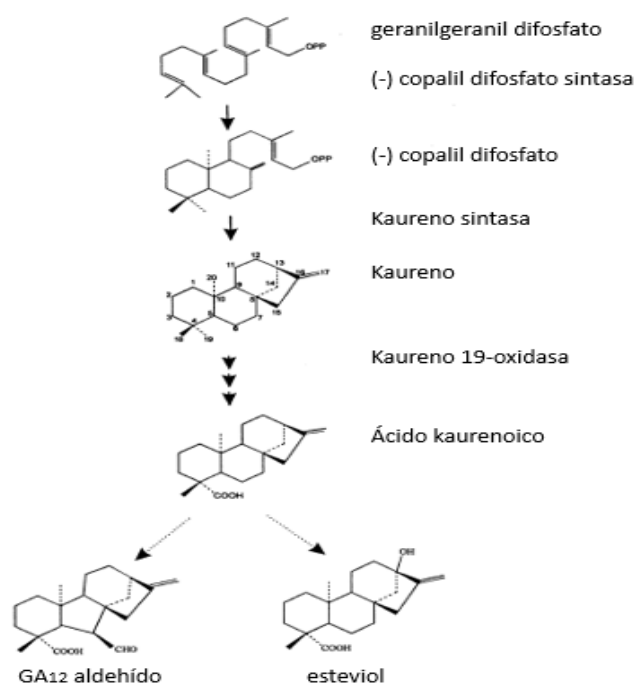
2.7. Biosíntesis de los glucósidos de esteviol

El Isopentil difosfato es la unidad fundamental de todos los isoprenoides, el cual se forma generalmente por condensación de la acetil coenzima A, a través de la vía del MVA, por lo tanto, era la respuesta más lógica al momento de dilucidar la biosíntesis de los esteviósidos, ya que los GE son compuestos diterpénicos con un esqueleto de isopreno, sin embargo algunos estudios empleando marcadores de glucosa han revelado que las plantas, específicamente los cloroplastos utilizan una vía independiente del MVA para la formación del esqueleto que conforma la estructuración de los GE (Lichtenthaler *et al.*, 1997;Totté *et al.*, 2000).

Como se mencionó anteriormente la biosíntesis de los GE opera en las hojas, lugar desde donde son transportados a varias partes de la planta. Este antecedente fue crucial para poder determinar una dicotomía bastante clara entre la biosíntesis de diterpenos en general y isoprenoides: la vía del MVA opera en el citoplasma, mientras que la vía alternativa conocida más tarde como la vía MEP se localiza en el plastidio (Brandle y Rosa., 1992).

Los GE son moléculas diterpénicas tetracíclicas derivadas del ácido kaurenoico, mismo precursor del ácido giberélico (GA por sus siglas en inglés). El esteviol es una molécula diterpénica que comparte muchas características estructurales con el GA, el esqueleto de isopreno del esteviol y el GA son idénticos, esta observación ha llevado a la predicción de que los primeros pasos que conducen a la formación de esteviol son los mismos pasos para la biosíntesis de las giberelinas (figura 1) (Richman *et al.*, 1999; Brandle y Telmer., 2007). Todos los diterpenos se derivan del geranilgeranil difosfato

(GGDP), de estos diterpenos policíclicos el ácido giberélico (GA) es el mejor conocido, siendo la biosíntesis de GA ubicua entre las plantas (Bohlmann *et al.*, 1998). Diversos estudios empleando marcadores de secuencia demostraron que la vía de síntesis de los GE diverge en el kaureno, en comparación con otros terpenos como las giberelinas, este a su vez se convierten en esteviol, en principio a través de la vía MEP que abarca desde la formación de la xilulosa fosfato sintasa a partir de gliceraldehído y piruvato, hasta la biosíntesis de la Isopentil difosfato isomerasa (Totté *et al.* 2000).

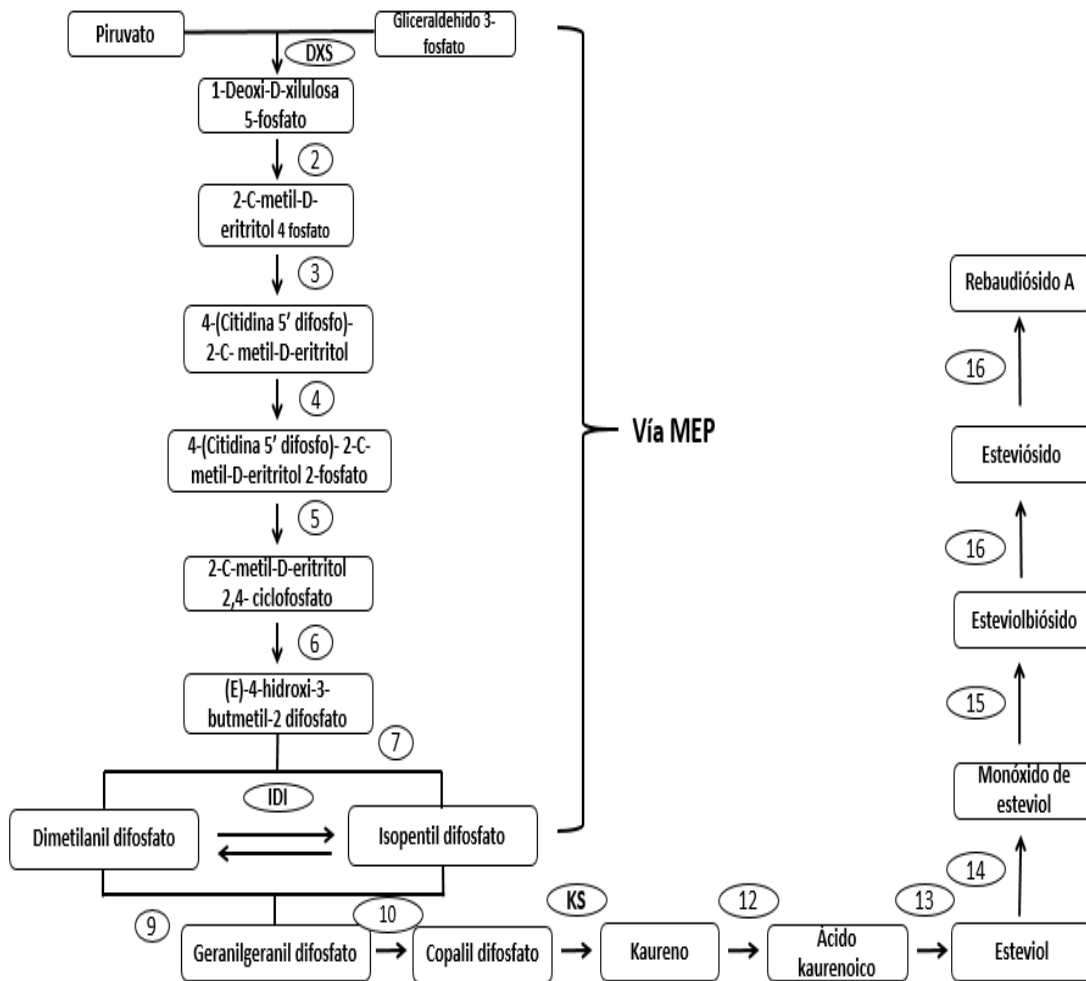


Fuente: Richman *et al.*, 1999

Fig. 1. Pasos en común para la síntesis de giberelinas y glucósidos de esteviol. La biosíntesis de giberelinas muestra un reordenamiento químico similar a los esteviósidos a partir de la formación de geranylgeranyl difosfato divergiendo en el ácido kaurenoico.

2.7.1. La vía MEP

La vía MEP es una ruta que abarca gran parte de la síntesis de los GE (Fig. 2), esta se compone de diversos pasos de conversión y reordenamiento molecular hasta llegar a la síntesis final de los esteviósidos (Geuns 2003). El primer paso para la síntesis de los GE es la formación de 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) a partir de piruvato y gliceraldehído (paso. 1) por la enzima deo-xilulosa fosfato sintasa (DXS), la cual representa una región altamente conservada en las diferentes especies de *S. rebaudiana* (Eisenreich *et al.*, 2001). El siguiente paso en la vía involucra a la deoxilulosa fosfato reducoisomerasa (DXR) que se encarga de disminuir y reordenar la cadena de DXP para formar 2C-metil-D-eritritol 4 fosfato (paso. 2 y 3), el gen en específico para este paso fue clonado por primera vez en *Arabidopsis thaliana* (Totté *et al.*, 2000). Los genes para los próximos 5 pasos de en la vía MEP también se han clonado y caracterizado en *Arabidopsis thaliana*, lo que ha llevado a la secuenciación de genes de la vía MEP (paso. 3, 4 y 5) en muchas otras especies incluyendo a Stevia (Guevara *et al.*, 2005).



Fuente: Kumar *et al.*, 2011

Figura 2. Vía de síntesis de los glucósidos de esteviol en *S. rebaudiana*.

Los números dentro de los círculos representan la enzima que cataliza la etapa correspondiente: 1 DXS: 1-deoxy-D-xilulosa 5-fosfato; 2 DXR 1-deoxy-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa; 3 MCT: 4-(citidina 5' difosfo)-2-C-metil-D-eritritol 4 fosfato sintasa; 4CMK:4-(citidina 5' difosfo)-2-C-metil-D-eritritol kinasa; 5 MDS: 2-C- metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa; 6 HDS: (E)-4-hidroxi-3-butmetil-2-difosfato sintasa; 7 HDR: (E)-4-hidroxi-3-butmetil-2-difosfato reductasa; 8 IDI: isopentil difosfato isomerasa; 9 GGDPs: geranilgeranil difosfato sintasa; 10 CPPS: copalil difosfato sintasa; 11 KS: kaureno sintasa; 12 KO: kaureno oxidasa; 13 KAH: ácido kaurenoico hidroxilasa; 14 UGT85C2; 15 UGT; 16 UGT74G1; y 17 UGT76G1.

Tabla 4. Genes de estudio pertenecientes a la ruta de síntesis de los GE en Stevia

Enzima	Gen	Número de acceso	Criterio de selección	Bibliografía
1-deoxy-D-xilulosa 5-fosfato	DXS	AJ429232	Se ha reportado que DXS, podría ser un paso limitante en la velocidad de reacción en la vía MEP, permitiendo la entrada hacia la biosíntesis de isoprenoides, ácido abscísico, esteviósidos y giberelinas.	Estévez <i>et al.</i> , 2001
Kaureno sintasa	KS	AF097310	Estudios previos realizados en <i>S. rebaudiana</i> demostraron que la expresión de KS se encuentra íntimamente relacionado con el contenido GE.	Kumar <i>et al.</i> , 2011
Isopentil difosfato isomerasa	IDI	KT276235.1	Los reportes indican que IDI juega un papel esencial para la biosíntesis de terpenos, el silenciamiento de IDI en <i>Nicotiana benthamiana</i> redujo hasta un 80% la producción de pigmentos en comparación con el control.	Page <i>et al.</i> , 2004

2.8. La elicitación

En cultivo de células y tejidos vegetales, un elicitor puede ser definido como: un compuesto introducido en bajas concentraciones a un medio de cultivo, capaz de promover la síntesis de metabolitos secundarios (Ramírez *et al.*, 2015). Convencionalmente, los elicitores se clasifican de acuerdo a su naturaleza: en bióticos y abióticos, de acuerdo a la interacción que existe entre la planta y el elicitor o debido a su naturaleza química (Zhao., 2005).

La elicitación es una de las técnicas más eficaces que se utilizan actualmente para mejorar la producción de metabolitos secundarios, ya que estos actúan como inductores que estimulan a la planta a promover el metabolismo secundario (Baenas *et al.*, 2001).

2.8.1. La elicitación como estrategia de mejoramiento de producción

Los elicitores como el ácido jasmónico (JA) y su derivado el metil-jasmonato (MeJA) nombrados en general como jasmonatos, actúan naturalmente como reguladores celulares implicados en diversos procesos de desarrollo vegetal como: la germinación de semillas, crecimiento de la raíz, fertilidad, maduración de frutos, senescencia y activación de diversos mecanismos moleculares (Schaller y Stintzi., 2008). Se sabe que la aplicación del MeJA de forma exógena estimula positivamente el flujo de trabajo de muchas vías metabólicas las cuales incluyen la producción de terpenos, flavonoides, alcaloides y fenilpropanoides (Browse, J. 2009).

La forma en que los jasmonatos regulan este proceso se ha analizado mediante el estudio de patrones de expresión génica, el análisis por microarreglos ha permitido la detección masiva de numerosos genes activados por la aplicación de jasmonatos, tal es el caso del gen *COI1* identificado en *Arabidopsis thaliana* que regula la expresión del 84 % de genes que se inducen por la presencia del ácido jasmónico (Schenk *et al.*, 2000; Devoto *et al.*, 2005).

2.8.1.1. Respuesta al MeJA

La elicitación con MeJA desencadena una extensa reprogramación transcripcional que conduce a la activación génica del metabolismo secundario en las plantas (Fig. 3), esta respuesta comienza por lo general cuando los receptores que se encuentran en la membrana plasmática son activados por la aplicación exógena de MeJA, posteriormente ocurre un intercambio de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que a su vez activan a los factores de transcripción que se encargan de promover la expresión genética (Vom *et al.*, 2001).

La podofilotoxina es un compuesto de interés comercial muy importante como tratamiento contra el cáncer, un cultivo de células en suspensión de *Linum album* elicitado con 100 μM de MeJA aumentó la producción de podofilotoxina con respecto al control hasta en un 20 % (Van Furden y Humburg, 2005). Por otro parte un estudio realizado en *Catharanthus roseus* demostró que MeJA al 250 μM regula los niveles de transcripción de la vía metabólica para la producción de alcaloides (Goklany *et al.*, 2009).

Con respecto a *S. rebaudiana* un análisis de expresión de 15 genes demostró que la elicitación con MeJA a 100 μM regula la activación de algunos genes que se encuentran involucrados en la ruta de biosíntesis de los esteviósidos, en este estudio se concluyó que la expresión de DXS y KO mostró una correlación positiva respecto al contenido de GE en la planta (Kumar *et al.*, 2011).

Los resultados indican que existe un alto grado de especificidad con respecto a cada especie de plantas y las vías metabólicas que pueden inducirse mediante la elicitación con MeJA, además de la estrecha relación que existe entre la concentración de MeJA que se aplique y la producción de metabolitos secundarios. En términos generales se proponen tres tipos de metabolitos secundarios que pueden ser inducidos por MeJA,

estos son el grupo de: los terpenos, alcaloides y fenilpropanoides (Tabla 5) (Pauwels L., *et al.*, 2009; Zhao., 2005).

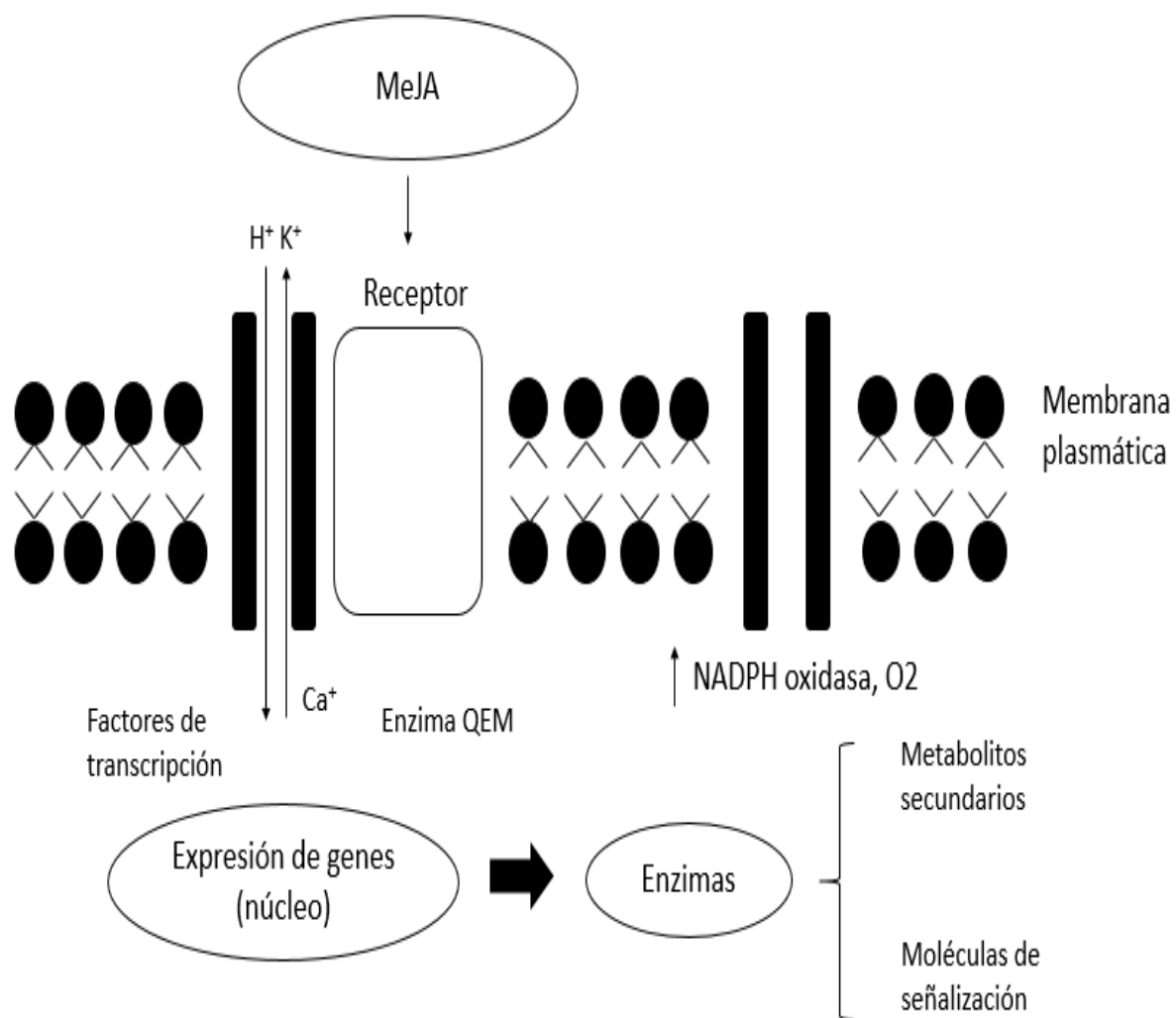


Figura 3. Posible respuesta de la planta ante la elicitación con MeJA.

QEM: Enzima quinasa mitogénica. La respuesta de la planta comienza en los receptores que se encuentran en la membrana plasmática, MeJA es conocido por ser un elicitor de alta potencia, llegando a tener efecto a nivel de factores de transcripción y expresión genética.

Tabla 5. Elicitación con MeJA de plantas en cultivo *in vitro*

Especie	Metabolito secundario (MS)	Tiempo de exposición	de	Concentración de MEJA (μM)	Referencia
<i>Linum album</i>	Podofilotoxin; methoxipodofilotoxin	6-	4,6,8,10,12 y 14 (días)	100	Van Furden <i>et al.</i> , 2005
<i>Linum tauricum</i>	Lignina		1,2,3,4,5,6 y 7 (días)	50, 100, 150 y 250	Lonkova., 2009.
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenósidos		1-40 (días)	100	Kim, Y. S <i>et al</i> 2007
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenósidos		1-10 (días)	100	Hu <i>et al.</i> , 2003
<i>Taxus baccata</i> , <i>Taxus media</i>	Paclitaxel y taxanos		8, 16, 24 y 38 (horas)	100 y 200	Bonfill <i>et al.</i> , 2005
<i>Menta piperita</i>	Ácido rosmárico		6, 12, 24, 48 y 72 (horas)	50, 100 y 200	Krzyzanowska, J. <i>et al.</i> , 2011
<i>Lavandula vera</i>	Ácido rosmárico		4, 8, 12, 24, 36 y 48 (horas)	12.5, 25, 50, 100 y 150	Georgiev, M. <i>et al.</i> , 2006
<i>Scopolia parviflora</i>	Alcaloides		0.5, 12, 24, 48 y 72 (horas)	10, 100, 1000 y 2000	Kang <i>et al.</i> , 2003
<i>Taxus media</i>	Taxanos		0.5, 1, 2, 4, 8, 12 (horas), 4, 8, 12, 16, 20 y 24 (días)	100	Onrubia <i>et al</i> , 2013
<i>Centalla asiatica</i>	Centellosidos		1-30 (días)	100 y 200	Bonfill <i>et al</i> , 2011
<i>S. rebaudiana</i>	Esteviósidos		2, 4 y 6 (horas)	100	Kumar <i>et al</i> , 2011

2.9. Reacción en cadena de la polimerasa y transcripción inversa

La reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR en tiempo final o PCR convencional, es un método cualitativo para amplificar o aumentar la cantidad de una sola, o pocas copias de ADN específico denominado ADN molde, con lo cual se facilitará la detección del producto de la amplificación (amplicón) en los análisis pos-PCR como la electroforesis en gel de agarosa (Mullis *et al.*, 1986; Flaige y Pfaffl 2006).

La reacción de transcripción inversa RT-PCR es una variante de la PCR convencional, es conocido por ser un método altamente sensible y específico, útil cuando se desea evaluar la presencia de transcritos en una muestra, la RT-PCR es un proceso catalizado por la transcriptasa inversa, una enzima capaz de sintetizar ADN de doble cadena a partir de ARN de cadena sencilla (Temin., 1972; 1985).

Una variante de la RT-PCR es la RT-PCR semicuantitativa, la cual es muy utilizada para evaluar la acumulación de transcritos de ARN específicos y detectar cualquier variación en sus niveles de expresión en diferentes condiciones experimentales. Para calcular la abundancia de los transcritos de los genes “blancos”, se pueden seguir estrategias como la cuantificación relativa, ampliamente usada para evaluar los cambios en la expresión de ciertos genes en distintos estados fisiológicos (Marone *et al.*, 2001). Estos cambios se basan en los niveles de ARNm del “gen blanco” comparados con el gen de referencia o control constitutivo, el cual no cambia su expresión a pesar de que los estados fisiológicos se modifiquen (Wong y Medrano., 2005). Los datos obtenidos por la cuantificación relativa son expresados como relativos al gen de referencia y generalmente son referidos como el número de veces en que aumentan o disminuyen en comparación al control (Ibarra *et al.*, 2013).

3. Justificación

En la última década ha ocurrido un aumento significativo en la aparición de enfermedades que dependen de la dieta, tales como: la obesidad, diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y también diversos problemas relacionados con patologías dentales. Se sabe que las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial, cada año mueren más personas en el mundo por enfermedades cardiovasculares que por cualquier otro motivo, según la OMS en el 2012 murieron más de 17 millones de personas. La mayoría de estas enfermedades son consecuencia directa de una dieta inadecuada relacionada con un alto consumo de carbohidratos y falta de actividad física, entre otros.

Desde hace ya muchos años, las grandes corporaciones alimenticias se han apoyado en el uso de edulcorantes sintéticos para la elaboración de sus productos comerciales, especialmente el aspartame, un edulcorante sintético ampliamente utilizado que se encuentra presente en más de 5000 alimentos y bebidas procesados, se cree que el aspartame podría ser causa de diversas patologías como tumores, síndrome de fatiga crónica, diabetes, migraña, artritis, lupus, enfermedades cardiovasculares, cáncer, entre otros.

Desde su descubrimiento, *S. rebaudiana* una hierba dulce de origen Sudamericano con un poder edulcorante hasta 300 veces superior a la sacarosa, se ha acreditado como una alternativa viable con el poder de sustituir a los edulcorantes clásicos y sintéticos. Aunado al poder edulcorante, la Stevia es una planta que cuenta con múltiples propiedades medicinales entre las que destacan las acciones hipotensora, antimicrobiana, dietética, digestiva e hipoglucémica, por lo que su estudio puede extenderse a distintas áreas de interés. Se ha demostrado que el uso de extractos obtenidos a partir de *S. rebaudiana*, disminuye los niveles de glucosa en sangre en personas con diabetes tipo II y controlan la presión arterial en pacientes con hipertensión leve.

Pese a estos beneficios, los esteviósidos obtenidos a partir de extractos de *S. rebaudiana*, se enfrentan con algunas limitaciones biotecnológicas para su producción, como el bajo rendimiento de los metabolitos secundarios en sistemas de cultivo *in vitro*. Se cree que dichas limitaciones no están estrictamente relacionadas a los sistemas de cultivo *in vitro* como tal, sino a la poca información disponible sobre la vía de biosíntesis de los glucósidos de esteviol.

Diversos estudios sugieran que la elicitación con MeJA, podría activar la respuesta genética por parte de la planta estimulando la vía metabólica para la producción de GE, ocasionando un aumento en la acumulación de esteviósidos.

Abordando esta problemática, este trabajo pretende evaluar el efecto que tiene la elicitación con tres diferentes concentraciones de MeJA, sobre los niveles de expresión de los genes que codifican para las enzimas SrDXS, SrIDI y SrKS1-1 de la ruta de biosíntesis de los glucósidos de esteviol, suponiendo que alguna de las concentraciones producirá un aumento en la producción de GE. Con el conocimiento generado se pretende profundizar en los aspectos básicos que tiene el efecto de la elicitación con MeJA sobre los perfiles de expresión de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de los esteviósidos, pensando en que en un futuro próximo esta estrategia pudiera ser aplicada para mejorar las características de valor económico en *S. rebaudiana*.

4. Hipótesis

La elicitación con metil jasmonato aumentarán los niveles de expresión de los genes que codifican para las enzimas SrDXS, SrIDI y SrKS1-1.

5. Objetivo General

Evaluar los niveles de expresión de los genes que codifican para las enzimas SrDXS, SrIDI y SrKS1-1 en cultivos de plántulas *S. rebaudiana* en condiciones normales y de elicitación.

6. Objetivos específicos

- I. Validar el protocolo de regeneración y propagación a partir de plántulas *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.
- II. Realizar y monitorear las cinéticas de elicitación.
- III. Analizar los niveles de expresión de los ARNm seleccionados.

7. Materiales y Métodos

7.1. Estrategia experimental de trabajo

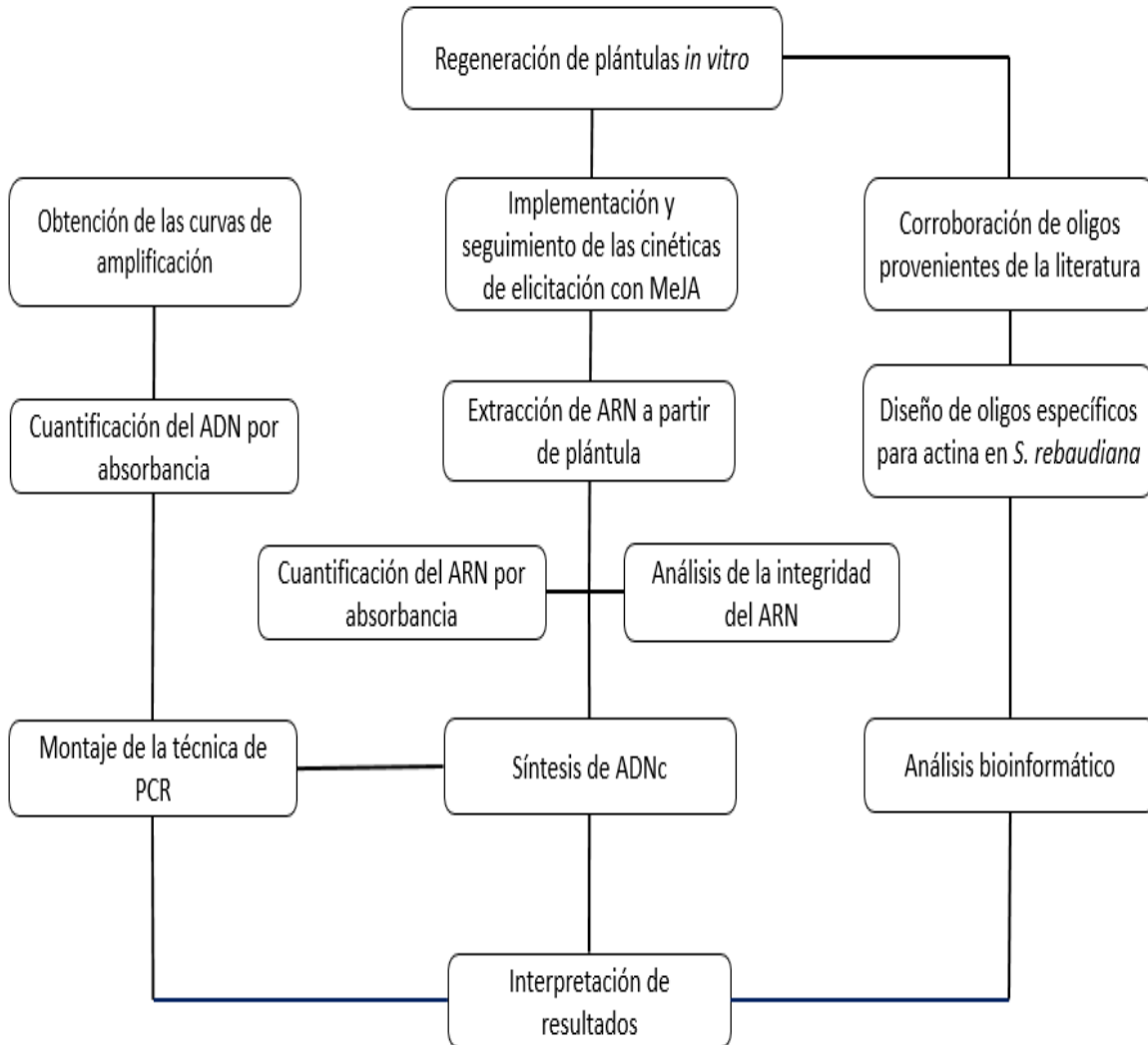


Fig. 4. Estrategia experimental de trabajo. La estrategia experimental se llevó a cabo en respuesta a los objetivos planteados anteriormente.

7.2. Material vegetal

7.2.1. Inducción de Brotes

Para la generación de brotes se partió de plántulas *in vitro* establecidas previamente por Montes-Palmeros (2016), estas plántulas fueron donadas para el experimento por el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan. A partir de este tejido se obtuvieron explantes internodales, los cuales que fueron cultivados en un medio regeneración Murashige y Skoog (MS) (medio MS 2.2 g/L, sacarosa 20 g/L, BAP 1 mg/L, IAA 0.5 mg/L, se ajustó para un pH de 6, agar 8 g/L)(Razak *et al.*, 2014). Se procedió a regenerar en anaquel durante dos semanas a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad.

7.2.2. Obtención de plántulas

Los brotes obtenidos anteriormente fueron traspasados a un medio de enraizamiento MS (medio MS 2.2 g/L, sacarosa 20 g/L, IBA 0.5 mg/L, se ajustó para un pH de 6, agar 8 g/L)(Murashige y Skoog., 1962). Se dejó crecer y enraizar en anaquel durante 45 días a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad.

7.3. Elicitación con MeJA

Se preparó una solución stock de MeJA 174.4 mM (Sigma Aldrich No. Cat. 39924-52-2) la cual se disolvió en 1 ml de etanol al 99 %. La solución se esterilizó con filtros de nylon de $0.48 \mu\text{M}$ previo a su uso (Georgiev *et al.*, 2007).

A partir de la solución *stock*, se prepararon 3 soluciones diluidas con concentraciones distintas de MeJA ($25 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$), con estas soluciones se saturó una torunda de algodón. La torunda de algodón fue esterilizada y posteriormente se procedió a realizar la elicitación en campana, depositando una torunda de algodón sobre el medio de cultivo (Mathew y Sankar, 2012).

7.3.1. Cinéticas de elicitación

Antes de realizar las cinéticas con MeJA, se planteó una cinética para evaluar el control de disolvente (100 μM de etanol). Se estableció un diseño experimental factorial con dos factores: la concentración de MeJA (4 niveles 0, 25, 50 y 100 μM) y el tiempo de exposición (4 niveles 0, 24, 72 y 120 horas).

La primera cinética de elicitación con MeJA (cinética exploratoria), se realizó posterior a los 45 días de enraizamiento. Se estableció un diseño experimental factorial con dos factores: la concentración de MeJA (4 niveles 0, 25, 50 y 100 μM) y el tiempo de exposición (4 niveles 0, 24, 72 y 120 horas).

La cinética para el control de disolvente, sirvió para descartar un posible sesgo en el efecto fisiológico del etanol que pudiera afectar la expresión de los genes de estudio y por ende la producción de GE.

La cinética de exploración sirvió de referencia para obtener una perspectiva global sobre los perfiles de crecimiento de los cultivos y la producción de los GE. En el transcurso de ambas cinéticas se monitoreó el efecto fisiológico en el desarrollo de la plántula y los perfiles de expresión de los genes que codifican para las enzimas DXS, KS, IDI y ACTINA.

La toma de muestra se realizó por triplicado. Se recolectó 300 mg de material vegetal para las extracciones de ARN total. El tejido fue congelado en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

Para la segunda cinética el diseño experimental se planteó basado en los resultados obtenidos de la cinética de exploración. Se estableció un diseño experimental factorial con dos factores: la concentración de MeJA (dos niveles 0 y 25 μM) y el tiempo de exposición (7 niveles 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 120 horas). Los parámetros monitoreados en

el transcurso de esta cinética fueron los mismos que los parámetros antes mencionados.

7.4. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el protocolo de extracción convencional de trizol (Life Technologies 15596-026) siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones.

Para ello se partió de 100 mg del tejido, el cual fue macerado en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero y pistilo hasta obtener un polvo fino color verde pastel. Se colocó el tejido triturado en un microtubo nuevo y estéril. Se adicionó 1 mL del reactivo de trizol (tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo). Se agitó en el vortex hasta homogeneizar la muestra y se dejó reposar por 3 min. Posteriormente, se agregó 0.2 mL de cloroformo grado biología molecular y se agitó manualmente por inversión de 20 a 30 seg. Se incubó en hielo por 3 minutos y se centrifugó a 34,965 g por 15 minutos a 4 °C.

Después de este paso la mezcla se separó en dos fases. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en un micro tubo nuevo y estéril. Se añadió 0.5 mL de isopropanol absoluto y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 34,965 g durante 10 minutos a 4°C. Se decantó la solución teniendo precaución de no perder la pastilla de RNA, que fue lavada posteriormente con 1 mL de etanol al 80%. Continuando con la extracción se centrifugó a 22,377 g durante 5 minutos a 4 °C.

Se desechó el lavado conservando solo la pastilla de ARN. Por último, la pastilla se resuspendió en 50 µL de agua tratada con DEPC (dietil-pirocarbonato) y se procedió a almacenar las extracciones a -80°C en el ultracongelador.

7.5. Cuantificación del ARN

La determinación de la concentración y pureza del ARN se realizó empleando un equipo espectrofotométrico (NanoDrop™ 2000 Thermo Scientific) en base al criterio de la relación (A260/280) correspondiente a la absorbancia de ácidos nucleicos y proteínas. Si la proporción es mayor de 1.8 es aceptado como ADN de buena calidad y pureza, mientras que una proporción superior a 2.0 es la indicada como pura o de buena calidad para ARN. Si la relación es menor en cualquiera de los dos casos, pudiera indicar la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben fuertemente cerca de los 280 nanómetros (NanoDrop Technical support bulletin). Se utilizó 1 µL de agua tratada con DEPC para calibrar el lector y emplearlo como blanco en el transcurso de las mediciones.

7.6. Determinación de la integridad del ARN

La integridad de los productos de la extracción se analizó por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1 %, con el fin de evidenciar la integridad de las especies principales y descartar las muestras que exhibieran degradación.

El protocolo utilizado para la electroforesis se describe a continuación. Se pesó 1 gramo de agarosa, se disolvió y fundió en 72 ml de agua DEPC, se agregaron 10 mL de MOPS (ácido sulfónico 3-morpholinopropano-1) 10 X y 18 ml de formaldehído.. Se mezclaron 600 nanogramos de muestra con 1 µL del buffer de carga para RNA 5X. Las muestras en el gel se separaron aplicando un campo eléctrico de 80 voltios por 1 hora, con un buffer de corrida MOPS 1X. Por último, se reveló el gel en el fotodocumentador mediante la exposición a luz UV (Sambrook y Russell., 2001).

7.7. Síntesis de ADNc

Para las síntesis de ADNc se utilizó el kit GeneAmp RNA PCR Corekit, (N8080143 Applied Biosystems) siguiendo la metodología del fabricante. El kit GeneAmp RNA PCR Corekit es un sistema diseñado para la detección de alta fidelidad y sensibilidad para el análisis de moléculas de ARN. La síntesis de ADNc se realizó utilizando el oligo d(T)₁₆ cuya secuencia se encuentra en la gran mayoría de los ARNm eucariotas y es recomendado cuando se requiere amplificar el mayor número de ARNm posibles presentes en la muestra.

Se descongeló, mezcló y centrifugó brevemente cada componente antes de su uso, esto para evitar la formación de burbujas al mezclar las enzimas. El Master Mix se preparó en campana como se indica en Tabla 6, la muestra y los oligos fueron los últimos componentes añadidos a la mezcla. A continuación la reacción se incubó con el apoyo del termociclador como se indica en la Tabla 7. Una vez terminado el programa, los productos de PCR fueron almacenados a -80°C en el ultracongelador.

Tabla 6. Preparación del master mix para la síntesis de ADNc

Componentes	Volumen
Agua DEPC	~20 µL
Buffer II de PCR 10X	2 µL
25µM MgCl ₂	4 µL
10µM dNTP _s (X4)	8 µL
Inhibidor RNasa	1 µL
Transcriptasa inversa MuLV	1 µL
Oligo d(T) ₁₆	1 µL
Muestra	3 µL

Tabla 7. Programa para síntesis de cDNA

Temperatura	Tiempo
65°C	5 minutos
4°C	2 minutos
37°C	30 minutos
95°C	5 minutos
4°C	∞

7.8. PCR semicuantitativa

Para la amplificación del ADN de doble cadena se utilizó la enzima Platinum® Taq DNA Polimerasa (Cat. 10966-018). Como control de normalización se utilizó el gen constitutivo que codifica para actina en *S. rebaudiana*, sobre el cual se realizó un diseño de oligos específicos para amplificar un fragmento de la secuencia (acceso NCBI AF548026.1). El diseño de estos oligos se efectuó considerando las condiciones de amplificación estándar para temperatura de fusión y extensión de los mismos mediante la herramienta bioinformática Primer 3 (Untergasser *et al.*, 2012) la cual se encuentra disponible en línea (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Los análisis de hibridación de los oligos tomados la literatura se realizaron en la herramienta Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Los genes de análisis para este estudio (Tabla 4) fueron seleccionados en base al papel que cumplen en la regulación de la ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol de acuerdo a lo reportado en la literatura. Los iniciadores de ADN utilizados para las amplificaciones por PCR (Tabla 8) fueron los reportados por Kumar *et al.*, (2011).

Para determinar la abundancia de los transcritos para DXS, KS e IDI se siguió una estrategia de cuantificación relativa, los datos obtenidos fueron expresados como

relativos al gen que codifica para actina en Stevia y fueron referidos como el número de veces en que aumentan o disminuyen en comparación a este.

El procedimiento de amplificación fue el siguiente. Se descongeló, mezcló y centrifugó brevemente cada componente antes de su uso para evitar la formación de burbujas al mezclar las enzimas. El Master Mix se preparó como se observa en la Tabla 9, la muestra y los oligos fueron los últimos componentes añadidos a la reacción. A continuación las reacciones se incubaron en el termociclador (95 °C, 1 min; 60 °C, 15 seg; 72 °C, 30 seg (35 ciclos)). Una vez terminado el programa las muestras se almacenaron a -20°C en el congelador.

Los amplificados fueron cuantificados por la determinación de absorbancia a 260 nm y su pureza respecto a proteínas fue determinada por la relación A_{260nm}/A_{280nm} , y estos resultados fueron usados para la determinación de la abundancia de transcritos y consecuentemente los niveles de expresión. Los geles con las muestras de amplificación sobre cDNA fueron analizados para determinar su intensidad mediante el software ImageJ (<https://imagej.net>).

Tabla 8. Iniciadores de ADNc para la PCR semiconstitutiva

Templado	Oligo directo(5'-3')	Oligo Reverso (5'-3)	Producto	Programa de PCR punto final
SrDXS	GATCTACAAAAGTTACCGGTTC	TCCTCTACGGTAAGTAAGACTTC	476	94 °C, 30 s; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min (29 ciclos)
SrKS1-1	GAGAGAAGCTATATGGACAAGAG	GATGTCCTTCACAGTATCAAGA	493	94 °C, 30 s; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min (33 ciclos)
SrIDI	TATGAGTTACTCCTTCAGCAAC	AGGTAGTCAAGTTCATGTTCTC	269	94 °C, 30 s; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min (31 ciclos)

Tabla 9. Preparación del Master Mix para la amplificación de ADN

Componentes	Volumen (μl)
Agua libre de nucleasas	14.12
Buffer PCR 10X	2
MgCl ₂ 50 mM	0.6
Mix dNTP's 10 mM	0.4
Oligo directo 10 μ M	0.4
Oligo reverso 10 μ M	0.4
Platinum ® Taq DNA Polimerasa	0.08
Templado cDNA	2

8. Resultados

8.1. Regeneración de plántulas *in vitro*

8.1.1. Inducción de brotes

El cultivo de los explantes en frascos gerber permitió colocar al menos 6 explantes en cada unidad experimental. La respuesta de generación de brotes fue similar en todos los frascos, de manera general se observó que cada explante produjo de 8 a 12 brotes adventicios (Fig. 5). Después de 2 semanas los brotes alcanzaron el desarrollo adecuado (altura aproximada de 4 cm), al término de esta lapso de tiempo fueron transferidos a un medio de enraizamiento (IBA 0.5 mg/l).

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Razak *et al.*, (2014), los cuales indican que el mayor número de brotes en plántulas de *S. rebaudiana* en cultivo *in vitro* se obtiene a partir de segmentos nodales. De manera congruente este trabajo, Sivaram y Mukundan (2003) observaron que la mayor inducción de brotes se obtiene con la adición combinada de IBA e IAA al medio de cultivo. Por otro lado, Ghauri *et al.*, (2013) reportaron que la adición de BAP (1.25 mg/L) fue el tratamiento con el que se obtuvo la mayor respuesta morfogénica de brotes, los cuales alcanzaron una altura mayor a los tres centímetros después de tres semanas de desarrollo.



Fig. 5. Brotes de *S. rebaudiana* después de dos semanas de crecimiento.

8.1.2. Multiplicación de plántulas

Los brotes multiplicados generaron raíces principales, secundarias y adventicias en el intervalo entre 30 a 45 días después del trasplante (Fig. 6 A).

Desde el punto de vista morfológico, las plántulas micropropagadas, mostraron un buen desarrollo foliar, en la mayoría de los casos se presentó un engrosamiento del tallo y eventualmente en algunas plántulas se observó una coloración ligeramente marrón (Fig. 6 B), lo que podría explicarse por el acortamiento de la longitud del tallo como consecuencia de la estimulación y desarrollo de brotes secundarios.

Referente a lo mencionado diversos autores como Salahin *et al.*, (2007) y Laribi *et al.*, (2012) quienes han reportado resultados similares obteniendo la mayor inducción de raíces con la adición de IBA (0.5 mg/L).

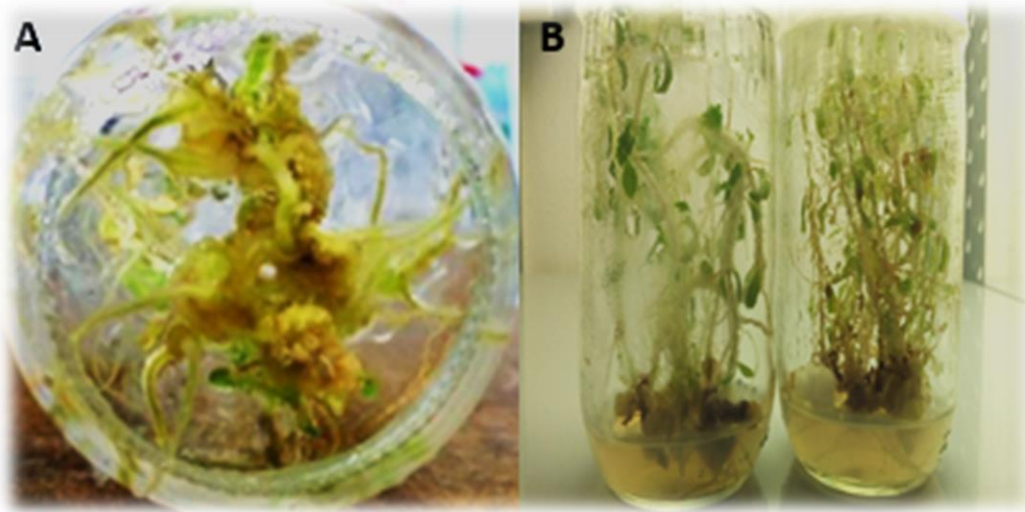


Fig. 6. Inducción de raíces y generación de plántulas *in vitro*. A) Inducción de raíces en plántulas después de 45 días de desarrollo. B) Plántulas de *S. rebaudiana* después de 45 días de crecimiento.

8.2. Respuesta fisiológica ante la elicitación con MeJA

Durante la cinética de exploración se evaluó el efecto fisiológico del MeJA, con el fin de seleccionar las condiciones que pudieran afectar mínimamente el desarrollo y sobrevivencia de las plantas, principalmente por los efectos de los tiempos de exposición extendidos y la respuesta de senescencia inducida (Zhao *et al.*, 2005).

En torno a la respuesta morfológica de las plántulas elicidadas con MeJA se observó que a las 24 horas de exposición en las tres diferentes concentraciones 25 μM , 50 μM y 100 μM no hubo daño fisiológico aparentes con respecto al control (Fig. 7. C, D, E), con respecto a lo observado a las 72 y 120 horas de elicitación con una concentración de MeJA de 25 μM se observó un afectación fisiológica menor (Fig. 7. H y M), contrario a lo observado al aplicar las concentraciones más altas (50 μM y 100 μM) dónde se observó un daño fisiológico sustancial caracterizado por oscurecimiento de los tejidos, clorosis y adelgazamiento de los tallos durante los tiempos de exposición a 72 y 120 horas (Fig. 7. I, J, N y Ñ).

La respuesta morfológica por parte de las plántulas correspondientes al control de disolvente fue visiblemente similar a las plántulas control sin tratamiento (0 μM de MeJA).

Las observaciones realizadas fueron validadas y apoyadas por la determinación experimental del contenido de clorofila y la acumulación de biomasa por Montes-Palmeros (2017). Montes (2017) encontró que los contenidos de clorofila se mantuvieron constantes a la concentración de 25 μM , sin embargo estos cayeron entre 15-20% y de 48-58% en los tiempos de exposición de 72 y 120 horas respectivamente. Estas observaciones llevaron a seleccionar la concentración de 25 μM como la idónea para los siguientes experimentos sin afectar el desarrollo primario de la planta.

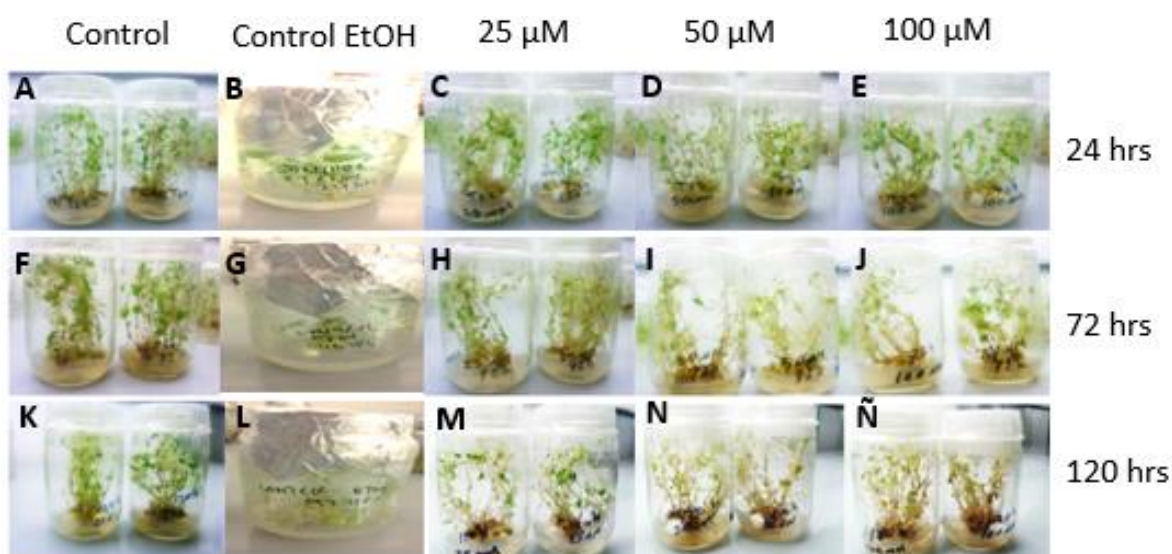


Fig. 7. Respuesta fisiológica de las plántulas elicidadas con diferentes concentraciones de MeJA (25 μM , 50 μM y 100 μM), y plántulas elicidadas con etanol. Figura: A, F y K; control (0 μM MeJA); figura: B, G y L; control etanol; figura: C, H y M; plántulas elicidadas con 25 μM ; figura: D, I y N; plántulas elicidadas con 50 μM de MeJA; figura: E, J y Ñ; plántulas elicidadas con 100 μM de MeJA.

8.3. Corroboración y diseño de oligos

El análisis de la especificidad de los oligos se realizó con la herramienta Primer Blast, la cual se encuentra disponible en línea a través del NCBI. Primeramente se corroboró que efectivamente los oligos provenientes de la literatura que codifican para las enzimas DXS, KS e IDI hibridaban con la secuencia genética correspondiente (Fig. 8) y amplifican para un determinado número de bases.

El planteamiento de los oligos específicos para actina (gen control) en *S. rebaudiana* se realizó un diseño propio a partir de la secuencia que se encuentra reportada en la base de datos (No. Acceso AF548026.1). El diseño del par de oligos se realizó con ayuda de la herramienta Primer 3, teniendo en cuenta las consideraciones generales para el diseño de cebadores específicos (Cáceres y Montoya., 2002). El uso de este software nos permitió calcular y controlar ciertos parámetros pertinentes al diseño de los oligos como el tamaño del producto amplificado, estabilidad de cada producto, contenido de guaninas y citosinas, temperatura de alineamiento (T_m), formación de estructuras secundarias, falso apareamiento de cada oligo, entre otros. La secuencia del oligo directo hibrida específicamente entre los nucleótidos 775 y 794, mientras que el oligo reverso lo hace entre los nucleótidos 924 y 905 (Fig. 8), el par de oligonucleótidos amplifican una región de 150 pb del gen que codifica para actina en *S. rebaudiana*.

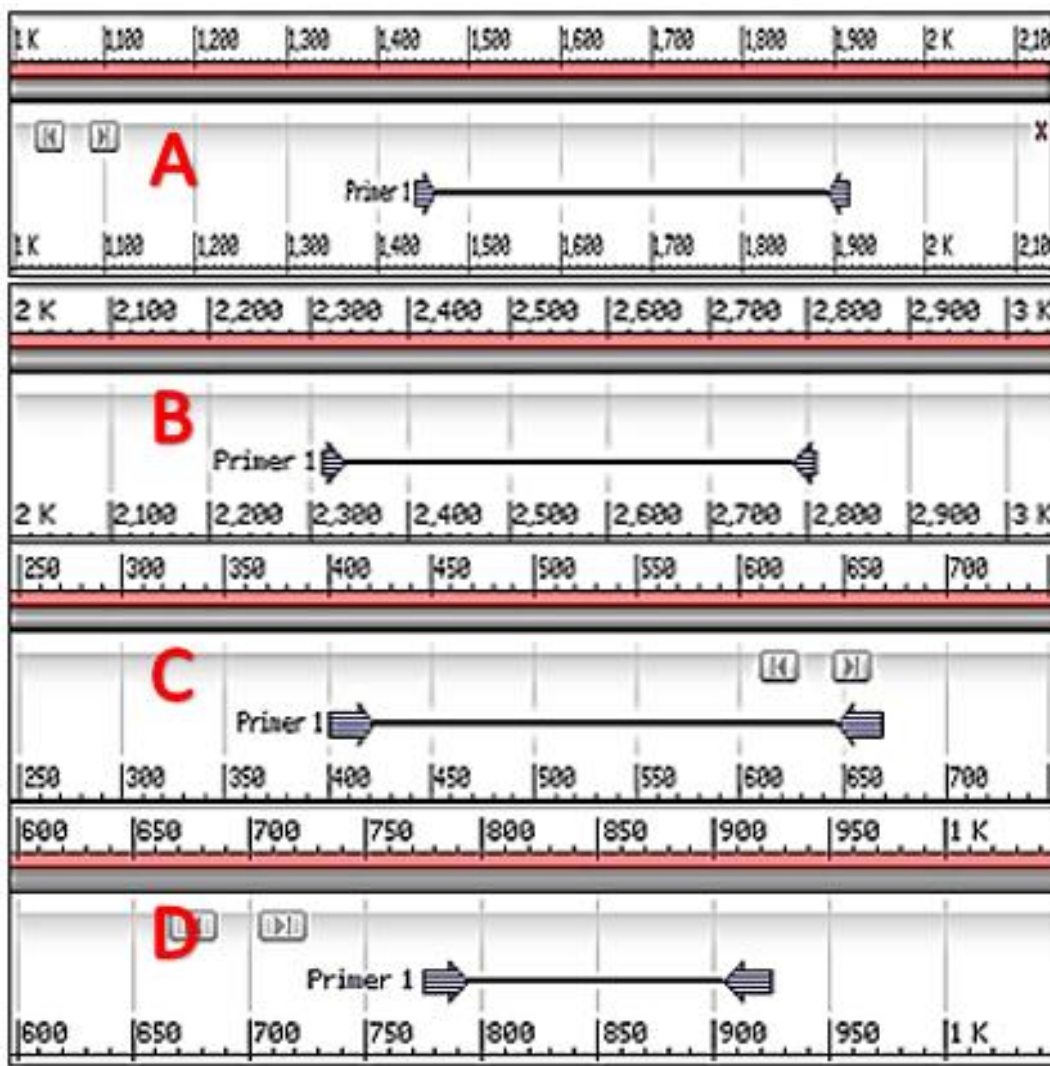


Fig. 8. Ubicación gráfica de los oligo directo y reverso utilizados para las amplificaciones en este trabajo. Las flechas rayadas representan la hibridación gráfica de los oligos con la secuencia del gen de la enzima correspondiente, la línea negra simboliza el producto de amplificación. A: hibridación de los oligos directo y reverso del gen que codifica para DXS; B: para KS; C: para IDI; D: para actina.

8.4. Extracción, cuantificación y análisis de integridad de ARN total

Las muestras obtenidas de las unidades experimentales de cada punto de muestreo considerado en las cinéticas de elicitación fueron sometidas al proceso de extracción por la técnica de Trizol mencionada anteriormente. Inicialmente, para cada extracto se determinó la concentración y pureza del ARN presente en la muestra a través de sus lecturas de absorbancia a 260nm y 280nm.

Las muestras analizadas en el espectrofotómetro correspondientes a cinética de exploración, a las tres diferentes concentraciones de MeJA se muestran en la tabla 10. De manera general se observó una media de 1.76 con respecto a la relación de pureza (A260/280), mientras que la media con respecto a la concentración de las muestras fue de 223 ng/μl. Para la segunda cinética (Tabla 11) a una sola concentración de MeJA (25 μM), la media correspondiente a la relación A260/280 fue de 1.81, por otro lado la media para la concentración de las muestras fue de 369 ng/μl. De acuerdo con Sambrook y Russell, (2001) los valores de lectura de densidad óptica entre 1.8 y 2.0 proporcionan una estimación de pureza de los ácidos nucleicos obtenidos, por lo tanto los resultados observados son indicativos de una pureza aceptable para ARN prácticamente libre de proteínas y con buenos rendimientos de recuperación.

Tabla 10. Valores de concentración y pureza de las extracciones de RNA total de la cinética de exploración (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M).

Muestra	Relación A260/280	Concentración (ng/ μ l)
Control T0	1.86	415.4
Control EtOH	1.78	358.4
Control 24	1.80	294
Control EtOH	1.77	346.3
MeJA 24 (25 μ M)	1.86	347.9
MeJA 24 (50 μ M)	1.71	136.3
MeJA 24 (100 μ M)	1.72	171.9
Control 72	1.65	172.4
Control EtOH	1.80	296.5
MeJA 72 (25 μ M)	1.7	171.6
MeJA 72 (50 μ M)	1.8	106.3
MeJA 72 (100 μ M)	1.8	136.9
Control 120	1.7	125.1
Control EtOH	1.83	254.8
MeJA 72 (25 μ M)	1.75	153.1
MeJA 72 (50 μ M)	1.71	181.1
MeJA 72 (100 μ M)	1.75	135.9

Tabla 11. Valores de concentración y pureza de las extracciones de RNA total de la cinética a una sola concentración (25 μ M).

Muestra	Relación A260/280	Concentración (ng/ μ l)
Control T0	1.9	307.5
Control 6	1.7	382
MeJA 6 25 μ M	1.7	381
Control 12	2.06	371
MeJA 12 25 μ M	1.79	491
Control 24	1.63	278
MeJA 24 25 μ M	1.86	271
Control 48	1.81	317
MeJA 48 25 μ M	1.6	574
Control 96	1.94	429
MeJA 96 25 μ M	1.81	360
Control 120	1.94	429
MeJA 120 25 μ M	2.13	202

Una vez que los extractos de ARN total estuvieron cuantificados, fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante para evaluar su integridad. Todas las muestras fueron analizadas buscando la integridad de las especies principales ARN en el extracto y descartar las muestras que exhibieran degradación para los siguientes análisis de semicuantificación.

Según Hernández y Guzmán (2013) la presencia de las bandas de RNAs ribosomales 25S y 18S son una prueba concluyente sobre la ausencia de degradación aparente. En la figura 9 se observa una imagen representativa sobre la calidad de las extracciones, las muestras cuya calidad no fue suficiente para realizar los experimentos posteriores fueron descartadas repitiendo la extracción de ARN correspondiente a ese punto.

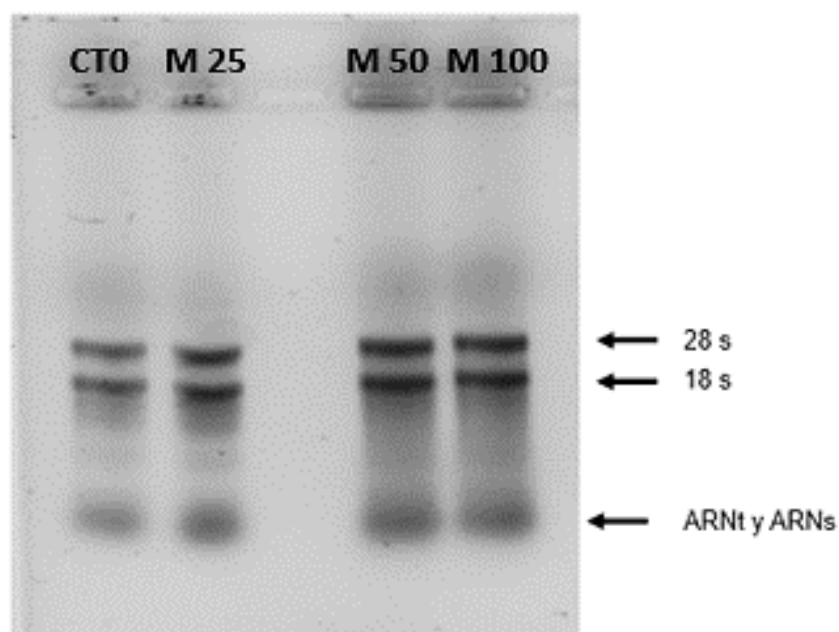


Fig. 9. Gel de integridad de ARN. CT0: Control tiempo cero; M 25: Plántula elicitada con 25 μ M a las 24 horas; M 50: plántulas elicitada con 50 μ M durante a las 24 horas; M 100: plántula elicitada con 100 μ M de MeJA a las 24 horas.

8.5. Estandarización de las condiciones de PCR

Los juegos de oligos utilizados se probaron por primera vez dentro del grupo de trabajo en este proyecto, debido a esta situación se procedió a realizar experimentos de estandarización y validación con el fin de fijar los parámetros que se emplearon para las amplificaciones semicuantitativas. Los principales factores que se consideraron fueron la temperatura de alineamiento de los oligos y la concentración del templado utilizado.

Se calculó la Temperatura de fusión (T_m) de los 4 juegos de oligos (DXS, KS, IDI y control ACTINA), mediante el programa T_m Calculator, el cual se encuentra disponible en línea (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>). Posteriormente se realizó un barrido de temperaturas para determinar la temperatura de alineamiento que rindiera mejores resultados de amplificación para los 4 juegos de oligos durante la PCR (Tabla 12).

El barrido de temperaturas se realizó ubicando el límite inferior dos grados centígrados hacía abajo y el límite superior dos grados hacía arriba de la T_m promedio calculada por el programa para cada par de oligos. Adicionalmente, para cada mezcla de reacción se utilizaron dos cantidades diferentes de templado proveniente de las reacciones de síntesis de cDNA 1 μ L y 2 μ L.

Tabla 12. Barrido de temperaturas sobre los oligos seleccionados

Oligo	T_m LI ($^{\circ}$ C)	T_m promedio ($^{\circ}$ C)	T_m LS ($^{\circ}$ C)
DXS	58	60	62
KS	58	60	62
IDI	56	58	60
ACTINA	56	58	60

LI: límite inferior, LS: límite superior.

Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Fig. 10). Se mezclaron 3 μ l de la reacción de PCR con el buffer de carga TAE 10X (Tris Acetato EDTA), el gel se corrió a 80 voltios por 40 minutos en un buffer de corrida TAE 1 X, para la visualización de los productos se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.01 mg/mL).

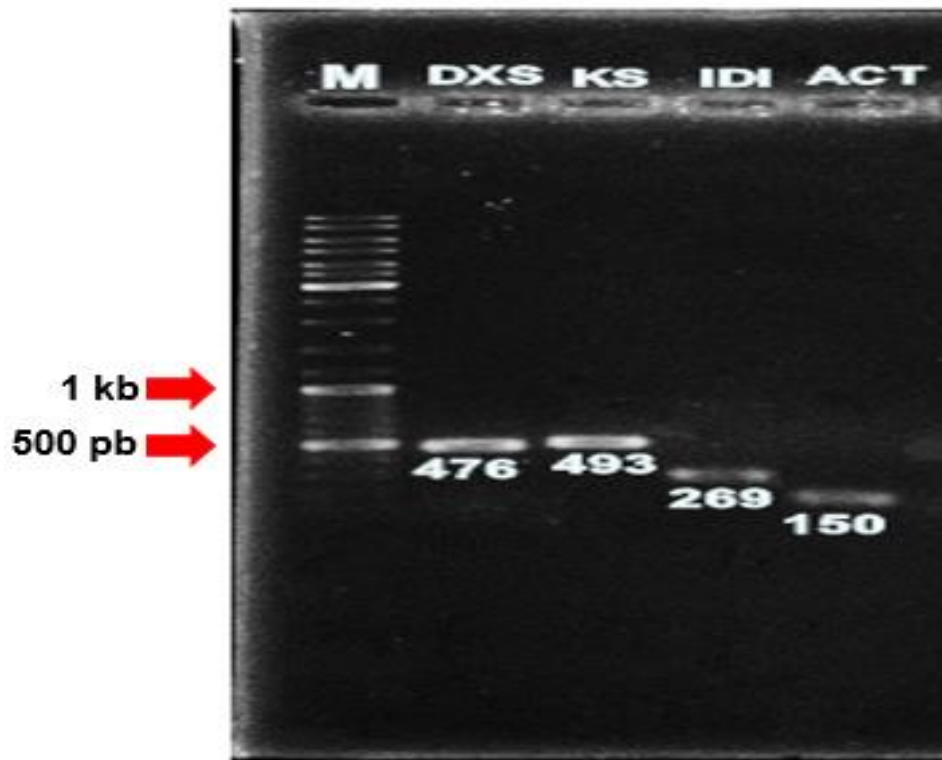


Fig. 10. Verificación de los productos de la amplificación de PCR. Carril 1: marcador (M); carril 2: xilulosa sintasa (DXS); carril 3: kaureno sintasa (KS); Carril 4: dimetil pirofosfato isomerasa (IDI); Carril 5: actina (ACT, control).

8.6. Análisis semicuantitativo de las curvas de amplificación

8.6.1. Efecto de la elicitación con etanol

Como fue mencionado anteriormente, el agente elicitor MeJA fue disuelto en etanol para su aplicación en los tratamientos con diferentes concentraciones del compuesto, por este motivo fue necesario evaluar si el efecto sobre los perfiles de expresión genética eran consecuencia del tratamiento directo con MeJA y no del etanol.

Debido a esta razón se compararon los niveles de expresión de los tres genes de estudio sin tratamiento (0 μM MeJA) contra el control de disolvente representado por un grupo de plántulas tratadas con 100 μM de etanol (Fig. 11).

De manera general se observó un comportamiento similar en la expresión genética de las plántulas control sin tratamiento con MeJA y las plántulas tratadas con etanol. La prueba de medias t de Student reveló que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos sistemas, empleando un nivel de significancia del 0.5%.

El motivo de realizar esta cinética fue el de minimizar un posible sesgo en el efecto de elicitación y aislar el efecto real, ya que estudios recientes realizados por Álvarez *et al.*, (2016), indicaron que la adición de metanol al 368 mM en el medio de cultivo de plántulas de Stevia, propicia la acumulación diferencial de diversos compuestos bioquímicos tales como fenoles, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos. Este mismo estudio propone que la adición de metanol al 24.5 mM, aumenta los niveles de acumulación de los GE dos veces más, respecto a las plantas control sin tratamiento. Con nuestros resultados pudimos corroborar que la modificación en los patrones de expresión de los genes que codifican para las enzimas DXS, KS e IDI, en particular para nuestro trabajo, se debe únicamente a la elicitación con MeJA. Debido a que el MeJA es un compuesto volátil, la metodología empleada para la elicitación permitió que el etanol empleado como disolvente no se adicionara al medio de cultivo, por lo que no tuvo contacto directo con las raíces de las plántulas (Georgiev *et al.*, 2006).

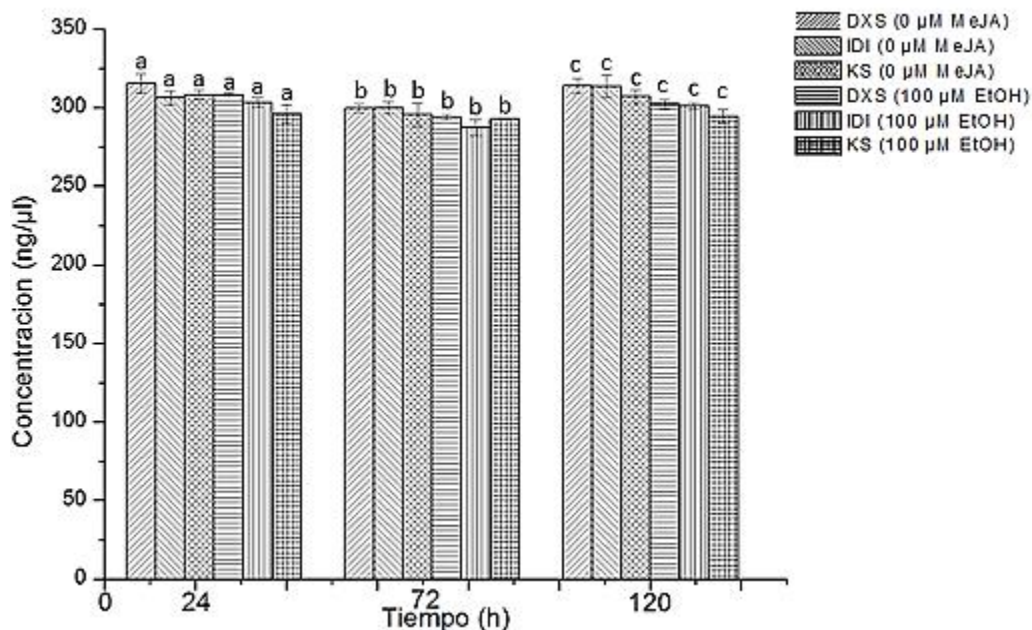


Fig. 11. Expresión de los genes que codifican para las enzimas DXS, IDI y KS a 0 μM de MeJA comparados contra las plántulas elicítadas con 100 μM de etanol. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas, de acuerdo a la prueba t de Student empleando un nivel de significancia del 0.05 %.

8.6.2. Efecto de la elicitación con MeJA

8.6.2.1. Efecto de la elicitación con MeJA en la cinética exploratoria

Para la realización de las perfiles de expresión se procedió a determinar la concentración de los productos de la amplificación por PCR punto final mediante su absorbancia a 260 nm. Las mediciones fueron normalizadas tomando en cuenta la concentración inicial del cDNA y el par de oligos usados para cada caso.

De los tratamientos de elicitación con MeJA planteados para el experimento a 25 μM , 50 μM y 100 μM se observó que la elicitación a una concentración de 25 μM , fue la que produjo una mayor expresión de los tres genes de estudio respecto a la plántula control sin elicitar. Además, se observó que dentro de las primeras 24 horas fue dónde se produjo la mayor expresión para los tres genes en comparación con la planta control;

el incremento en el punto de mayor expresión fue 2.66 veces mayor para DXS (Fig. 12), 2.34 veces para IDI (Fig. 13) y 2.15 veces para KS (Fig. 14). Respecto a los tratamientos con 50 μM y 100 μM no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las plántulas tratadas con MeJA y las plántulas control de acuerdo a la prueba t de Student con un nivel de significancia del 0.05%.

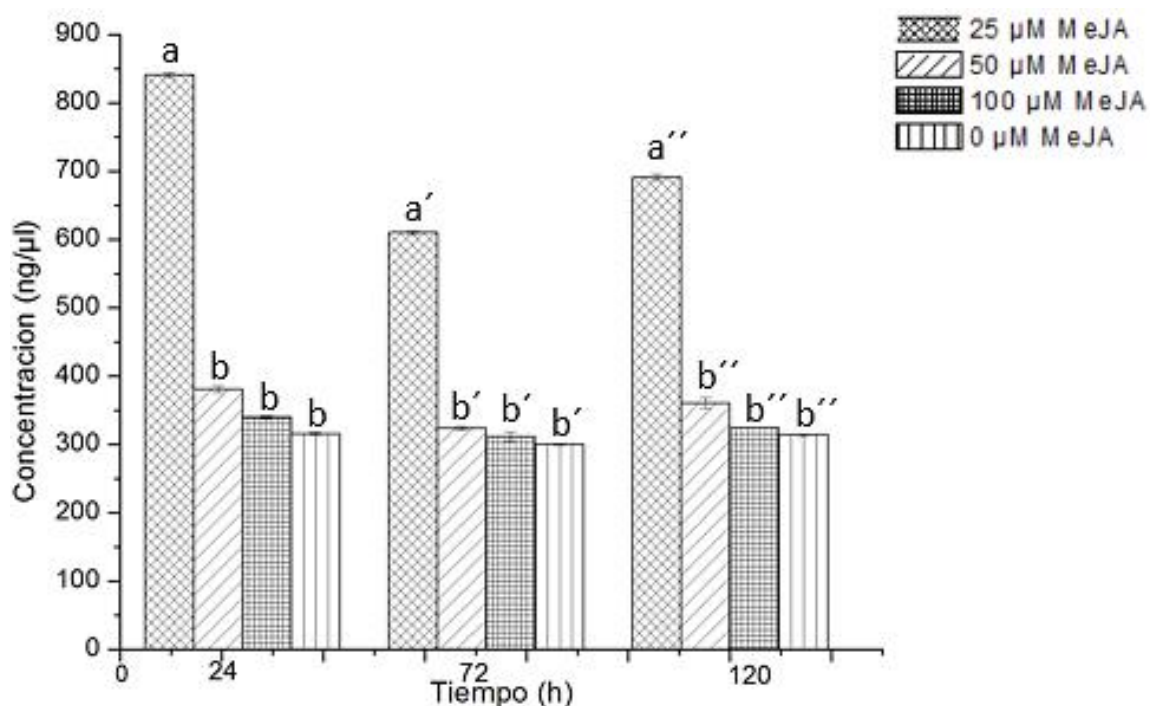


Fig. 12. Expresión del gen que codifica para la enzima deoxilulosa sintasa. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas, de acuerdo a la prueba t de Student empleando un nivel de significancia del 0.05 %.

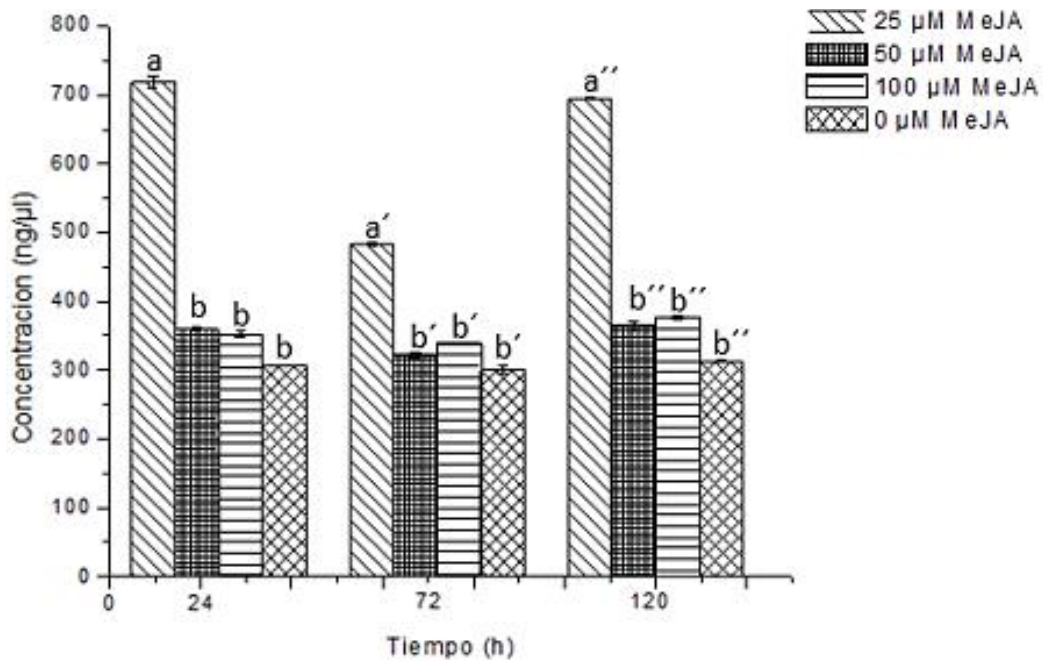


Fig. 13. Expresión del gen que codifica para la enzima Isopentil difosfato isomerasa. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas, de acuerdo a la prueba t de Student empleando un nivel de significancia del 0.05 %.

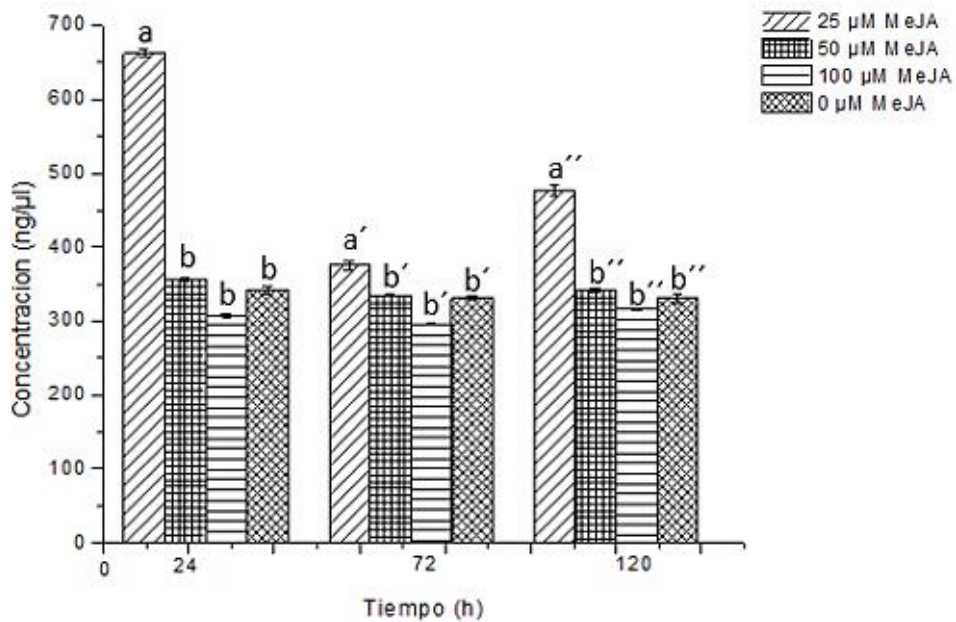


Fig. 14. Expresión del gen que codifica para la enzima kaureno. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas, de acuerdo a la prueba t de Student empleando un nivel de significancia del 0.05 %.

8.6.2.2. Efecto de la elicitación con MeJA en la cinética específica

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, se realizó una segunda cinética elicitando únicamente a 25 μ M de MeJA con mayor definición y frecuencia de muestreo, esto por ser la concentración en la que se observó una mayor expresión genética respecto a la planta control sin elicitar. Los tiempos de toma de muestra fueron reducidos durante las primeras 24 horas, cada 6 horas, debido a que fue dentro de este lapso de tiempo de exposición a MeJA dónde se observaron los mayores picos de expresión.

Para evaluar los cambios en la expresión de los genes de estudio se siguió una estrategia de cuantificación relativa, como se explicó anteriormente. Los datos obtenidos por la cuantificación relativa fueron normalizados con respecto al gen de referencia y se expresaron como el número de veces en que aumentan o decrecen en comparación al gen que codifica para actina específico para Stevia. Se observó que durante las primeras 24 horas de exposición a MeJA fue dónde se produjo la mayor expresión para los tres genes, el aumento percibido en el punto máximo de expresión para cada gen en comparación con el control de normalización de actina fue de 21 % para DXS, 18 % para IDI y de 11 % para KS (Fig. 15).

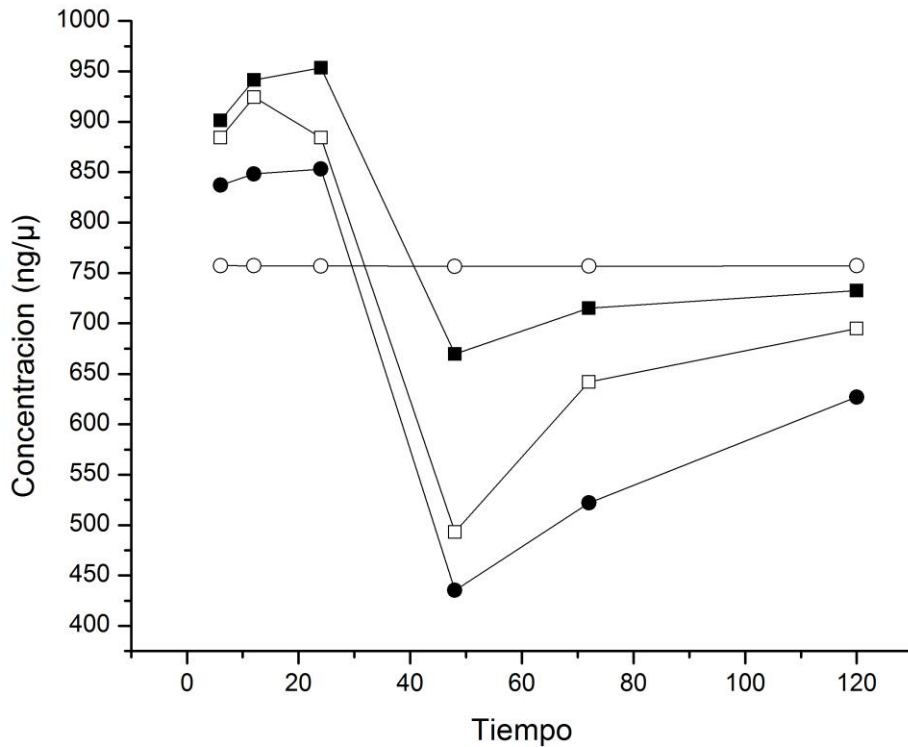


Fig. 15. Análisis de expresión por absorbancia. Expresión del gen que codifica para actina (○), para DXS (■), para IDI (□) y para KS (●), elicitados con 25 μ M de MeJA. Nota: La desviación estándar para esta gráfica en específico no se aprecia debido al amplio intervalo entre las concentraciones de las muestras.

Existen relativamente pocos reportes sobre la comprensión de los mecanismos de regulación y efecto de elicitors en la producción de GE en Stevia. Un estudio previo realizado en *S. rebaudiana*, en condiciones *ex vitro*, en el que se aplicó un estrés por la exposición a MeJA (100 μ M) muestra que los niveles de expresión de una batería de 15 genes de la ruta de biosíntesis (entre ellos DXS, IDI y KS) están regulados negativamente por la elicitación (Kumar *et al.*, 2011). El único efecto de regulación positiva, en este reporte, fue observado por la exposición a 100 μ M de ácido giberélico (GA).

Contrastantemente con lo encontrado en este trabajo, los niveles de expresión de los 3 genes observados se ven regulados positivamente por la exposición a MeJA (Fig. 15). Esta comparación permite sugerir que las condiciones de cultivo y edad de la planta influyen la forma en que algunos genes son regulados por agentes elicitors, además se ha demostrado que la concentración de MeJA que se aplique y el tiempo de exposición a este compuesto se encuentra estrechamente relacionado con la respuesta fisiológica de la planta (Devoto *et al.*, 2005). Cabe recordar que cuando en este estudio se aplicaron las concentraciones de 100 μ M de MeJA, los niveles de expresión de los genes seleccionados también disminuyeron. Adicionalmente, resulta interesante resaltar que los mayores niveles de expresión se presentan en tejido joven, tal es el caso de este estudio en el que se usaron plántulas de aproximadamente mes y medio de edad.

El MeJA, el ácido giberélico y la kinetina son compuestos que son conocidos ampliamente por influenciar la biosíntesis de isoprenoides y en consecuencia de terpenoides también (Choi *et al.*, 2005; Zeneli *et al.*, 2006; Amini *et al.*, 2009), no obstante se han evaluado otros agentes elicitors y condiciones de crecimiento, y su efecto sobre los niveles de expresión y producción de GE. Por ejemplo, Hajihashemi *et al.*, (2013) utilizaron poli etilenglicol, paclobutrazol y GA como agentes modificadores de los patrones de expresión y encontraron que la expresión del gen de KS, entre otros relacionados con la fase tardía de biosíntesis de GE, permanecía relativamente estable bajo las condiciones experimentales aplicadas. De manera similar, también se ha observado que el efecto simulado de sequía por la aplicación de poli etilenglicol a diferentes concentraciones sobre plantas de Stevia crecidas en invernadero reguló negativamente los niveles de expresión del gen de KS (Hajihashemi y Geuns, 2016). Modi *et al.*, (2014) encontraron que los niveles de expresión de casi la totalidad de los genes que conforman la ruta biosíntesis de GE, entre ellos DXS, IDI y KS, se regularon positivamente durante el periodo de aclimatación de plantas micropropagadas de Stevia, y que estos niveles de expresión correlacionaron con aumentos en la acumulación de GE.

Estos reportes, con resultados aparentemente contrastantes, soportan la evidencia de que los genes responsables de la biosíntesis de GE están ampliamente regulados, principalmente por mecanismos transcripcionales, aunque por el momento la propuesta de una ruta canónica de regulación resulta impráctica, debido a la actual falta de estudios centrados en la búsqueda de factores de transcripción específicos de la respuesta en Stevia. A pesar de lo anterior, los resultados que se encontraron en este trabajo muestran que, al menos para las condiciones de elicitación probadas, los genes que codifican para DXS, IDI y KS ejercen control metabólico importante sobre la biosíntesis de GE, esto evidenciado por la estrecha correlación entre los perfiles de expresión y acumulación.

Integrando estos datos particularmente con los obtenidos por el grupo de trabajo, la cuantificación de GE realizada por Montes-Palmeros (2017) mostró un patrón muy similar con los perfiles de expresión mostrados aquí (Fig. 16), sobre todo en las primeras 24 horas de tratamiento, en donde se encontró el pico máximo de GE, sugiriendo una correlación fuerte y positiva de los niveles de expresión con la acumulación de GE; este comportamiento también fue observado por Kumar *et al.*, (2011).

El efecto de MeJA en sistemas vegetales diferentes a Stevia ha sido abordado ampliamente, por ejemplo Goklany *et al.*, (2009) realizaron un análisis de expresión por RT-PCR cuantitativa en condiciones de elicitación con 250 μ M de MeJA sobre raíces pilosas en *Catharanthus roseus*, evaluaron un tiempo de exposición a MeJA de 0, 8, 16 y 24 horas, analizaron los genes G10h, Tdc, Str, y Sgd los cuales se encuentran involucrados en la ruta de biosíntesis de los alcaloides, observaron que el mayor aumento de expresión para los 4 genes de estudio se produce durante las 24 horas de exposición a MeJA, siendo esta de entre 3.1 y 9.1 veces mayor respecto al control, a su vez también observaron el incremento de 160, 440 y 420% en la producción de estreptosidina, amalicina y tabersonina respectivamente, metabolitos asociados a la vía de producción de alcaloides. Por otro lado, Kim *et al* (2010) analizaron el papel regulador del gen BfSS1 que codifica para la escaleno sintasa, una enzima reguladora

del proceso de síntesis de saponinas, en *Bupleurum falcatum*, estudiaron un sistema plantas modificadas genéticamente en condiciones de elicitación con 20 μ M de MeJA, la acumulación del transcrito se monitoreo por un periodo de tiempo de 3, 24, 48 y 96 horas, los resultados indican que la mayor expresión del gen BfSS1 ocurrió durante las primeras 3 horas de exposición al elicitor.

8.7. Determinación de los patrones de expresión por análisis de imagen

Como técnica alternativa para la determinación de los niveles de expresión se utilizó el análisis de imagen de geles con los productos de PCR para cada muestra de la cinética. De manera general se observó que la intensidad de las bandas fue mayor durante las primeras 24 horas del tratamiento, indicando mayor expresión. También se encontró, a simple vista, que la señal con mayor intensidad fue la correspondiente al gen que codifica para la enzima deoxilulosa sintasa DXS, seguido por la isopentil difosfato isomerasa IDI y, finalmente, la kaureno sintasa (Fig. 16).

Adicionalmente, la intensidad de los productos en los geles se analizó con el software ImageJ. Se calculó el área bajo la curva de cada pico generado, los histogramas de las imágenes analizadas se muestran en la figura 17, 18, 19 y 20; y correlacionan directamente con las observaciones hechas previamente con el análisis de cuantificación de amplificadas por absorbancia y, por lo tanto, validan los resultados previamente discutidos.

El análisis de expresión por visualización en gel de agarosa es útil cuando se requieren analizar los perfiles de expresión durante distintas tomas de muestra, en dónde se intuye pudieran existir cantidades variables de ARNm (Gottwald *et al* 2001, Marone *et al*, 2001). Diversos autores han aplicado esta técnica para evaluar la expresión de un gen o grupo de genes cuando se aplica un tratamiento en condiciones diferenciales (Antiabong *et al.*, 2016).

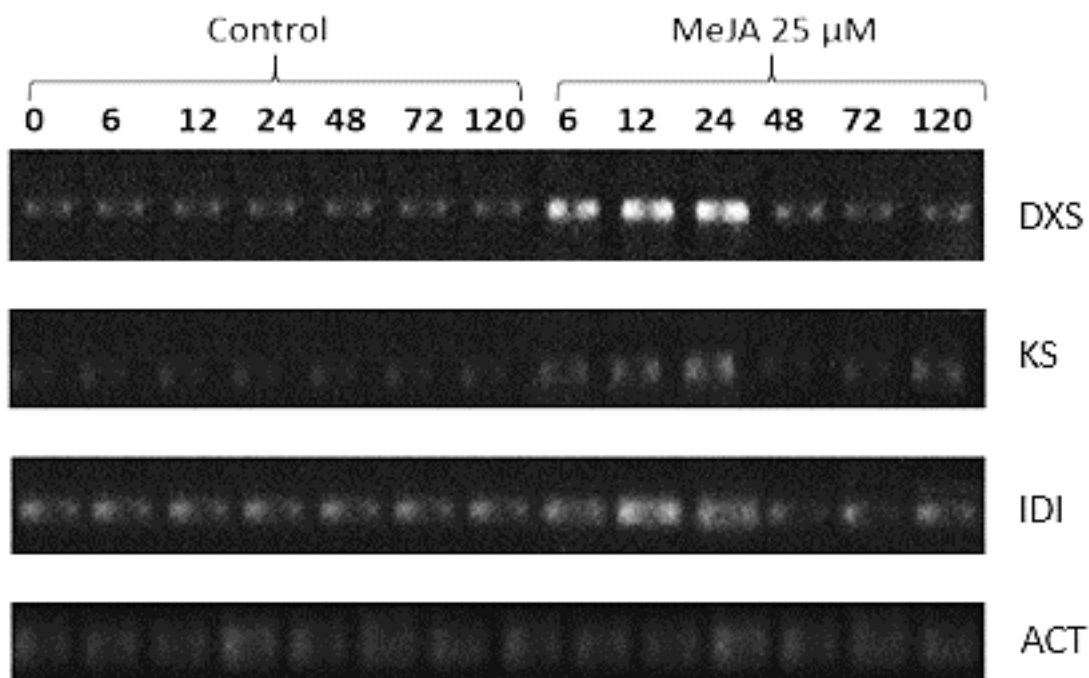


Fig. 16. Análisis de expresión en gel de agarosa. Análisis de expresión de los genes que codifican para las enzimas deoxilulosa sintasa, kaureno sintasa, Isopentil difosfato isomerasa y actina.

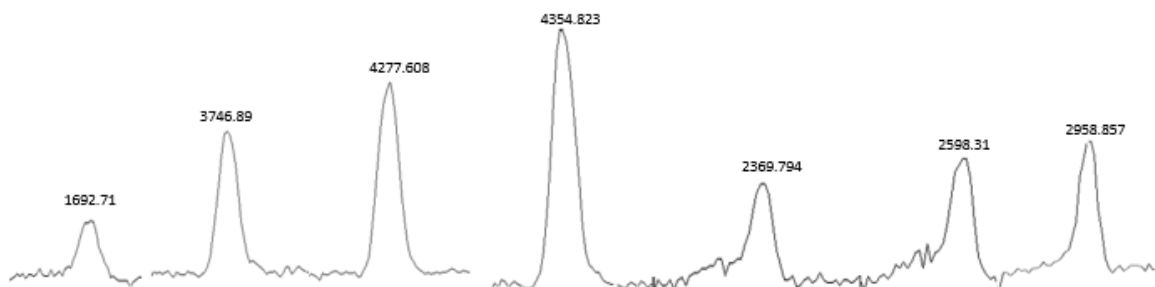


Fig. 17. Análisis de expresión con el software ImageJ del gen que codifica para DXS. Los picos en la imagen representan la intensidad de la banda correspondiente (0, 6, 12, 24, 48, 72 y 120 hrs).

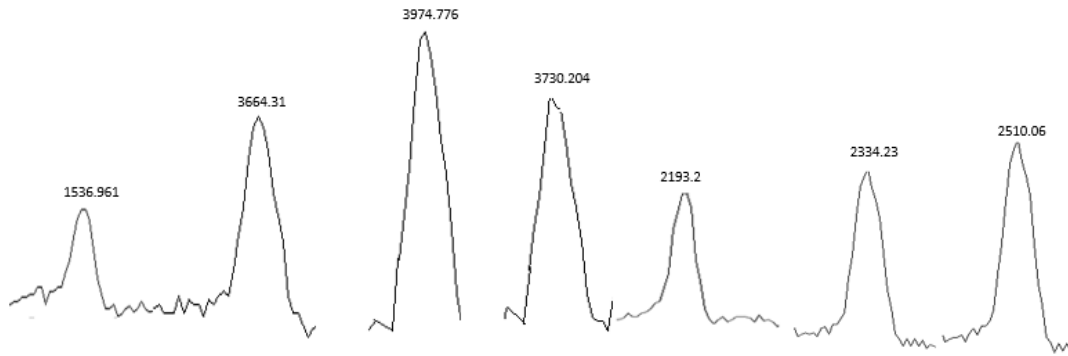


Fig. 18. Análisis de expresión con el software ImageJ del gen que codifica para IDI. Los picos en la imagen representan la intensidad de la banda correspondiente (0, 6, 12, 24, 48, 72 y 120 hrs).

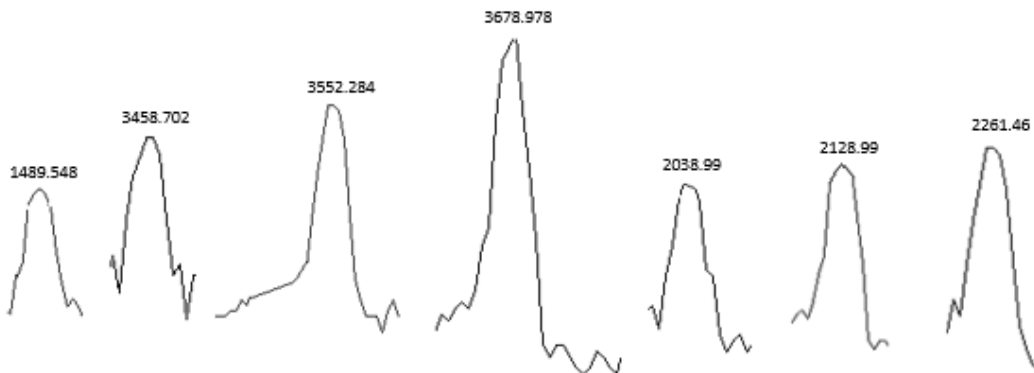


Fig. 19. Análisis de expresión con el software ImageJ del gen que codifica para KS. Los picos en la imagen representan la intensidad de la banda correspondiente (0, 6, 12, 24, 48, 72 y 120 hrs).

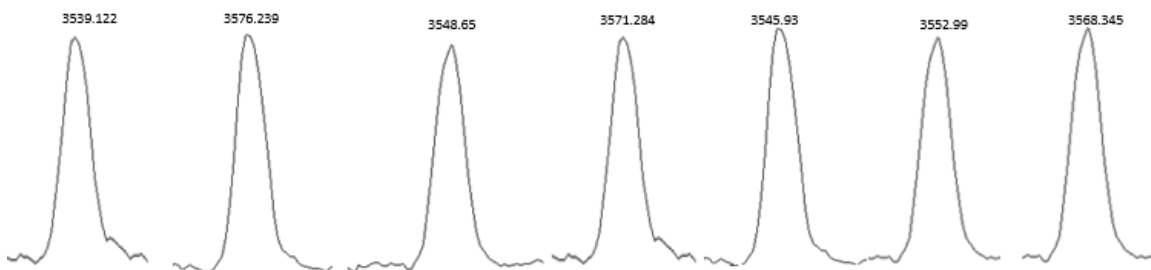


Fig. 20. Análisis de expresión con el software ImageJ del gen que codifica para actina. Los picos en la imagen representan la intensidad de la banda correspondiente (0, 6, 12, 24, 48, 72 y 120 hrs).

9. Conclusiones

El protocolo implementado de regeneración de *Stevia rebaudiana*, a partir de explantes nodales resulto más eficiente que lo reportado hasta el momento, permitiendo generar mayor cantidad de plántulas en menos tiempo.

La estrategia propuesta para utilizar tres diferentes concentraciones de MeJA permitió determinar una concentración para evaluar satisfactoriamente las diferencias en los perfiles de expresión de los tres genes seleccionados (DXS, KS e IDI), además de que con la definición de las cinéticas se pudo identificar el tiempo de mayor expresión, y por ende, el punto de mayor efecto del tratamiento.

El aumento en los perfiles de expresión de los genes elicitados con MeJA, permite proponer que los genes responsables de la biosíntesis de GE están ampliamente regulados, principalmente por mecanismos transcripcionales; los reportes indican que los mayores niveles de expresión se presentan en tejido joven, tal es el caso de este estudio en el que se usaron plántulas de aproximadamente mes y medio de edad.

Los perfiles de expresión encontrados en este trabajo (Fig. 16), particularmente en las primeras 24 horas de tratamiento, mostraron un patrón similar a lo obtenido en la cuantificación de GE realizada por Montes-Palmeros (2017), sugiriendo una correlación fuerte y positiva de los niveles de expresión con la acumulación de GE.

10. Perspectivas

- Analizar la expresión de otros ARNm involucrados en la biosíntesis de los GE en *Stevia rebaudiana*, con la finalidad de corroborar el papel de los genes ya analizados en la regulación de la ruta completa.
- Evaluar la respuesta de expresión de estos genes, sometidos al efecto de otros agentes elicitores.
- Integrar los resultados de expresión encontrados para proponer una estrategia de ingeniería metabólica que permita generar cultivos hiper productores de GE.

11. Bibliografía

1. Álvarez Robles M. J., López Orenes A., Ferrer María A, Calderón Antonio A., 2016., Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* shoot cultures.
2. Amini, A., Glevarec, G., Andreu, F., Rideau, M., Creche, J., 2009. Low levels of gibberellic acid control the biosynthesis of ajmalicine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta Med.* 75, 187–191.
3. Antiabong John F., Ngoepe Mafora G. and Avechi Adakole S., 2016. Semiquantitative digital analysis of polymerase chain reaction electrophoreses gel: Potential applications in low income veterinary laboratories.
4. Baenas Nieves, García Viguera C. and Moreno Diego A., 2014. Elicitation: A Tool for enriching the bioactive Composition of Foods. *Molecules*; 19, 13541-13563.
5. Beneford, D. J., DiNovi, M., Schaller, J., 2006. Steviol glycosides. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additive Series. WHO, Geneva, pp. 117-143.
6. Brandle J. E. and Telmer P. G., 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68; 1855-1863., Elsevier.
7. Brandle J. E. and Rosa N., 1992. Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Can. J. Plant Sci.* 72:1263-1266.
8. Browse J., 2009. Jasmonate Passes muster a receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:183-205.
9. Bondarev N., Sukhasanova M. A., Reshenyak O. V. and Nosov A. M., 2002a. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny.
10. Bondarev N., Reshetnyak O., Nosov A., 2002b. Features of Development of *Stevia rebaudiana* Shoots Cultivated in the Roller Bioreactor and their Production of Steviol Glycosides.

11. Bondarev N., Reshetnyak O., Nosov A., 2001. Peculiarities of diterpenoide steviol glycoside production in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Science* 162: 155-163.
12. Cáceres R. O., Montoya Piedra Ysabel., 2002. Diseño y evaluación de oligonucleótidos para la detección de *Leishmania* por PCR.
13. Ceunen S., and Geuns Jan M.C., 2013. Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. *J. Nat. Prod.*, 76, 1201-1228.
14. Choi, D.-W., et al., 2005. Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. *Plant Cell Rep.* 23, 557-566.
15. Debnath M., 2008. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 2(2), pp. 045-051.
16. Devoto A., Ellis C., Magusin A., Chang H. S., Chilcott C., Zhu T., y Turner G. John, 2005. Expression profiling reveals *COI1* to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defense, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology* 58:497-513.
17. Douglas K. A., 2002. *Stevia* the genus *Stevia*. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, University of Illinois at Chicago, USA.
18. Eisenreich W., Rohdich F., and Bacher A., 2001. Deoxixilulosa phosphate pathway to terpenoids. *Plant Science* Vol. 6: No. 2.
19. Estévez Juan M., Cantero A., Reindl A., Reichler S., y León P., 2001. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase, a Limiting Enzyme for Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.276, No. 25, pp. 22901-22909.
20. Ferrari S., 2010. Biological elicitors of plant secondary metabolites: Mode of action and use in the production of nutraceuticals. *Advances in experimental Medicina and Biology*.
21. Freman Willard M., Walker Stephen J. y Vrana Kent E., 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potencial. *BioTechniques* 26:112-125.

22. Garcia Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., and Pugin A., 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *The American Phytopathological Society*; Vol. 19, No.7, pp. 711-724.
23. Gauchan D. P., Dhakal A., Sharma N., Bhandari S., Maskey E., Shrestha N., Gautam R., Giri S., and Gurung Sushma., 2014. Regenerative callus induction and biochemical analysis of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*. Volume V, Issue III.
24. Ghauri E. G., Siddique A. M., Gul Akhtar M., Inayatouri R., and Muhammad A., 2013. Micro-Propagation of *Stevia Rebaudiana* Bertoni Through root explants. *Pak. J. Bot.*, 45(4): 1411-1216.
25. Georgiev M. I., Kuzeva S., Pavlov A., Kovacheva E. G., and Ilieva M. P., 2007. Elicitation of rosmarinic acid by *lavandula vera* MM cell suspension culture with abiotic elicitors. *World J Microbiol Biotechnol*; 23:301-304.
26. Geuns, Jan .M.C., 2003. Molecules of interest Stevioside. *Phytochemistry* 64; 913-921.
27. Goklany S., H.Loring Ralph, Glick J., and W. T. Lee-Parsons Carolyn 2009. Assessing the Limitations to Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus* Hairy Root Cultures through Gene Expression Profiling and Precursor Feeding. *Biotechnol. Prop.*, Vol. 25, No. 5.
28. Gregersen S., Jeppesen P. B., Holst J. J., and Hermansen K., 2004. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism*, Vol 53, No 1: pp 73-76.
29. Guevara García A., San Román C., Arroyo A., Cortés M. E., Gutiérrez Nava M. L., and L. P., 2005. Characterization of the *Arabidopsis clb6* Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-D.Erytritol 4-Phosphate Pathway. *The Plant Cell*, Vol. 17, 628-643.
30. Hajhashemi, S., Geuns, J.M.C. & Ehsanpour, A.A. *Acta Physiol Plant* (2013) 35: 2009. doi:10.1007/s11738-013-1226-9.

31. Hajhashemi, S., & Geuns, J. (2016). Gene transcription and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* under polyethylene glycol-induced drought stress in greenhouse cultivation. *FEBS open bio*, 6(9), 937-944.
32. Hernández Guzman A. K., y Guzman Barney M., 2013. Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del *Potato Yellow vein virus* (PYVV) en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* Grupo *Phureja*.
33. Ibarra C. Tamay de Dios L., y Velasquillo C., 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad, Vol. 2, No. 2.
34. Joshi M., 2010. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal Biomedical Research*. 1(5).pp 81-97.
35. Kaur G., Pandhair V., Cheema G. S., 2014. Extraction and characterization of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Journal of Medicinal Plants Studies*; 2(5):41-45.
36. Kim Y. S., Cho J. H., Park S., Jung Y. H., Kyungwhan B., Choi Y. E., 2011. Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum*.
37. Kinghorn A. D., 2002. *Stevia the genus Stevia*. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, University of Illinois at Chicago, USA.
38. Kornberg Arthur, 1988. DNA replication. *Biochimica et Biophysical Acta* 951, pp.235-239. Elsevier.
39. Kumar H., Kiran K., Suphla B. G., Vijay K. K., Sanjay K., 2011. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni.
40. Kobus M. M., Michaowska Gramza A., 2015. Directions on the use of *Stevia* Leaves (*Stevia Rebaudiana*) as an additive food products. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment* 14(1) 5-13.
41. Laribi B., Rouatbi N., Kouki K., Bettaieb T., 2012. *In vitro* Propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert.) A non caloric sweetener and antidiabetic medicinal plant. *Int. J. Med. Arom. Plants*. Vol.2, No.2, pp. 333-339.

42. Lemus Mondaca R., Vega Gálvez A., Zura Bravo L., and Ah Hen Kong., 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food chemistry 132; 1121-1132. Elsevier.
43. Linsmaier Elfriede M. and Skoog Folke., 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, Vol. 18.
44. Marone M., Mozzetti S., De Ritis D., Pierilli L., Giovanni S., 2001. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcript from the same sample. Biol. Proced; 3(1).
45. Mathew R. y Sankar D., 2012. Effect of methyl jasmonate and chitosan on growth characteristics of *Ocimum basilicum* L., *Ocimum sanctum* L y *Ocimum gratissimum* L. cell suspension cultures.
46. Mitra A., and Pal A., 2007. *In Vitro* Regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert) from the Nodal Explant. J. Plant Biochemistry & Biotechnology Vol. 16 (1), 59-62.
47. Modi, A., Litoriya, N., Prajapati, V., Rafalia, R. and Narayanan, S. (2014), Transcriptional profiling of genes involved in steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* bertoni during plant hardening. Dev. Dyn., 243: 1067–1073. doi:10.1002/dvdy.24157
48. Montes Palmeros M., Alvarado Orea I. V., Pavón Orozco P., García López E., Huerta Heredia A. A., 2016. Steviol Glucosides production in micropropagated seedlings of *Stevia rebaudiana* elicited with methyl jasmonate.
49. Montes Palmeros M., 2017. Plántulas micropropagas de *Stevia rebaudiana* expuestas a metil jasmonato. Tesis de maestría Universidad del Papalopan.
50. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. y Erlich H., 1986. Specific enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbar Symposium on Quantitative Boilogy, Volume LI.
51. Mulabagal V., and Sheng T. H., 2004. Plant cell cultures: An alternative and efficient source for the production og biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering; 2,1 :29-48.

52. Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
53. NanoDrop technical support bulleting. NanoDrop ND-1000 and ND-8000-Sample Spectrophotometers.
54. Pauwels L., and Goossens A., 2011. A crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *The plant cell*, Vol. 23, pp.3089-3100.
55. Pande S.S and Gupta P., 2013. Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* Vol. 5(1), pp. 26-33.
56. Ramesh K., Singh V. y W. Megeji Nima., 2006. Cultivation of *Stevia* [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A Comprehensive Review. *Advances in Agronomy*, Volume 89.
57. Ramírez Estrada K., Vidal Limon H., Hidalgo D., Moyano E., Goleniowski M, Cusidó R. M., and Palazon J., 2016. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High- Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*; 21, 182.
58. Razak Umami N. A., Chong Boon O., Tiew S. Y., and Li Kiaw L., 2014. *In vitro* Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. Vol. 57, No.1: pp. 23-28.
59. Richman A. S., Gijzen M., Starratt Al N., Yang Z., and Brandle J. E., 1999. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from gibberellin biosynthetic pathway. *The plan Journal* 19(4), 411-421.
60. Rodríguez-Concepción M, Boronat A., 2004. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol*. Vol. 130.
61. Salahim M. A., M. B., Karim R., Razvy M. A., Hannan M. M., Sultana R., Hossain M. and Islam R., 2007. An efficient method for *in vitro* clonal propagation of newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in Bangladesh. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 2(2): 121-125.
62. Sambrook J., and Russell D. W., 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Third edition.

63. Schaller A., and Stintzi A., 2008. Jasmonate biosynthesis and signaling for induced plant defense against herbivory. Springer Science, Business Media.
64. Schenk Peer M., Kazan K., Wilson L., Anderson J. P., Richmond T., Somerville Shauna C and Manners J. M., 2000. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. PNAS; Vol. 97, No. 21, pp. 11655-11660.
65. Shock C. C., 1982. *Stevia rebaudiana*: natural non-caloric sweeteners. California Agric. 36: 4-5.
66. Sivaraman L. and Mukundan U., 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. Plant. Biol., 39-520-523.
67. Soejarto D. D., 2002. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In Kinghorn, A. D. (Ed.), *Stevia the Genus Stevia*.
68. Rischer, H.; Oresic, M.; Seppänen-Laakso, T.; Katajamaa, M.; Lammertyn, F.; Ardiles-Diaz, W.; van Montagu, M.C.; Inzé, D.; Oksman-Caldentey, K.M.; Goossens., 2006. A gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 103,5614–5619.
69. Temin H. M. y Baltimore D., 1972. RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. Advan. Virus Res. 17:129-86.
70. Temin H. M. 1985. Reverse Transcription in the Eukaryotic Genome: Retroviruses, Pararetroviruses, Retrotransposons and etrotranscripts. Mol. Biol. Evol. 2(6):455-468.
71. Totté N., Charon L., Rohmer M., Compennolle Frans, Baboeuf Ilse and Geuns Jan M. C., 2000. Biosynthesis of diterpenoid steviol, and ent- kaureno derivate from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerytritol phosphate pathway.
72. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG., (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40(15).
73. Utumi Marley M., Henrique Monnerat P., Gomes Pereira P. R., Rezende Fontes P. C. e Campos Godinho V. de P., 1999. Deficiencia De macronutrients em estévia: Sintomas Visuais e efeitos no crescimento, composicao química e producao de esteviosídeo. Pesq. Agropec; Brasilia, v. 34, p. 1039-1043.

74. Valio I. F. M. y Rocha Rosely F., 1977. Effect of Photoperiod and Growth Regulator on Growth and Flowering of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Japan. Jour. Crop Sci. 46(2): 243-248.
75. Van Furden B., Humburg A., and Fuss E., 2005. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linun album* cell suspension cultures. Plant Cell Resp; 24, pp. 312-317.
76. Viana A. M. and Metivier J., 1980. Changes in the levels of total soluble proteins and sugars during leaf ontogeny in *Stevia rebaudiana* Bert. Ann, Bot. 45, pp. 469-474.
77. Vom Endt. D., Soares Silva M., Kijne J. W., Pasquali G., and Memenlink Johan., 2007. Identification of bipartite jasmonate responsive promoter element in the *catharanthus roseus* ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-Hook DNA. Binding proteins. Plant Physiology, Vol. 144, pp. 1680-1689.
- Walker N. J., 2002
78. Watson J., y Crick F., 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids. Nature 4356.
79. Wong Marisa L. and Medrano Juan F., 2005. Real time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques Vol. 39, No. 1.
80. Zeneli G., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T., Gershenzon, J., 2006. Methyljasmonate treatment of mature Norway spruce (*Picea abies*) trees increases the accumulation of terpenoid resin components and protects against infection by *Ceratocystis polonica*, a bark beetle-associated fungus. Tree Physiol. 26, 977-988.
81. Zhao J., Davis Lawrence C., Verpoorte Robert, 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology advances 23; 283-333. Elsevier.

Apéndice: Preparación de reactivos

- **Agua tratada con dietil-pirocarbonato**

Agregar 1 ml de dietil-pirocarbonato (DEPC) por 1 litro de agua destilada. Colocar en agitación por 24 horas. Autoclavar por lo menos 1 hora. Abrir sólo en campana para prevenir posibles agentes contaminantes.

- **Preparación del NaOH 2N (Hidróxido de Sodio)**

Componente	Cantidad
NaOH	8 g
Agua desionizada	100 ml

- **Preparación del EDTA 0.5 M (Ácido etilendiaminotetraacético)**

Componente	Cantidad
EDTA	9.305 g
NaOH	Ajustar a PH 8.0
Agua Desionizada	Aforar a 50 ml

- **Preparación del Buffer MOPS 10X (3-morfolinopropano-1-sulfónico)**

Componente	Cantidad
MOPS	20.927 g
Acetato de sodio	5.44 g
EDTA (0.5 M)	10 ml
Agua DEPC	Aforar a 500 ml
NaOH (2 N)	Agregar hasta obtener PH 7.0

- **Preparación del Buffer de carga para RNA 5X**

Componente	Cantidad
Formamida	3084 µl
Formaldehido	720 µl
MOPS 10X	4.0 µl
EDTA (0.5 M)	80 µl
Azul de bromofenol	16 µl
Bromuro de etidio	10 mg
Glicerol	2 ml
Agua DEPC	Aforar a 10 ml

- **Preparación de buffer de resolución stock Tris-Acetato (TAE) 50 X**

Componente	Cantidad
Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M pH 8	100 ml

- **Preparación de Buffer de carga para ADN 10 X**

Componente	Cantidad
Glicerol	3.9 ml
Azul de bromofenol	25 mg
Buffer TAE 10 X	Aforar a 10 ml