



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC**

**“Establecimiento de cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana*
Bertoni mediada por *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834”**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Ingeniera en Biotecnología**

PRESENTA:

BETZAYDA DEL RÍO MARTÍNEZ

Director: Dr. Edgar García López

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca

2021



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC


ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 15 de febrero de 2021 a las 12 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Establecimiento de cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* Bertoni mediada por *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834" presentada por la alumna Betzayda del Río Martínez, con número de matrícula 12090158, aspirante al título de **Licenciatura**.


Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 15 de febrero de 2021


ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA



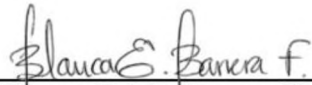
Dr. Edgar García López
Cátedras CONACyT
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis



Dr. Julián Mario Peña Castro
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisora de Tesis



Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisora de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 19 de febrero de 2021
Oficio No. JCIB/009/02/2021

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Betzayda del Río Martínez** titulado “**Establecimiento de cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* Bertoni mediada por *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834**” para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Presidente: Dr. Julián Mario Peña Castro
Vocal: Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Secretario: Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Suplente 1: Dr. Enrique Villalobos Amador
Suplente 2: Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente
Terra uberrima, mens aperta
Bøu Lo-tama, chí jí jú

Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan

c.c.p. Dr. Edgar García López. Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Betzayda del Río Martínez, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

ANEXO III: Hoja de originalidad

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

A mí, mis abuelos y mi madre.

“La libertad para cometer mis propios errores
es todo lo que siempre he querido”

– Mance Rayder

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a todos aquéllos que me soportaron y sobretodo me escucharon, ayudaron y apoyaron en esto que parecía muchas veces interminable. Especialmente a mi familia, mis amados abuelos Candita y Chunquito que son como mis padres y a quienes debo todo, a mi madre quien a su manera y a pesar de muchas dificultades siempre nos ha sacado adelante. También agradezco enormemente a mis tíos Emiliano y Reynaldo a quienes admiro y de quienes siempre he recibido mucha ayuda, así como a mi querida tía Luz pues siempre ha estado incondicionalmente para mí.

Un especial agradecimiento a Armando quien ha sido mi mejor amigo y una persona muy importante durante todos estos años haciendo mi tesis, gracias por siempre ayudarme y hacerme sentir mejor. Quiero agradecer a mis amigas y amigos Citlalin, Abimelek y Jazmín por también acompañarme en este largo proceso cerca o a la distancia, siempre dándome palabras de aliento y cariño.

Muchas gracias a los Doctores y Doctoras de la UNPA que fueron parte importante de mi formación y de quienes aprendí tanto. A mi director de tesis, el Dr. Edgar por compartir sus conocimientos conmigo cuando lo necesité, a la Dra. Jacqueline por apoyarme y ayudarme cuando acudía con ella, así como al Dr. Julián y la Dra. Blanca igualmente por siempre tener una sonrisa y amablemente resolver mis dudas cuando les pedí ayuda. Asimismo, por formar parte de mi comité revisor y siempre hacer un excelente trabajo. A todos ustedes toda mi admiración y respeto. También quiero agradecer a la Universidad del Papaloapan por las posibilidades y las instalaciones facilitadas para la realización de este trabajo.

Un agradecimiento sincero al Dr. Abad quien además de profesor se ha convertido en un gran amigo a quien le tengo mucho cariño y que igualmente siempre me brindó su apoyo. A todos los compañeros y amigos que hice en mi estancia en los laboratorios de cultivo de tejidos y células vegetales, biología molecular y biotecnología vegetal, especialmente a Sarita, Atzin, Rache y Ángel quienes me brindaron su ayuda y con quienes pasé momentos muy agradables. Igualmente, agradezco a mi hermana por darme ánimos en los momentos más complicados que hemos pasado durante estos años terminando mi tesis.

Finalmente, durante todos estos años se han involucrado tantas personas que la lista es interminable, sólo me queda decir muchas gracias a todos los que directa o indirectamente me ayudaron en la realización de esta tesis.

CONTENIDO

RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. <i>Stevia rebaudiana</i>	2
2.1.1. Metabolitos secundarios de <i>Stevia rebaudiana</i> y sus propiedades	2
2.2. Cultivo vegetal <i>in vitro</i> como herramienta biotecnológica	4
2.2.1. Micropropagación de <i>Stevia rebaudiana</i>	6
2.3. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	9
2.3.1. Transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i>	11
2.3.2. Raíces Transformadas	14
2.4. Transformación genética de <i>Stevia rebaudiana</i> mediada por <i>A. rhizogenes</i>	15
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVO PRINCIPAL	26
6. OBJETIVOS SECUNDARIOS	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1. Estrategia experimental.....	27
7.2. Metodología.....	28
7.2.1. Material vegetal	28
7.2.2. Material bacteriano	28
7.2.3. Transformación genética de <i>Stevia rebaudiana</i> mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	29
7.2.3.1. Condiciones de cultivo de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC15834 para infección de plántulas	29
7.2.3.2. Inducción de raíces pilosas en explantes de <i>Stevia rebaudiana</i>	30
7.2.3.3. Propagación de raíces inducidas.....	30
7.2.4. Confirmación de la transformación de cultivos de raíces	31
7.2.4.1. Extracción de ADN genómico de raíces pilosas	31
7.2.4.2. PCR punto final.....	31
7.2.4.3. Electroforesis de extractos de ADN genómico y productos de PCR	32
7.2.5. Establecimiento y propagación de cultivos de raíces transformadas en medio líquido.....	32
7.2.6. Análisis estadístico	33
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8.1. Propagación <i>in vitro</i> de plántulas de <i>Stevia rebaudiana</i>	34

8.1.1.	Efecto del contenido de vitaminas en el medio de cultivo sobre la inducción de brotes.....	34
8.1.2.	Efecto de la concentración del medio y el agente gelificante sobre la regeneración y enraizamiento de plántulas	35
8.2.	Caracterización de la cepa ATCC15834 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	39
8.3.	Transformación de <i>Stevia rebaudiana</i> mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC15834	40
8.3.1.	Inducción de raíces pilosas en explantes de <i>Stevia rebaudiana</i>	40
8.3.2.	Selección fenotípica de raíces inducidas	46
8.3.3.	Confirmación de la transformación de los cultivos de raíces por PCR.....	50
8.3.4.	Establecimiento de cultivos de raíces transformadas en medio líquido.....	54
9.	CONCLUSIONES.....	59
10.	PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	60
11.	REFERENCIAS	61
12.	ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del plásmido inductor de raíces (Ri) tipo agropina..	10
Figura 2. Proceso de transformación genética de una célula vegetal mediado por <i>Agrobacterium</i>	12
Figura 3. Diagrama de estrategia experimental.....	27
Figura 4. Brotes inducidos por explante de <i>S. rebaudiana</i> en medio MS con y sin vitaminas después de 20 días de cultivo.....	35
Figura 5. Plántulas de <i>S. rebaudiana</i> obtenidas después de 45 días de cultivo en medio MS semisólido.....	38
Figura 6. Raíces de <i>S. rebaudiana</i> inducidas en diferentes combinaciones de medio MS/Agente gelificante después de 45 días de cultivo.....	38
Figura 7. Morfología colonial de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC15834 en Agar nutritivo incubado 48 h a 28 °C.....	39
Figura 8. Cinética de crecimiento de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC15834 en medio LB líquido..	40
Figura 9. Frecuencias de inducción de raíces.....	42
Figura 10. Número de raíces inducidas por explante..	43
Figura 11. Inducción de raíces en explantes co-cultivados por 24 y 48 h en suspensión bacteriana, después de 7, 14 y 21 días.....	45
Figura 12. Parámetros de crecimiento individual en medio semisólido de las raíces pilosas seleccionadas.....	47
Figura 13. Raíces inducidas seleccionadas por características fenotípicas de raíces pilosas en cultivo individual en medio semisólido a los 10 días (Día 1) y 30 días.....	48
Figura 14. Raíces pilosas seleccionadas fenotípicamente para confirmar la transformación por PCR.....	49
Figura 15. A) Raíces pilosas usadas para extracción de ADN genómico. B) Extractos de ADN genómico de raíces pilosas seleccionadas y raíces control de <i>S. rebaudiana</i>	51
Figura 16. Amplificación del fragmento del gen <i>rol</i> B de <i>A. rhizogenes</i> en raíces transformadas de <i>S. rebaudiana</i>	52
Figura 17. Frecuencias de transformación respecto al total de raíces inducidas.....	53
Figura 18. Frecuencias de transformación por tiempo de co-cultivo..	53
Figura 19. Cinética de crecimiento de raíces transformadas en medio MS líquido..	55
Figura 20. Crecimiento de biomasa de raíces en medio MS líquido durante 7, 14 y 21 días de cultivo.	57
Figura 21. Biomasa de raíces acumulada después de 21 días de cultivo en medio MS líquido.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios de transformación genética de <i>Stevia rebaudiana</i> mediada por <i>A. rhizogenes</i>	16
Tabla 2. Factores que afectan la transformación genética de <i>S. rebaudiana</i> mediada por <i>A. rhizogenes</i>	19
Tabla 3. Estudios de establecimiento de raíces transformadas de <i>S. rebaudiana</i> en medio líquido.	20
Tabla 4. Resultados de la inducción de brotes de <i>S. rebaudiana</i> después de 20 días de cultivo.	34
Tabla 5. Resultados de la regeneración de plántulas <i>in vitro</i> de <i>S. rebaudiana</i> después de 45 días.	36
Tabla 6. Resultados del enraizamiento de plántulas <i>in vitro</i> de <i>S. rebaudiana</i> después de 45 días.	37
Tabla 7. Resultados de la inducción de raíces en explantes de <i>S. rebaudiana</i> infectados con <i>A. rhizogenes</i>	41
Tabla 8. Parámetros de crecimiento individual en medio semisólido de las raíces pilosas seleccionadas.	47
Tabla 9. Peso fresco de raíces en medio líquido MS (g).....	54
Tabla 10. Índices de crecimiento de raíces después de 21 días de cultivo en medio MS líquido.	56

ABREVIATURAS

°C: grados Celsius	L: litros
µg: microgramos	M: molar
µl: microlitros	mg: miligramos
µM: micromolar	min: minutos
2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	ml: mililitros
A _{600nm} : Absorbancia a 600 nm	ng: nanogramos
ADN: Ácido desoxirribonucleíco	nm: nanómetros
AIA: Ácido indolacético	OD: oligonucleótido directo
ANA: Ácido naftalenacético	OR: oligonucleótido reverso
ARNasa: ribonucleasa	pb: pares de bases
BAP: Bencilaminopurina	PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
cm: centímetros	pH: potencial de Hidrógeno
DE: desviación estándar	rpm: revoluciones por minuto
dNTP: deoxinucleósido trifosfato	SDS: dodecilsulfato sódico
D.O.: densidad óptica	T.A.: temperatura ambiente
EDTA: ácido etilendiaminotetracético	TAE: Tris-ácido acético-EDTA
g: gramos	TDZ: thidiazurón
h: horas	Tris-HCl: trisaminometano-ácido clorhídrico
IBA: ácido indolbutírico	v/v: volumen/volumen
kb: kilobases	xg: gravedades

RESUMEN

Stevia rebaudiana es una planta de gran importancia por sus metabolitos secundarios, los cuales poseen actividades biológicas con aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria. La obtención de dichos metabolitos mediante técnicas de cultivo clásico es una limitante debido a la germinación escasa de las semillas y la dificultad de obtener plantas completas, lo que conlleva a bajos rendimientos de los compuestos. Por ello se han implementado estrategias, tales como el cultivo *in vitro* y la transformación genética para su producción a partir de cultivos transformados, principalmente raíces pilosas gracias a las ventajas que ofrecen de alta productividad, facilidad de cultivo y estabilidad genética. El objetivo de este trabajo fue establecer cultivos de raíces transformadas de *S. rebaudiana* mediante un protocolo eficiente de transformación con la cepa silvestre ATCC15834 de *Agrobacterium rhizogenes*. La inducción de raíces se realizó mediante infección de explantes meristemáticos obtenidos de plántulas *in vitro*, en co-cultivo con la bacteria en suspensión por 24 h y 48 h. Las primeras raíces pilosas aparecieron a los 7 días de la infección, después de esto las observaciones se registraron a los 14 y 21 días. Las raíces emergidas se propagaron individualmente en medio MS (Murashige y Skoog) libre de reguladores de crecimiento y se seleccionaron por tamaño y fenotipo. La eficiencia máxima de inducción fue de 88.89 ± 7.50 % y el mayor número de raíces por explante fue de 2.44 ± 0.35 , ambos obtenidos después de 21 días de inducción con co-cultivos de 24 h. De un total de 16 raíces seleccionadas, sólo 4 raíces (R09, R12, R13 y R14) desarrollaron el fenotipo característico de raíces pilosas después de 30 días de cultivo individual, cuya transformación se confirmó por amplificación de un fragmento de 150 pb del gen *rol* B por PCR. Los cultivos fueron evaluados mediante una cinética de crecimiento en medio MS líquido durante 21 días. La acumulación de biomasa máxima se observó en la línea transformada R12 con 7.52 ± 0.49 g de peso fresco a los 21 días de cultivo, y de acuerdo al análisis de índice de crecimiento tuvo un aumento de 5.83 ± 0.44 veces en peso fresco. Las 4 líneas transformadas tuvieron un mayor crecimiento comparadas con el cultivo control de raíces no transformadas. Los resultados obtenidos muestran el establecimiento de 4 cultivos de raíces transformadas de *S. rebaudiana* mediante un protocolo de transformación eficiente y además, señalan que el tiempo de co-cultivo y el período de inducción son factores que influyen significativamente en el proceso de agrotransformación.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana is a high importance plant by its secondary metabolites, which have biological activities with applications in the pharmaceutical and food industry. Its production through classical cultivation techniques is limited by poor germination of seeds and the difficulty of obtaining complete plants, which leads to low yields of the compounds. Therefore, strategies have been implemented, such as *in vitro* culture and genetic transformation, for production from transformed cultures, mainly hairy roots due to advantages such as high productivity, ease of cultivation, and genetic stability. This research aimed to establish transformed root cultures of *S. rebaudiana* through an efficient transformation protocol using the wild strain ATCC15834 of *Agrobacterium rhizogenes*. Root induction was performed by infection of meristematic explants from *in vitro* seedlings in co-culture with the bacterial suspension for 24 and 48 hours. The first hairy roots appeared at 7 days after infection; afterward the observations were recorded at 14 and 21 days. The emerged roots were propagated individually in MS (Murashige and Skoog) medium free of growth regulators, and they were selected by size and phenotype. The maximum induction efficiency was 88.89 ± 7.50 %, and the highest number of roots per explant was 2.44 ± 0.35 , both obtained after 21 days of induction with 24-hour co-cultures. From a total of 16 selected roots, only 4 roots (R09, R12, R13, and R14) developed the characteristic phenotype of hairy roots after 30 days of individual culture, whose transformation was confirmed by amplification of a 150 bp fragment of the *rolB* gene by PCR. The cultures were evaluated in growth kinetics in liquid MS medium for 21 days. The maximum biomass accumulation was observed in the R12 transformed line with 7.52 ± 0.49 g of fresh weight at 21 days of cultivation, and according to the growth index analysis, it had an increase of 5.83 ± 0.44 times of fresh weight. The 4 transformed lines showed higher growth compared to the control culture of non-transformed roots. The results obtained show the establishment of 4 transformed root cultures of *S. rebaudiana* through an efficient transformation protocol and also indicate that the co-cultivation time and the induction period are factors that significantly influence the agrotransformation process.

1. INTRODUCCIÓN

Las herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* y la transformación genética, han permitido el aprovechamiento de recursos encontrados en la naturaleza con la ventaja de evitar el consumo de las fuentes nativas y poder aumentar los rendimientos de producción de compuestos bioactivos propios de las especies vegetales, aunado a la posibilidad de controlar las condiciones de cultivo y manipular a nivel genético la obtención de compuestos de interés (Hooykaas, 2001; Yadav *et al.*, 2012).

Stevia rebaudiana es una planta herbácea nativa de Sudamérica y extendida a lo largo de todo el continente Americano. Sus hojas poseen naturalmente un potente sabor dulce que se le ha atribuido principalmente a los glucósidos de esteviol (GEs), los cuales han adquirido gran importancia por sus aplicaciones como edulcorantes naturales no calóricos. No obstante, ésta no es la única característica relevante de *Stevia* ya que, tanto los GEs como el resto de compuestos encontrados mayormente en sus hojas, presentan actividades biológicas con múltiples beneficios a la salud (Kujur *et al.*, 2010; Durán *et al.*, 2012).

La propagación clásica de *Stevia* ha dificultado la obtención de sus compuestos bioactivos, por lo que en las últimas décadas se ha logrado el establecimiento en cultivo *in vitro* mediante protocolos sencillos de micropropagación (Modi *et al.*, 2012). Por otro lado, existen algunos reportes de transformación genética de *Stevia* que han servido para desarrollar protocolos eficientes de transformación evaluando el efecto de diversos factores como el tipo de cepa, las condiciones de co-cultivo y propagación, entre otros (Singh *et al.*, 2017). Asimismo, los cultivos de raíces transformadas muestran características ventajosas por su rápida proliferación en ausencia de reguladores de crecimiento, estabilidad genética y alta productividad de metabolitos secundarios, aunado a ello, gracias al potencial fotosintético que algunas raíces pilosas llegan a mostrar, han servido como modelo de estudio de procesos exclusivos de partes aéreas sin requerir la regeneración de plantas completas. Todo esto ha sido útil para la producción de metabolitos de *Stevia* y el estudio de las vías metabólicas involucradas en su biosíntesis (Pandey *et al.*, 2016). Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer cultivos de raíces transformadas de *S. rebaudiana* mediante un protocolo eficiente de transformación con la cepa silvestre ATCC15834 de *Agrobacterium rhizogenes*.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Stevia rebaudiana*

Stevia es un pequeño arbusto leñoso perenne que en forma silvestre puede medir 65 – 80 cm de longitud. Posee hojas lanceoladas que miden aproximadamente 5 cm de largo y 2 cm de ancho, aserradas en el centro y alineadas de manera opuesta (Kujur *et al.*, 2010). La germinación de sus semillas es muy pobre, sin embargo, las semillas fértiles son de color oscuro. Es una planta diploide con 11 pares de cromosomas (Goyal y Goyal, 2010).

Se caracteriza por el potente sabor dulce de sus hojas, por lo que es conocida comúnmente como “hoja dulce”. Pertenece a la familia *Asteraceae*, el género *Stevia* comprende entre 110 a 300 especies y sólo 18 de ellas muestran el sabor dulce característico, de las cuales *S. rebaudiana* Bertoni es la más dulce. Fue descrita por primera vez en 1887 por el botánico suizo Moisés Santiago Bertoni, quien detalló su dulzor. El químico paraguayo Ovidio Rebaudi aisló los principios activos responsables del sabor dulce en 1990 (Durán *et al.*, 2012). Es nativa de Paraguay, su hábitat se extiende desde el suroeste de los Estados Unidos hasta el altiplano brasileño, sin embargo, los principales productores de *Stevia* son Japón, China, Taiwan, Tailandia, Corea, Brasil, Malasia y la India (Gantait *et al.*, 2015). Crece fácilmente en suelos arenosos con un rango de pH de 6.5 – 7.5 (Goyal y Goyal, 2010).

2.1.1. Metabolitos secundarios de *Stevia rebaudiana* y sus propiedades

Los compuestos responsables de la propiedad endulzante de *S. rebaudiana* son glucósidos de esteviol (GEs) clasificados como Esteviósido, Rebaudiósidos A, B, C, D y E, Dulcósido A y Esteviolbiósido. Estos edulcorantes difieren principalmente en el número y conformación de los residuos de glucosa unidos al núcleo de esteviol (Horn, 2012). Los compuestos activos de mayor interés son el esteviósido y el rebaudiósido A, debido a que pueden ser hasta 300 y 450 veces más dulces que el azúcar común, respectivamente y sin aporte calórico (Brandle *et al.*, 1998; Kolb *et al.*, 2001; Chatsudthipong y Muanprasat, 2009). Una característica de interés es la proporción de esteviósido/rebaudiósido A debido a que el rebaudiósido A reduce la sensación de amargor que deja el esteviósido (Brandle *et al.*, 1998). La mayor acumulación de GEs se da en las hojas de la

planta, las cuales se han estudiado para su caracterización y se ha encontrado que contienen 0.3 % dulcósidos, 0.6 % rebaudiósido C, 3.8 % rebaudiósido A y 9.1 % esteviósido (Sivaram y Mukundan, 2003; Goyal y Goyal, 2010; Durán *et al.*, 2012). Aparte de los GEs, también se han identificado otros metabolitos secundarios importantes en las hojas de *Stevia*, tales como polifenoles, alcaloides, flavonoides, esteroides, triterpenoides, glucósidos cardíacos y compuestos derivados del ácido clorogénico, todos estos también son compuestos bioactivos con múltiples beneficios a la salud, sin embargo se encuentran en cantidades mucho menores (Carvalho *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2014).

La biosíntesis de los GEs se limita a los tejidos verdes en *Stevia*, el proceso sucede generalmente a través de la vía alternativa del mevalonato en los cloroplastos y el retículo endoplásmico para luego llevar a cabo la glicosilación mediante tres UDP-glucosiltransferasas (UGT74G1, UGT76G1 y UGT85C2) en el citoplasma; los GEs se almacenan en las vacuolas de la célula vegetal (Brandle y Telmer, 2007, Kumar *et al.*, 2012). Aunque algunos pasos iniciales de la biosíntesis de esteviósido ocurren en los cloroplastos, el grado de desarrollo y la actividad funcional de los mismos realmente deciden el resultado final de la síntesis (Bondarev *et al.*, 2001). Entre los tres genes de glucosiltransferasa se ha reportado que UGT85C2 es el gen limitante de la velocidad en el citoplasma (Brandle y Telmer 2007; Guleria *et al.*, 2014), el cual gobierna principalmente no solo la funcionalidad de la vía biosintética subyacente, sino también la afirmación de la recuperación del producto (Mohamed *et al.*, 2011).

Gracias a sus características edulcorantes naturales y no calóricas, los metabolitos de *Stevia* han sido utilizados como sustituto de azúcares y coadyuvantes en el tratamiento de la diabetes y obesidad (Anton *et al.*, 2010). Además, la demanda de edulcorantes bajos en calorías de origen natural ha aumentado a nivel mundial debido a la creciente alerta sobre los efectos perjudiciales del consumo prolongado del azúcar de mesa y los efectos secundarios adversos de los edulcorantes sintéticos (Philippe *et al.*, 2014; Das *et al.*, 2015). Sin embargo, la disposición de edulcorantes naturales está potencialmente limitada por la sostenibilidad agrícola, las cualidades de sabor indeseables, la seguridad percibida y la viabilidad comercial (Philippe *et al.*, 2014).

Su reconocida cualidad endulzante no es la única característica importante de esta planta, en distintas investigaciones se han demostrado sus propiedades anti-hiperglucémicas, anti-

hipertensivas, anti-diarreicas, anti-inflamatorias y anti-cancerígenas (Kumari y Chandra, 2014). Por ello, es de interés en estudios para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades como Diabetes Mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, Cáncer y otras. Además, el extracto de hojas de *Stevia* es consumido para el alivio de molestias estomacales (Goyal y Goyal, 2010). También se han demostrado las propiedades bioactivas de otros metabolitos como el ácido clorogénico y sus derivados, los cuales fueron efectivos en disminuir la presión arterial siendo seguros para pacientes con hipertensión leve (Watanabe *et al.*, 2006), y el ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA) mostró potencial para reducir el peso corporal, regular el metabolismo de lípidos *in vivo* y prevenir la inflamación intestinal (Cho *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2015).

El proceso de extracción de los GEs a partir de las hojas de *Stevia*, consiste en diferentes etapas que pueden variar de acuerdo al fabricante. En la primera etapa, el contenido de las hojas de *Stevia* se extrae con agua caliente, seguido de un paso de floculación o filtración para eliminar el material vegetal. A esto le sigue una segunda etapa en la que las soluciones aclaradas se pueden purificar aún más para cumplir con las especificaciones reglamentarias. A continuación, el extracto puede pasar por una o más etapas de recristalización utilizando diversas soluciones de alcohol de calidad alimentaria para mejorar la pureza de uno o más glucósidos de esteviol específicos. Actualmente, se busca la obtención de estos compuestos a partir de cultivos capaces de secretarlos al medio circundante, con lo cual se facilita el proceso de extracción (Horn, 2012).

2.2. Cultivo vegetal *in vitro* como herramienta biotecnológica

El cultivo vegetal *in vitro* (CVi) comprende las técnicas utilizadas para el crecimiento de explantes vegetales (partes separadas de una planta como tejidos, órganos o células) y plantas completas, en un medio de cultivo definido y bajo condiciones ambientales asépticas y controladas (Yadav *et al.*, 2012). Las condiciones que deben controlarse en CVi se refieren principalmente a luz y temperatura, pues estos factores afectan las respuestas morfogénicas de los explantes. Comúnmente se aplica un ciclo de fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad y un rango de temperatura entre 25 a 28 °C es adecuado para el establecimiento de cultivos *in vitro* (Roca y Mroginski, 1991).

La elección del explante influye en el tipo de cultivo que se requiera y a su vez se determina con base en la especie vegetal empleada y el objetivo a cumplir. Se utilizan partes de plantas jóvenes

como ápices, inflorescencias, frutos, hojas, tallos, raíces y semillas (Smith, 2012). Además se requieren condiciones estériles para el establecimiento y manipulación de cultivos vegetales *in vitro*, sin embargo, no es posible lograrlo de manera absoluta, por ello se implementan condiciones de trabajo en ambientes asépticos y protocolos de desinfección de los explantes a base de compuestos químicos como etanol (70 % v/v) e hipoclorito de sodio (1 % - 3 % v/v) y lavados consecutivos con agua destilada estéril (Roca y Mroginski, 1991).

También es importante elegir un medio de cultivo apropiado, el cual deberá proporcionar de manera general una fuente de carbono, nutrimentos minerales y vitaminas, estos constituyen los componentes basales, mientras que algunas formulaciones adicionalmente incluyen agentes gelificantes (en el caso de medios semisólidos), reguladores de crecimiento y otros compuestos. La formulación del medio será determinada por el propósito a cumplir con el CVi (Saad y Elshahed, 2012).

La importancia del CVi reside en las ventajas que ofrece sobre el cultivo convencional de plantas, pues gracias a la facilidad de control que se tiene de las condiciones ambientales de los cultivos, permite incrementar los rendimientos en la producción y obtención de compuestos de interés así como el incremento de la variabilidad genética, la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación de plantas y la conservación de especies vegetales (Hussain *et al.*, 2012). Por otro lado, es posible automatizar procesos con lo que se pueden reducir costos y aumentar la productividad (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Entre los distintos tipos de CVi uno de los más utilizados es el cultivo de órganos (raíces o brotes), ya que, presentan características metabólicas muy similares a los órganos de plantas completas o a las plantas completas en sí, permitiendo así la producción de metabolitos de interés (Karuppusamy, 2009). Además, estos órganos pueden ser transformados genéticamente, proporcionando con esto una diversidad de opciones en los cultivos. La transformación mediada por la bacteria *Agrobacterium* es la técnica más empleada, utilizando *A. rhizogenes* para inducir el fenotipo de raíces y *A. tumefaciens* para el caso de callos y brotes (Arias *et al.*, 2009).

2.2.1. Micropropagación de *Stevia rebaudiana*

Debido a la importancia de los metabolitos secundarios de *Stevia*, se requiere de técnicas de cultivo para obtener grandes cantidades de plántulas homogéneas y libres de enfermedades para la producción de sus compuestos bioactivos a gran escala (Dan y Mai, 2014). La propagación clásica de la planta es llevada a cabo en campos de cultivo en dos modalidades que incluyen la germinación de semillas y la propagación vegetativa. Sin embargo, ésta se ve limitada porque la germinación de sus semillas es muy baja, comúnmente menor al 10 % (Hossain *et al.*, 2008) y en consecuencia, también la producción de plantas completas, además que estas semillas producen una población de plantas heterogénea con gran variabilidad en la composición de metabolitos y el grado de dulzor. Por otro lado, los esquejes de *Stevia* son de fácil enraizamiento, no obstante, el número de éstos presentes en una sola planta también limita la multiplicación vegetativa (Sivaram y Mukundan, 2003; Yadav y Guleria, 2012).

En los últimos años los estudios se han centrado en las técnicas de cultivo de tejidos vegetales a fin de desarrollar y establecer el cultivo *in vitro* de *S. rebaudiana* (Thiyagarajan y Venkatachalam, 2012), evaluar su producción de GEs y otros compuestos de interés en cultivos transformados (Sánchez-Córdova *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019), y no transformados (Reis *et al.*, 2011; Pal *et al.*, 2013), así como dilucidar los mecanismos dentro de la vía de biosíntesis de los glucósidos de esteviol (Guleria y Yadav, 2013). Gracias a las ventajas que ofrece el CVi como una forma simple, rápida y eficiente de producción, propagación y manipulación de plantas (Moktaduzzaman y Rahman, 2009), representa un sistema óptimo para acelerar la propagación en masa de plantas de *Stevia* genéticamente estables (Jitendra *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que las condiciones de cultivo *in vitro* no afectan al contenido de esteviósidos de plantas regeneradas (Singh *et al.*, 2014a).

En un estudio comparativo para evaluar el efecto de los medios MS (Murashige y Skoog, 1962), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), WPM (Lloyd y McCown, 1980) y SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) en cultivos de *Stevia*, se encontró que el medio MS ofreció las condiciones más favorables para la regeneración *in vitro* (Hwang, 2006). Por otra parte, Ibrahim *et al.*, (2008) reportaron que la inducción de brotes de *Stevia* se vio afectada por la concentración de medio usada, obteniendo mejores resultados al usar MS en concentraciones altas ($\frac{3}{4}$ - 1) y que el uso de MS en

concentración completa previene la necrosis de los explantes. Hossain *et al.*, (2008), reportaron que el medio MS fue mejor que ½MS en términos de número (1.96) y tamaño (6.64 cm) de brotes de *Stevia* y que ambos tuvieron efectos iguales en los tiempos de iniciación de la inducción (4 días). En contraste, algunos reportes señalan que tanto el medio MS como ½MS son útiles para la inducción de raíces a partir de brotes de *Stevia* (Dan y Mai, 2014; Lata *et al.*, 2013). Además, Sivaram y Mukundan, (2003), encontraron que utilizando medio ½MS adicionado con IBA 4.9 µM (1 mg/L) como medio de enraizamiento se favorece la elongación de los brotes, con lo que se reduce un paso en el protocolo de micropropagación.

En cuanto al tipo de explante, en el caso de *Stevia* se ha reportado la iniciación exitosa de organogénesis directa *in vitro* usando distintos explantes, por ejemplo brotes apicales (Das *et al.*, 2011; Hossain *et al.*, 2008), segmentos nodales (Jahan *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2014a) y hojas (Preethi *et al.*, 2011). Hossain *et al.*, (2008), reportaron que los explantes de puntas de brotes fueron mejor que los segmentos internodales en términos de iniciación de la inducción (3.23 días) y número de brotes por explante (1.98), mientras que, Singh *et al.*, (2014a), mencionan que los segmentos nodales y las puntas de brotes fueron superiores a los segmentos internodales y que los mejores resultados de tiempo de iniciación (5.5 días), número de brotes (1.5) y tamaño de brotes (1.22 cm) los dieron los segmentos nodales. Las diferencias en las respuestas frente a distintos reguladores de crecimiento de los explantes podrían ser influenciados por las condiciones fisiológicas de los mismos (Jahan *et al.*, 2014).

Uno de los factores más importantes en la proliferación de brotes de *Stevia* es el tipo y concentración de citoquinina aplicado (Dan y Mai, 2014). Thiyagarajan y Venkatachalam, (2012), reportaron que la presencia de citoquininas fue esencial para el rompimiento de la yema y la proliferación de brotes, mientras que Laribi *et al.*, (2012), encontraron que las auxinas son indispensables para la elongación de los brotes. Además, la combinación de citoquininas y auxinas parece tener un efecto sinérgico ya que, las citoquininas mejoran la división celular, estimulan la proliferación de brotes axilares y brotes adventicios y las auxinas regulan el alargamiento celular, hinchazón de tejidos y expansión de brotes (Preethi *et al.*, 2011).

La efectividad de las citoquininas BAP y KN en la proliferación de brotes de *Stevia* ha sido estudiada anteriormente, Singh *et al.*, (2014a), reportaron que BAP fue mejor que KN para la

iniciación y multiplicación de brotes, mientras que Javed *et al.*, (2017), encontraron que BAP y KN fueron mejores que TDZ y si bien, el mayor número de brotes por explante (4.6) lo obtuvieron con KN (1 mg/L), tanto BAP (1 mg/L) como KN (1 mg/L) fueron igualmente efectivas promoviendo los mayores tamaños de brotes (5.2 cm y 5.5 cm, respectivamente). Adicionalmente, también se ha encontrado que la combinación de BAP con bajas concentraciones de auxinas promueve una mejor proliferación de brotes (Thiyagarajan y Venkatachalam, 2012). Sivaram y Mukundan, (2003), obtuvieron los mejores resultados de número de brotes por explante (11.2) usando medio MS con BAP 8.87 μ M (2 mg/L) y AIA 5.71 μ M (1 mg/L), Thiyagarajan y Venkatachalam, (2012), obtuvieron un máximo de 8.5 brotes por explante al usar MS con BAP (1 mg/L) y AIA 0.5 (mg/L) y Preethi *et al.*, (2011), consiguieron el mayor número de brotes (10.4) usando MS con BAP (1 mg/L), KN (0.5 mg/L) y AIA (0.1 mg/L). En un estudio comparativo, Dan y Mai, (2014), lograron el mayor número de brotes (3.24) con medio MS sin vitaminas y BAP (3.5 mg/L) y el mejor tamaño de brotes (1.15 cm) lo dio el medio MS con vitaminas, ANA (0.2 mg/L) y BAP (0.15 mg/L). Por su parte, Jitendra *et al.*, (2012), obtuvieron brotes de un tamaño máximo de 7.54 cm usando MS con BAP (0.5 mg/L) y KN (0.5 mg/L).

Respecto al enraizamiento de brotes de *Stevia*, se ha comprobado que el uso individual de IBA (0.5 mg/L) es óptimo para dar enraizamientos del 100 % usando medio $\frac{1}{2}$ MS con 12 – 13 raíces por brote (Sivaram y Mukundan, 2003). Por otro lado, también se han obtenido buenos enraizamientos con MS + IBA 2.46 μ M (0.5 mg/L) con 7.3 raíces por brote (Janarthanam *et al.*, 2009). Otras concentraciones de IBA también han sido encontradas como efectivas, Alhady *et al.*, (2011), al usar IBA (1 mg/L y 2 mg/L) obtuvieron mejores resultados de raíces por brote (7.1, 8.4, respectivamente) y tamaño de raíces (7.3 cm, 9 cm, respectivamente) que al usar ANA en las mismas concentraciones. Por su parte, Hossain *et al.*, (2008), reportó que el uso de IBA (1.5 mg/L) propició el mayor número de raíces por brote (10.25).

Aunado a esto, se ha encontrado un efecto inhibitorio de altas concentraciones de citoquininas sobre la proliferación de brotes de *Stevia*, el uso de BAP en concentraciones arriba de 2 mg/L redujo la multiplicación (Sivaram y Mukundan, 2003) y la elongación de brotes (Preethi *et al.*, 2011), con KN al aumentar la concentración más allá de 0.5 mg/L la inducción de brotes disminuyó (Thiyagarajan y Venkatachalam, 2012) y concentraciones de TDZ mayores a 0.2 mg/L tuvieron el mismo efecto adverso (Lata *et al.*, 2013). Éste efecto inhibitorio también se ha reportado en el

enraizamiento de brotes de *Stevia*, donde la inducción de raíces disminuyó gradualmente con el aumento en la concentración de auxinas (Ahmed *et al.*, 2007; Jahan *et al.*, 2014). Hwang, (2006), reportó la reducción del enraizamiento con concentraciones de AIA arriba de 1 mg/L y Thiyagarajan y Venkatachalam, (2012), encontraron la misma respuesta con concentraciones mayores a 2 mg/L de IBA y 0.4 mg/L de ANA.

Un efecto secundario que ha sido documentado por diversos autores es el desarrollo de callos intermediarios tanto en la inducción de brotes como en el enraizamiento, ésta respuesta se presenta en mayor medida conforme aumenta la concentración de citoquininas y/o auxinas (Das *et al.*, 2011; Thiyagarajan y Venkatachalam, 2012; Ahmed 2007, Jahan 2014). Se ha reportado que las combinaciones de BAP con ANA y BAP con AIA produjeron gran cantidad de callos en la inducción de brotes (Ahmed *et al.*, 2007; Thiyagarajan y Venkatachalam, 2012), por otro lado, Das *et al.*, (2011), mencionan que el uso individual de BAP redujo la formación de callo. También Hwang, (2006), encontró formación de callo al usar BAP con ANA o con 2,4-D y que el uso de KN con AIA produjo la menor cantidad de callos. En el enraizamiento se ha reportado la formación de callos en el extremo cortado de los brotes al usar IBA o ANA en concentraciones de 0.5 mg/L a 2 mg/L (Jahan *et al.*, 2014) y al usar AIA arriba de 0.5 mg/L (Ahmed *et al.*, 2007).

2.3. *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes es una bacteria gram negativa del suelo, causante de la enfermedad de “raíces pilosas” en plantas, la cual se caracteriza por la abundante proliferación de raíces aéreas en el sitio de infección. Esta bacteria tiene la capacidad natural de transferir ADN dentro de células vegetales infectadas, lo cual ha sido explotado para la modificación genética de diversas especies de plantas (Hooykaas, 2001).

Las bases moleculares de su reconocida facultad como “ingeniero genético natural” residen en el plásmido de gran tamaño (≈200 kb) que albergan las cepas virulentas de éste género. Dicho plásmido denominado inductor de raíces (Ri) (Figura 1), está conformado por un segmento definido de ADN, el cual es transferido al genoma de la célula vegetal infectada y se conoce como ADN-T (ADN de transferencia), esta región contiene un conjunto de genes que se expresan en las células transformadas y está delimitado por dos secuencias homólogas repetidas de 25 pb designadas como bordes izquierdo y derecho, LB y RB por sus siglas en inglés (Tzfira y Citovsky,

2006; Chandra, 2012). El ADN-T no contiene genes involucrados en su movilización hacia la célula vegetal, éstos se encuentran en una región adyacente conocida como región Vir (virulencia) conformada por alrededor de 20 genes *vir*, los cuales normalmente se encuentran silenciados hasta que son inducidos por condiciones específicas de la interacción entre la célula vegetal y la bacteria (Hooykaas, 2001).

Los genes codificados por el ADN-T, aun cuando son de origen bacteriano, evolucionaron hasta poder tener función en plantas y permitir patogénesis (Klee *et al.*, 1987), por lo que tienen secuencias regulatorias que permiten su expresión en células vegetales infiltradas (Mishra y Ranjan, 2008). En general, se han descrito tres grupos principales de genes ubicados dentro del ADN-T, éstos incluyen a los genes *rol* y los genes para la biosíntesis de auxinas y opinas. Los genes *rol* son un grupo de oncogenes responsables de la proliferación del tejido piloso, incluyendo *rol A*, *rol B*, *rol C* y *rol D* (Chandra, 2012; Lütken *et al.*, 2017). Por otro lado, el ADN-T también contiene los genes *iaaM* e *iaaH*, encargados de la biosíntesis de auxinas en la célula infectada, lo que conduce a la biosíntesis independiente de reguladores de crecimiento por parte de las raíces transformadas (Hooykaas, 2001; Chandra, 2012).

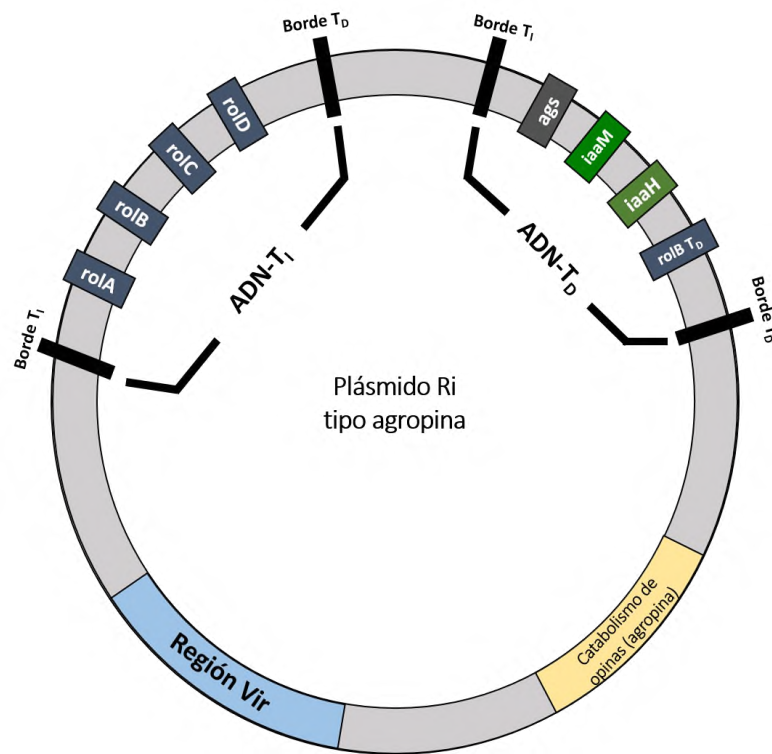


Figura 1. Estructura del plásmido inductor de raíces (Ri) tipo agropina. (Ri: inductor de raíces, ADN-T: ADN de transferencia, T_I: T izquierdo, T_D: T derecho, *rol*: genes *rol*, *ags*: genes agropina, *iaaM* e *iaaH*: genes auxinas). (Modificado de Lütken *et al.*, 2017).

La expresión del tercer grupo de genes incluidos en el ADN-T conduce a la síntesis de ciertos compuestos de bajo peso molecular llamados opinas, éstos son conjugados de azúcar-aminoácido usados casi exclusivamente por la bacteria como fuente de carbono y nitrógeno (McCullen y Binns, 2006; Tzfira y Citovsky, 2006). Los genes responsables del catabolismo de opinas se ubican fuera del ADN-T. Las cepas de *A. rhizogenes* pueden albergar diferentes tipos de plásmidos Ri, los cuales se clasifican de acuerdo a las opinas producidas, incluyendo mannopina, cucumopina y agropina (Chandra, 2012).

A diferencia de los plásmidos Ri tipo mannopina y cucumopina en los que se ha encontrado un solo segmento de ADN-T, en el plásmido tipo agropina se han identificado dos fragmentos de ADN-T denominados ADN-T izquierdo y derecho, T_L y T_R por sus siglas en inglés (Figura 1). Las dos regiones están separadas por una secuencia espaciadora de 15 kb no transferida, en consecuencia los dos ADN-T se transfieren de manera independiente al núcleo de la célula vegetal (Chandra, 2012; Lütken *et al.*, 2017). El ADN-T izquierdo (T_L) alberga los cuatro oncogenes *rol* (A, B, C y D), mientras que, en el ADN-T derecho (T_R) se encuentran los genes para la síntesis de agropina (*ags*), los genes para la síntesis de auxinas y un homólogo de *rol* B (*rol* B T_R) (Lütken *et al.*, 2017).

La transferencia del ADN-T_L es esencial para la inducción del síndrome de raíces pilosas, en contraste, la transferencia del ADN-T_R no provoca la formación de raíces en los cultivos transformados (Chandra, 2012). A pesar de esto, se ha demostrado que la expresión de los genes de auxinas puede apoyar el crecimiento de las raíces pilosas. Asimismo, el ADN-T_L a menudo parece estar presente acompañado de T_R; sin embargo, no se ha demostrado que T_R esté presente sin T_L (Lütken *et al.*, 2017).

Los productos de los genes del ADN-T funcionan de manera diferente en cada planta, lo que resulta en variación de la morfología de las raíces y de la virulencia de las cepas, es decir, el grado de infección que pueden producir reflejándose en la cantidad de raíces pilosas inducidas en un período de tiempo (Calderón-Gabriel *et al.*, 2016; Lütken *et al.*, 2017).

2.3.1. Transformación genética mediada por *Agrobacterium*

En términos prácticos, el proceso de infección inicia con la interacción en co-cultivo de *Agrobacterium* con el explante vegetal. La agrotransformación es el método de transformación

genética de plantas preferido sobre otros, como el tratamiento químico, la electroporación o el bombardeo por partículas, debido a la facilidad de uso y exactitud del proceso (Hooykaas, 2001).

A nivel celular, el proceso de transferencia del ADN-T hacia la célula vegetal involucra principalmente la acción de las proteínas Vir y la expresión de genes cromosómicos de *Agrobacterium*, sin embargo, se ha demostrado la participación de diversas proteínas de la célula huésped en varias etapas de la transformación (Tzfira y Citovsky, 2002; Gelvin, 2003). Estudios previos han detallado las diferentes fases del proceso, englobándolo en general, en una secuencia de 7 a 10 pasos importantes (Figura 2): (1) Reconocimiento e interacción por adherencia bacteria/célula vegetal, (2) Identificación de señales emitidas por la célula huésped, (3) Activación de genes *vir*, (4) Generación del ADN-T y proteínas de transferencia, (5) Exportación del ADN-T hacia la célula vegetal, (6) Importación dentro de la célula vegetal (a) a través del citoplasma, (b) importación nuclear, (c) transporte intranuclear, (7) Descubrimiento del ADN-T y (8) Integración del ADN-T al genoma vegetal (Valderrama, 2005; Tzfira y Citovsky, 2006).

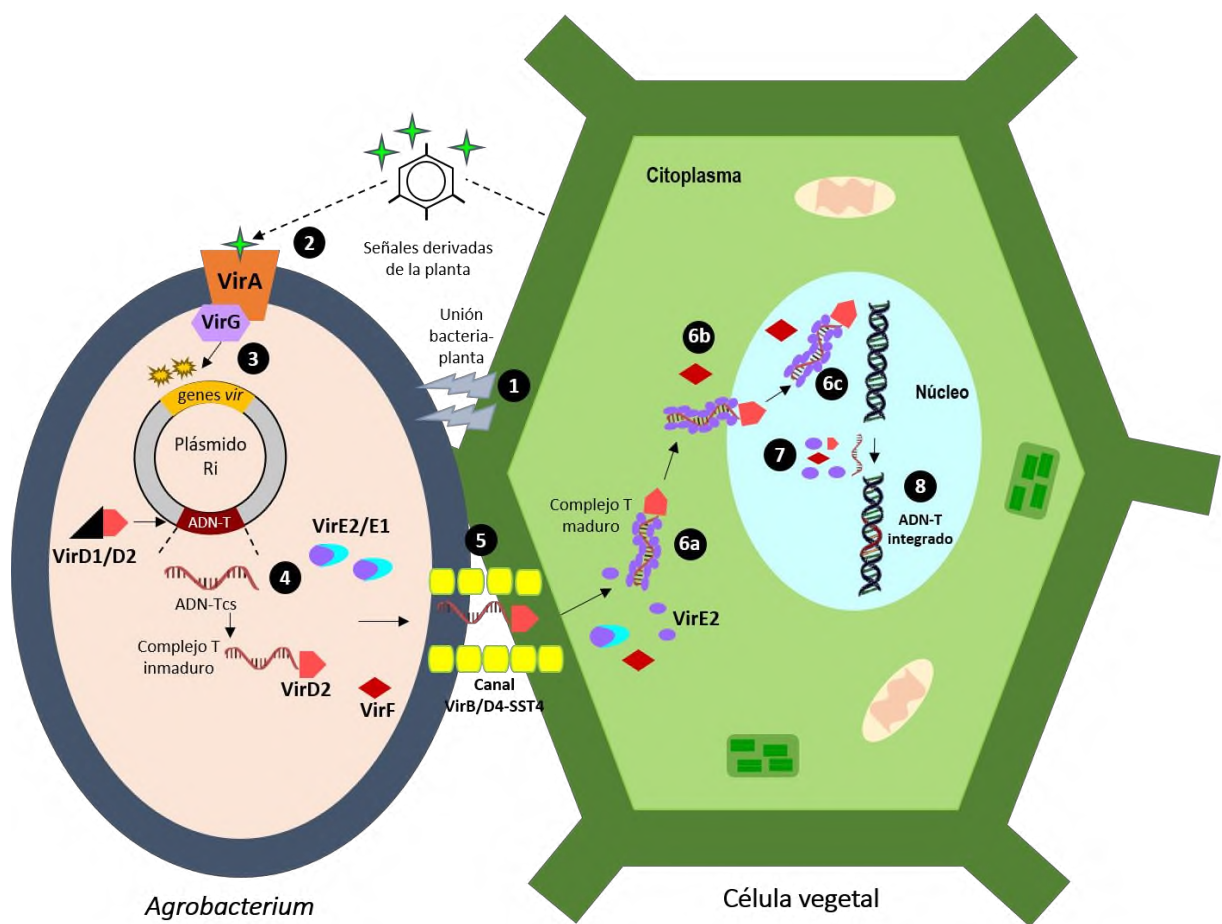


Figura 2. Proceso de transformación genética de una célula vegetal mediado por *Agrobacterium* (Modificado de Tzfira y Citovsky, 2006).

La unión física de *Agrobacterium* a la pared celular vegetal es mediada por la expresión de genes cromosómicos de la bacteria, tales como *chvA*, *chvB*, *pscA* y *att*, en conjunto con algunas proteínas de la planta (Valderrama, 2005). Si bien, se ha demostrado que esta interacción no es requerida para la consecuente activación de los genes *vir*, varios estudios revelan que es necesaria para la transformación como tal (McCullen y Binns, 2006).

Exceptuando a los genes *vir A* y *vir G*, el resto de genes *vir* permanecen silenciados hasta que se ven inducidos por reconocimiento de moléculas exudadas por la célula vegetal herida, se han identificado principalmente compuestos fenólicos específicos como el precursor de lignina y productos de degradación (Hooykaas, 2001; McCullen y Binns 2006). La inducción está mediada por VirA (quimiorreceptor) y VirG (activador de la transcripción) que forman un sistema proteico conjugado. Estas proteínas desencadenan una cascada de fosforilación que conduce a la consecuente transcripción de los genes *vir* inactivos (Hooykaas, 2001). La acción combinada de VirD1 y VirD2 conlleva a la formación de una copia del ADN-T de cadena sencilla (ADN-Tcs) que es liberada por rupturas en los extremos borde. La proteína VirD2 se une covalentemente al extremo 5' del ADN-T monocatenario transportado como un complejo T inmaduro dentro de la bacteria (Tzfira y Citovsky, 2006).

El complejo T inmaduro (ADN-Tcs/VirD2) junto con las proteínas de transferencia VirF, VirE1 y VirE2 son transportadas hacia la célula vegetal a través de un canal denominado Sistema de secreción de proteínas tipo IV (SST4). Éste es una estructura compleja formada por 11 proteínas VirB2 y proteínas VirD4 incluyendo un canal membranoso y un pilus-T (Chandra, 2012). Este paso también requiere la intervención de al menos una proteína vegetal (Hwang y Gelvin, 2004). La proteína VirE1 funciona como chaperona exportando a la proteína VirE2 en un complejo que posteriormente es disociado en el citoplasma vegetal (Valderrama, 2005).

Una vez dentro del citoplasma vegetal, la cadena de ADN-Tcs es recubierta completamente por proteínas VirE2, formando un complejo T maduro. Estas proteínas confieren al ADN-T la protección necesaria contra la degradación por nucleasas durante su transporte a través del citoplasma y dentro del núcleo (Hooykaas, 2001; Tzfira y Citovsky, 2006). Además, las proteínas VirE2 y VirD2 contienen secuencias de localización nuclear (SLN) que favorecen la focalización nuclear del complejo T (Chandra, 2012). En el transcurso dentro de la célula huésped, el complejo

T interactúa con proteínas vegetales, se ha identificado la participación de la importina α en la orientación y de las histonas en la protección del complejo nucleoproteico (Gelvin, 2010).

En los últimos pasos del proceso, dentro del núcleo tanto las proteínas Vir como las proteínas vegetales son eliminadas de la cadena T por la proteína VirF (Chandra, 2012). Una vez liberado, el ADN-T puede integrarse al genoma de la planta resultando en células transformadas de manera estable (Altpeter *et al.*, 2016).

2.3.2. Raíces Transformadas

Las raíces pilosas producidas por la infección con *A. rhizogenes* se caracterizan por tener un crecimiento acelerado, son altamente ramificadas, ageotrópicas y pueden crecer en medios sin reguladores de crecimiento (Giri y Narasu, 2000). Este fenotipo es resultado de la expresión de los oncogenes *rol*, principalmente de *rol B* (Moriuchi *et al.*, 2004).

Las raíces pilosas mantienen su estabilidad genética durante los subcultivos posteriores (Roychowdhury *et al.*, 2013). Al igual que otras entidades biológicas, estos cultivos muestran un crecimiento no lineal y variante con el tiempo (Gallego *et al.*, 2011). En condiciones de cultivo presentan características diversas, se ha observado que en presencia de luz llegan a tornarse de color verde y se ha confirmado el desarrollo de clorofila, mientras que, en condiciones de oscuridad se mantienen de color marrón blanquecino (Pandey *et al.*, 2016). Por otra parte, gracias al ageotropismo tienen la ventaja de incrementar la aireación en medio líquido y las raíces que crecen en aire tienen elevada acumulación de biomasa (Giri y Narasu, 2000). Cada raíz primaria producida en el sitio de infección puede considerarse un clon debido a que proviene de un único evento de transformación. A pesar de ello, los clones llegan a variar en morfología, crecimiento y productividad de metabolitos (Wilhelmson *et al.*, 2005).

La expresión, sola o combinada, de los genes *rol* conduce a la alteración metabólica de la célula vegetal. Se ha reportado que *rol B* es el inductor más potente del metabolismo secundario, seguido por *rol C* y *rol A*. Los efectos de *rol D* hacia este enfoque se desconocen (Bulgakov, 2008; Shkryl *et al.*, 2008). En comparación con cultivos no transformados, las raíces pilosas son una plataforma atractiva para la producción de compuestos de interés, debido a que la expresión sinérgica de los genes *rol* provoca cambios en el metabolismo secundario de las raíces

transformadas, lo cual muchas veces resulta en el aumento de los niveles producidos de metabolitos secundarios en cantidades comparables o incluso mayores a los encontrados en las plantas silvestres (Bulgakov, 2008), así como la formación de nuevos compuestos que no se encuentran normalmente en raíces no transformadas (Canter *et al.*, 2005; Hu y Du, 2006). En el caso de los cultivos mantenidos bajo condiciones de luz, exhiben el potencial de producir metabolitos exclusivos de partes aéreas de la planta (Sharma *et al.*, 2013).

Además, representan un sistema de producción continua y estable, con menor tiempo de duplicación, libre de problemas como contaminación por microorganismos, limitaciones por estacionalidad de la producción y pérdidas de calidad del compuesto debidas al procesamiento y almacenamiento (Hu y Du, 2006; Joshee *et al.*, 2013).

Es posible establecer cultivos axénicos a partir de cada raíz transformada y propagarlos indefinidamente en medios libres de reguladores de crecimiento, incluso son potencialmente escalables a nivel de biorreactor (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011; Roychowdhury *et al.*, 2013). Además, gracias a su capacidad para secretar una gran cantidad de compuestos de bajo peso molecular (metabolitos secundarios) y de alto peso molecular (proteínas) al medio circundante, facilitan el proceso de recuperación del compuesto de interés (Roychowdhury *et al.*, 2013). Por estas razones representan un sistema con costos de producción relativamente reducidos (Saito *et al.*, 2001).

Uno de los mayores atractivos de los cultivos de raíces transformadas es su alta productividad de metabolitos secundarios, sin embargo, también se han usado con otros propósitos, tales como la fitorremediación, la biotransformación, el estudio de interacciones del entorno vegetal, estudios metabólicos y la producción de proteínas heterólogas (Hu y Du, 2006; Roychowdhury *et al.*, 2013).

2.4. Transformación genética de *Stevia rebaudiana* mediada por *A. rhizogenes*

El primer reporte de transformación de *Stevia rebaudiana* mediada por *Agrobacterium* que se encuentra en la literatura, data de 1991. En ese año Yamazaki *et al.*, buscaron establecer cultivos de raíces pilosas para evaluar su contenido de esteviósidos. Desde ese entonces a la fecha, se ha realizado una variedad de estudios de agrotransformación de *Stevia* que han dado registro de hallazgos interesantes en el tema. Estas investigaciones se han centrado sobre todo en desarrollar

protocolos de transformación eficientes y establecer cultivos para evaluar y caracterizar su producción de metabolitos secundarios. Actualmente los enfoques se orientan hacia establecer cultivos de raíces pilosas, mejorar los rendimientos de producción de metabolitos secundarios y a dilucidar las vías metabólicas de interés (Tabla 1).

Tabla 1. Estudios de transformación genética de *Stevia rebaudiana* mediada por *A. rhizogenes*.

Objetivo de la transformación	Referencia
Examinar la producción de glucósidos de esteviol en cultivos de raíces pilosas de <i>S. rebaudiana</i> .	(Yamazaki <i>et al.</i> , 1991)
Establecer y optimizar el cultivo de raíces pilosas para la producción de ácido clorogénico y sus derivados.	(Fu <i>et al.</i> , 2014)
Generar cultivos de raíces transformadas útiles para el estudio de la regulación dentro de vías metabólicas.	(Calderón-Gabriel <i>et al.</i> , 2016)
Diseñar un protocolo eficiente para la obtención de cultivos de raíces pilosas productores de esteviósidos.	(Liaei <i>et al.</i> , 2016)
Obtener cultivos de raíces pilosas para su posterior manipulación en la producción de metabolitos secundarios.	(Michalec-Warzecha <i>et al.</i> , 2016)
Dilucidar los procesos subyacentes implicados en la síntesis de esteviósidos en cultivos de raíces pilosas.	(Pandey <i>et al.</i> , 2016)
Obtener cultivos de raíces transformados con el vector binario pCAMBIA1105.1 para el estudio de la regulación y producción de esteviósidos.	(Jiménez-Brigada <i>et al.</i> , 2017)
Evaluar la eficiencia de diferentes cepas de <i>A. rhizogenes</i> en la transformación de <i>Stevia</i> .	(Singh <i>et al.</i> , 2017)
Comparar la producción de glucósidos de esteviol, fenoles totales y parámetros de crecimiento de plantas transformadas, obtenidas mediante transformación mediada por <i>A. rhizogenes</i> , y plantas silvestres de <i>Stevia</i> .	(Sánchez-Córdova <i>et al.</i> , 2019)

El establecimiento de cultivos de raíces transformadas de *Stevia* se ha encontrado afectado por diversos factores como el tipo de explante, la cepa de *A. rhizogenes*, así como el tiempo de co-cultivo y la concentración de inóculo (Tabla 2). De acuerdo a Pandey *et al.*, (2016) y Michalec-Warzecha *et al.*, (2016), las hojas de *Stevia* demostraron mayor susceptibilidad que los segmentos nodales hacia la inducción de raíces pilosas, mientras que Calderón-Gabriel *et al.*, (2016), informaron tener mejores resultados de número de raíces al infectar plántulas completas en lugar de hipocotilos, teniendo máximos de 87 y 50 raíces por explante, respectivamente. Las diferencias en la vulnerabilidad de los explantes a la infección podrían deberse a la disponibilidad de células funcionalmente competentes, sus niveles de madurez y las variaciones asociadas al estado

hormonal interno (Potrykus 1990), así como a la edad de los mismos pues con ello sus capacidades fisiológicas y biosintéticas cambian (Bathoju *et al.*, 2017). Además, el origen de los explantes de *Stevia* también influye en el logro de una infección exitosa, puesto que los explantes provenientes de condiciones *in vitro* o *ex vitro* responden positivamente, a diferencia de los explantes de plántulas *in vivo* (Calderón-Gabriel *et al.*, 2016; Michalec-Warzecha *et al.*, 2016). Esto puede deberse a que estos últimos están equipados con un sistema de defensa más eficiente que las plantas que crecen en condiciones controladas y estériles y, por lo tanto, son más resistentes a la infección (Michalec-Warzecha *et al.*, 2016).

La capacidad infecciosa de la bacteria varía de acuerdo a cada especie vegetal reflejándose en la eficiencia de inducción lograda, esta variación puede atribuirse a la compatibilidad del genotipo de la planta con la cepa bacteriana (Singh *et al.*, 2014b). La sensibilidad de *Stevia* ha sido evaluada frente a un rango amplio de cepas de *Agrobacterium*, lo que ha confirmado que no es recalcitrante a la transformación. Liaei *et al.*, (2016), reportaron que la mejor frecuencia de inducción la obtuvieron con la cepa ATCC15834 seguida por la cepa R1000, con 48.7 % y 46.3 % de inducción, respectivamente. Mientras que, Singh *et al.*, (2017), encontraron que la cepa MTCC532 fue más eficiente que ATCC15834 en inducir raíces pilosas de *Stevia* con una frecuencia máxima de inducción de 94.33 %. Por su parte, Michalec-Warzecha *et al.*, (2016), hallaron que la cepa LBA9402 fue mejor que ATCC15834 para la transformación de *S. rebaudiana*, obteniendo una frecuencia de inducción máxima de 50%. Como antecedentes directos a esta investigación, dentro del grupo de trabajo en el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, se han establecido cultivos de raíces transformadas de *Stevia* con las cepas K599, AR4, LBA9402 (Calderón-Gabriel *et al.*, 2016) y K599 incluyendo el vector binario pCAMBIA1105.1 (Jiménez-Brigada *et al.*, 2017), de las cuales se encontró que la cepa LBA9402 mostró la mayor virulencia hacia *Stevia*. Aunado a estos trabajos, Sánchez-Córdova *et al.*, (2019), lograron regenerar plantas transgénicas completas de *Stevia* a partir de cultivos de raíces transformadas con la cepa AR4 de *A. rhizogenes*. Estos cultivos se han utilizado para estudiar la regulación y producción de glucósidos de esteviol, particularmente esteviósidos.

Se ha reportado que tanto el tiempo de co-cultivo como el período de inducción ejercen efectos significativos sobre la transformación (Singh *et al.*, 2014b). El período de co-cultivo generalmente implica un corto tiempo en contacto directo del explante con una suspensión bacteriana y

después un período de 2 a 3 días en medio MS antes de eliminar la bacteria con antibiótico (Fu *et al.*, 2014; Liaei *et al.*, 2016; Pandey *et al.*, 2016). Sin embargo, Singh *et al.*, (2017), en un estudio de transformación de *Stevia* encontraron que mantener el contacto por lapsos más prolongados resulta en frecuencias de inducción arriba de 90 % y que, el tiempo óptimo es dependiente de cada cepa ya que, con la cepa ATCC15834 lograron la máxima frecuencia de inducción y mayor número de raíces (91.6 % y 20.66, respectivamente) con un co-cultivo de 48 h, mientras que con la cepa MTCC532 con un co-cultivo de tan solo 3 h obtuvieron una frecuencia de inducción del 94.33 % y 24.33 raíces por explante, ambos después de 21 días de inducción. Además, dichos autores reportaron que por encima de esos tiempos, la inducción de raíces disminuyó y los explantes se deterioraron, tornándose de color café, esto debido al crecimiento bacteriano excesivo. Por otra parte, Michalec-Warzecha *et al.*, (2016), al infectar explantes de *Stevia* con la cepa ATCC15834 tan sólo lograron una eficiencia del 3 % hasta después de 30 días de inducción y Liaei *et al.*, (2016) informaron una eficiencia del 48.7 % luego de 18 días, ambos utilizando co-cultivos de 10 min en contacto directo seguido por incubación de 3 días.

Aunado a esto, Michalec-Warzecha *et al.*, (2016), explican que la concentración del inóculo también fue un factor importante que afectó tanto el porcentaje de explantes transformados como el tiempo de iniciación de la inducción, ya que obtuvieron una frecuencia de inducción del 40 % al infectarlos durante 30 min con la cepa LBA9402 a una D. O. A_{600nm} de 0.3 y las raíces aparecieron después de 13 días de inducción, en cambio, obtuvieron una eficiencia de transformación mayor (50 %) al inocular los explantes durante un tiempo más corto (10 min) con la misma cepa más concentrada (D. O. A_{600nm} 0.5), sin embargo las raíces aparecieron después de 26 días. Otros autores han reportado eficiencias de transformación aún mayores usando inóculos más concentrados, Singh *et al.*, (2017), aplicaron una concentración de inóculo de D.O. A_{600nm} 0.6 de las cepas ATCC15834 por 48 h y MTCC532 por 3 h, con las que obtuvieron frecuencias máximas de transformación de 91.6 % y 94.33 %, respectivamente, con ambas cepas la inducción de raíces comenzó a partir de 8 días de cultivo. Por su parte, Pandey *et al.*, (2016), reportaron una eficiencia máxima de 86 % al infectar hojas de *Stevia* por 10 min con la cepa A4 a una D. O. A_{600nm} de 1.0 y observaron la iniciación de la inducción después de 14 a 21 días.

Tabla 2. Factores que afectan la transformación genética de *S. rebaudiana* mediada por *A. rhizogenes*.

Cepa <i>A. rhizogenes</i>	Tipo de explante	Concentración de inóculo (D.O. A _{600nm})	Tiempo de co-cultivo	Frecuencias de inducción	Número de raíces por explante	Iniciación de la inducción	Referencia
C58C1	Hojas	NR*	20 min 48 h	NR*	NR*	21 días	(Fu <i>et al.</i> , 2014)
LBA9402 K599 AR4	Hipocotilos Plántulas	NR*	NR*	NR*	50 (H), 87 (P) 44 (H), 60 (P) 37 (H), 50 (P) *Número de raíces totales	7 días (LBA9402) 15 días (K599) 7 días (AR4)	(Calderón-Gabriel <i>et al.</i> , 2016)
ATCC15834 R1000 GM C58C1	Hojas	NR*	10 min 72 h	48.7 % 46.3 % 33.0 % 17.3 %	NR*	18 días	(Liaei <i>et al.</i> , 2016)
LBA9402 ATCC15384	Hojas Internodos	A: 0.3 B: 0.5 C: 0.1	1: 30 min, 72 h 2: 10 min, 72 h	40 % (LBA9402, Hojas, A, 1) 50 % (LBA9402, Hojas, B, 2) 3 % (ATCC15834, Internodos, C, 2)	10 (LBA9402, Hojas, A, 1) 6.2 (LBA9402, Hojas, B, 2) 10 (ATCC15834, Internodos, C, 2) *Número de raíces después de 10 días de aparición	13 días (LBA9402, Hojas, A, 1) 26 días (LBA9402, Hojas, B, 2) 30 días (ATCC15834, Internodos, C, 2)	(Michalec-Warzecha <i>et al.</i> , 2016)
A4	Hojas Segmentos nodales	1.0	10 min 72 h	86 % (Hojas) 42 % (SN)	NR*	14 – 21 días (Hojas) 21 – 28 días (SN)	(Pandey <i>et al.</i> , 2016)

ATCC15834 MTCC532	Puntas de brotes	0.6	48 h (ATCC15834) 3 h (MTCC532)	91.6 % (ATCC15834) 94.33 % (MTCC532)	20.66 (ATCC15834) 24.33 (MTCC532) *Número de raíces después de 24 días de inducción	8 días	(Singh <i>et al.</i> , 2017)
----------------------	------------------	-----	---	---	--	--------	------------------------------

NR: No reportado.

Tabla 3. Estudios de establecimiento de raíces transformadas de *S. rebaudiana* en medio líquido.

Cepa A. <i>rhizogenes</i>	Exposición a luz/oscuridad	Tiempo de cultivo	Coloración de las raíces	Acumulación de biomasa (Pf)	Producción de metabolitos secundarios	Referencia
ATCC15834	Luz	77 días	Verdes	5 g	Esteviolbiónido [13 µg/g Pf]	(Yamazaki <i>et al.</i> , 1991)
C58C1	Oscuridad	24 días	Marrón blanquecino	15.23 g	3-CQA [39.41 mg/g Ps] 3,5-CQA [48.10 mg/g Ps] 4,5-CQA [4.29 mg/g Ps] DAC-T [140.36 mg/100 ml]	(Fu <i>et al.</i> , 2014)
ATCC15834	Luz Oscuridad	45 días	Luz: Verde Oscuridad: Marrón blanquecino	NR*	Luz: Esteviónido [18 mg/g Ps] Oscuridad: ND*	(Liaei <i>et al.</i> , 2016)
LBA9402	Luz Oscuridad	30 días	Luz: Verde Oscuridad: Marrón blanquecino	Luz: 1.79 g Oscuridad: 4.43 g	NR*	(Michalec-Warzecha <i>et al.</i> , 2016)
A4	Luz Oscuridad	60 días	Luz: Verde Oscuridad: Marrón blanquecino	NR* Índice de crecimiento: Luz: 340 % Ps Oscuridad: 400 % Ps	Luz: Esteviónido en tejido [0.247 - 1.72 mg/g Ps] y en medio [0.097 - 2.12 mg/L] Oscuridad: ND*	(Pandey <i>et al.</i> , 2016)

Pf: Peso fresco, Ps: Peso seco, NR: No reportado, ND: No detectado.

3-CQA: ácido 3-cafeoilquínico, 3,5-CQA: ácido 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-CQA: ácido 4,5-dicafeoilquínico, DAC-T: derivados de ácido clorogénico totales.

En el establecimiento de cultivos de raíces transformadas de *Stevia* en medio líquido se ha observado que en oscuridad tienden a acumular mayor cantidad de biomasa, mientras que en presencia de luz el crecimiento de las raíces disminuye (Tabla 3). Michalec-Warzecha *et al.*, (2016), encontraron que el peso fresco de las raíces pilosas crecidas en condiciones de oscuridad incrementó siete veces, mientras que el peso de las raíces crecidas en luz sólo aumentó tres veces, con una acumulación de biomasa de 1.79 g en luz y 4.43 g en oscuridad después de 30 días. En el estudio realizado por Pandey *et al.*, (2016), ellos reportaron que en un período de 60 días las raíces pilosas crecidas en oscuridad mostraron un mayor índice de crecimiento (400 % de peso seco) comparadas con las raíces crecidas en luz, cuyo índice de crecimiento fue de 340 % de peso seco.

Además, se ha observado que las raíces pilosas mantenidas en exposición a luz se tornan de color verde y tienen potencial de producir metabolitos secundarios encontrados principalmente en partes aéreas de la planta y nunca en cultivos de raíces normalmente cultivados en oscuridad (Sharma *et al.*, 2013). Pandey *et al.*, (2016) relacionaron la coloración verde de las raíces con la presencia de clorofila y por lo tanto con la posible producción de glucósidos de esteviol ya que, gran parte de la síntesis de éstos se lleva a cabo en los cloroplastos. Dichos autores reportaron que las raíces verdes cultivadas en luz produjeron esteviósidos en un rango de 0.247 - 1.72 mg/g de peso seco y que la presencia de éste metabolito inhibió la síntesis de otros metabolitos de interés como el rebaudiósido A y C y el ácido clorogénico. Asimismo, las raíces cultivadas en oscuridad se mantuvieron de color marrón blanquecino y no produjeron ningún metabolito secundario. En el estudio de Yamazaki *et al.*, (1991), ellos encontraron trazas (13 µg/g de peso fresco) de compuestos tipo esteviolbiósido, un precursor del esteviósido, en cultivos de raíces de *Stevia* crecidas en presencia de luz con una acumulación de biomasa de sólo 5 g después de 77 días. Liaei *et al.*, (2016), luego de 45 días hallaron una producción de esteviósidos de 18 mg/g de peso seco en cultivos de raíces crecidas bajo iluminación, mientras que en aquéllas cultivadas en oscuridad no detectaron producción de esteviósidos. En contraste, Fu *et al.*, (2014), lograron identificar derivados de ácido clorogénico, otros metabolitos de interés, en cultivos de raíces transformadas de *Stevia* crecidas en oscuridad por 24 días, específicamente los compuestos ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-CQA) y ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-

CQA) en concentraciones de 39.41 mg/g de peso seco, 48.10 mg/g de peso seco y 4.29 mg/g de peso seco, respectivamente (Tabla 3).

Una de las ventajas de los cultivos de raíces pilosas es la secreción de metabolitos secundarios al medio circundante con lo que se facilita la recuperación del producto (Roychowdhury *et al.*, 2013). Pandey *et al.*, (2016), encontraron mejores rendimientos de esteviósidos en el medio de cultivo, con concentraciones en un rango de 0.097 - 2.12 mg/L, en comparación con los niveles encontrados en tejidos de raíces pilosas (0.247 - 1.72 mg/g de peso seco), con lo cual corroboraron la exudación de estos compuestos al medio circundante. Asimismo, se ha reportado que la producción de esteviósidos en cultivos de raíces transformadas de *Stevia* ha sido comparable con los niveles encontrados en las plantas madre, Pandey *et al.*, (2016), hallaron un contenido de esteviósidos sólo 1.05 veces menor en el cultivo de raíces pilosas en su etapa de acumulación más alta (día 75), comparado con las hojas de una planta control de 1 mes de cultivo en campo. Por su parte, Liaei *et al.*, (2016), reportaron que el contenido de esteviósidos en el cultivo de raíces (18.37 mg/g de peso seco) fue similar al medido en las plantas madre (20.45 mg/g de peso seco).

En el crecimiento y rendimiento de los cultivos de raíces pilosas existen variaciones entre rizoclonas debido a que cada raíz inducida se considera un evento único de transformación (Jiménez-Brigada *et al.*, 2017). Fu *et al.*, (2014), entre 8 rizoclonas examinadas encontraron variaciones en la acumulación de biomasa luego de 24 días de cultivo, observaron que la línea T3 exhibió la tasa de crecimiento más alta con un peso fresco de 15.23 g/100 ml, seguida por T17 con un peso fresco de 13.9 g/100ml. En cuanto a la producción de metabolitos secundarios la línea T3 fue la única que mostró la mayor producción de derivados de ácido clorogénico totales (DAC-T) con 140.36 mg/100 ml. No obstante, para cada línea el compuesto 3-CQA fue el más abundante, seguido por 3,5-CQA y el contenido del compuesto 4,5-CQA fue mucho menor que estos dos últimos en todas las líneas. Pandey *et al.*, (2016), en su investigación seleccionaron 4 rizoclonas y éstas también revelaron una notable variabilidad interclonal en su morfología y rendimiento de crecimiento basado en el período de crecimiento en condiciones de luz y oscuridad. Dos de esas rizoclonas revelaron sustancialmente mayor acumulación de pigmentos fotosintéticos a la luz tornándose de color verde. De las cuatro rizoclonas competentes, sólo SRA4 demostró el máximo potencial de crecimiento en la fase óptima (día 60) con aumento de 340 %

de peso seco en condiciones de luz y 400 % de peso seco en oscuridad. En cuanto a la producción de metabolitos secundarios, sólo en la rizoclona SRA4 se pudo observar la presencia de esteviósido en cultivo bajo condiciones de luz en una concentración máxima de 1.72 mg/g de peso seco al día 75. No se detectó producción de otros metabolitos buscados como rebaudiosidos A y C y ácido clorogénico. Los tres clones restantes no pudieron sintetizar ninguno de los metabolitos objetivo, a pesar de la existencia del aparato fotosintético funcional en la segunda rizoclona verde (SRA4H1). Con base en sus resultados, Pandey *et al.*, (2016), señalaron que la presencia de pigmentos fotosintéticos no es el único factor regulador para dirigir la síntesis de glucósidos de esteviol en cultivos de raíces pilosas de *Stevia* sino un sugerente de la potencial producción de éstos compuestos.

La variabilidad en virulencia, morfología y velocidad de crecimiento entre rizoclonas puede atribuirse a diversos factores tales como la variedad de plásmidos que albergan las cepas de *A. rhizogenes*, el efecto complejo de la interacción del ADN-T con el genoma de la planta huésped y la diversidad en el número de copias y los sitios de integración. Esta diversidad permite la oportunidad de seleccionar la línea transformada con las mejores características y rendimiento de metabolitos de interés para su producción a gran escala (Sheludko y Gerasymenko, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Stevia es una planta reconocida por la acumulación en su biomasa de glucósidos de esteviol (GEs), que son usados como edulcorantes naturales no calóricos. Adicionalmente, se ha reportado que los GEs tienen propiedades anti-hiperglucémicas, anti-hipertensivas, anti-diarreicas, anti-inflamatorias y anti-cancerígenas, llegando así a ser usados en el tratamiento de enfermedades como la diabetes, obesidad, trastornos cardiovasculares y cáncer. Debido a esto la demanda de dichos compuestos aumenta, aunque la obtención de plantas se ve limitada por problemas en la propagación clásica, por medio de germinación y esquejes, que generan plantas metabólicamente heterogéneas y con grandes diferencias en el grado de dulzor. Además, el cultivo es dependiente de la estacionalidad, el número de plantas disponibles y el proceso de extracción de los compuestos requiere de purificación, misma que encarece la producción.

Para enfrentar tal problemática, ciertas herramientas biotecnológicas, como el cultivo *in vitro* y la transformación genética, se han utilizado para obtener plantas de *Stevia*, homogéneas y libres de patógenos, además que han permitido tener control sobre los cultivos, la producción dirigida de metabolitos de interés y el estudio de las vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de los mismos. Particularmente, el cultivo de raíces transformadas ofrece ventajas para la producción de metabolitos secundarios, pues presenta crecimiento acelerado con respecto a las raíces silvestres, no requiere el uso de reguladores de crecimiento, tiene crecimiento independiente de la planta madre y mantiene la estabilidad genética a través de los subcultivos, con lo que se puede tener una producción homogénea. La transformación genética de *Stevia* ha sido reportada con diferentes cepas de *A. rhizogenes*, permitiendo el establecimiento de cultivos capaces de producir GEs en cantidades comparables a la planta completa, además de que ciertos reportes mencionan que pueden secretarlos al medio circundante, con lo que se facilita la recuperación del producto final.

Aunque se reporta que *S. rebaudiana* no es recalcitrante a la transformación mediada por *A. rhizogenes*, dicho proceso es afectado por diversos factores como la cepa bacteriana usada, el tiempo de co-cultivo, la concentración de inóculo y la exposición a luz u oscuridad; tales factores pueden modificar el crecimiento, morfología y productividad de los cultivos de raíces transformadas. En el grupo de trabajo se han establecido con anterioridad cultivos de raíces

transformadas de *Stevia* con las cepas silvestres K599, AR4 y LBA9402, y para cada uno de los casos la frecuencia de transformación fue baja (0.5 - 1%). Así, en este trabajo, usando la cepa de *A. rhizogenes* ATCC15834, se buscó establecer cultivos transformados y evaluar los efectos de tiempo de co-cultivo y tiempo de inducción de raíces pilosas sobre la frecuencia de transformación. La evaluación de estos efectos permitió mejorar el protocolo general de transformación mediada por *A. rhizogenes* en el laboratorio de cultivo de células y tejidos vegetales, además de aumentar el banco de cultivos de raíces transformadas de *S. rebaudiana* que serán útiles en futuros estudios comparativos y de producción de GEs.

4. HIPÓTESIS

El establecimiento de cultivos de raíces transformadas de *S. rebaudiana* con la cepa silvestre ATCC15834 de *A. rhizogenes* será influenciado significativamente por el tiempo de co-cultivo y de inducción de raíces pilosas.

5. OBJETIVO PRINCIPAL

Establecer cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* Bertoni mediante un protocolo eficiente de agrotransformación con la cepa silvestre ATCC15834 de *Agrobacterium rhizogenes*.

6. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Realizar la inducción de raíces pilosas de *Stevia rebaudiana* mediada por *Agrobacterium rhizogenes* evaluando distintos tiempos de co-cultivo.
2. Confirmar la transformación de los cultivos de raíces pilosas por PCR.
3. Establecer los cultivos de raíces transformadas de *S. rebaudiana* y caracterizar parcialmente su crecimiento y morfología en medio líquido.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Estrategia experimental

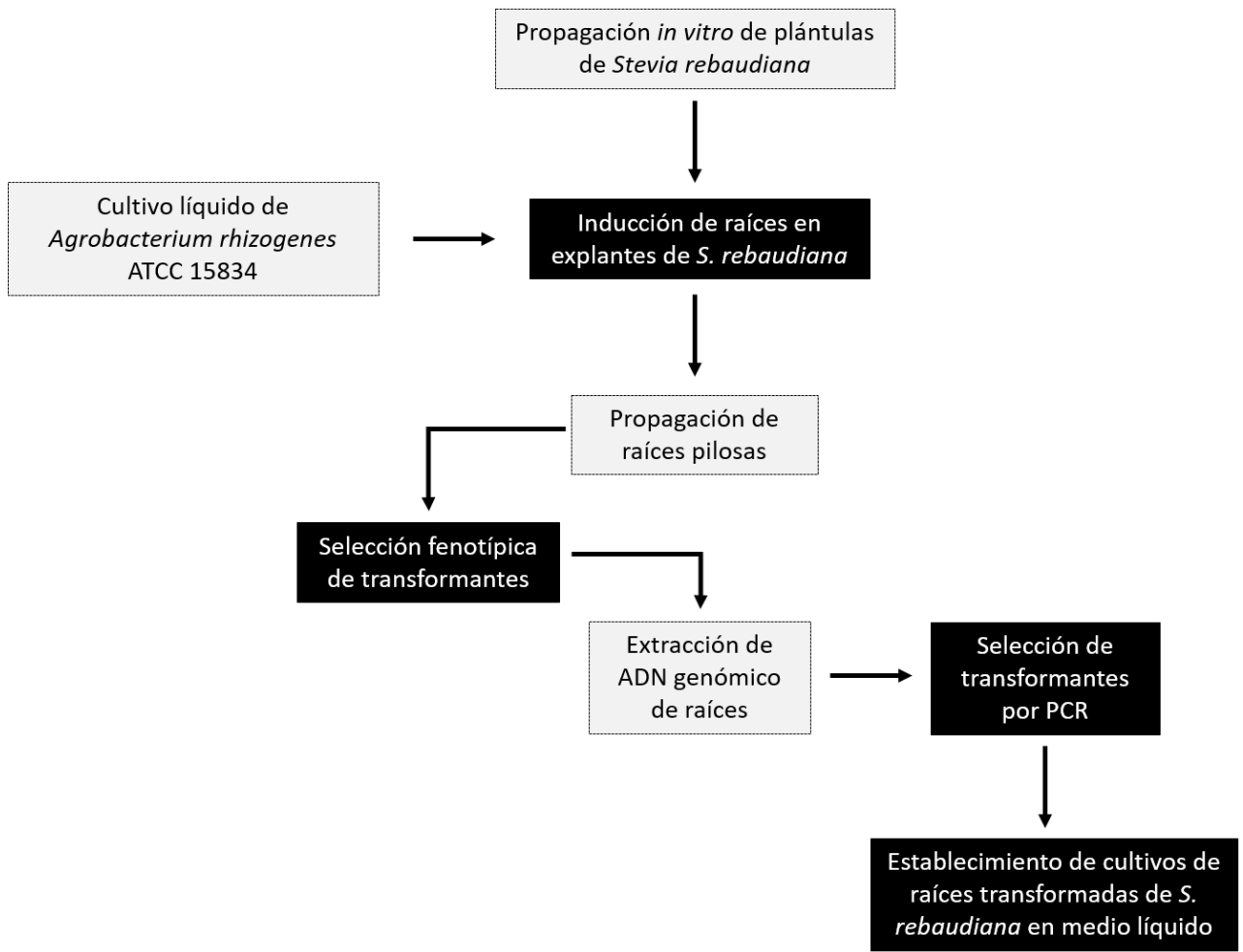


Figura 3. Diagrama de estrategia experimental.

7.2. Metodología

7.2.1. Material vegetal

A partir de plántulas de *S. rebaudiana*, cuyo cultivo *in vitro* se estableció previamente por Montes-Palmeros *et al.*, (2016) en el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, se obtuvo el material vegetal por inducción de brotes y posterior regeneración y enraizamiento de plántulas completas.

Para la inducción de brotes, en condiciones de esterilidad se cultivaron 5 explantes meristemáticos de brotes de aproximadamente 1 cm en medio MS semi-sólido (MS 4.43 g/L, sacarosa 30 g/L, BAP 1 mg/L, AIA 0.5 mg/L, fitagel 1.8 g/L, pH 5.8) con y sin vitaminas (Murashige y Skoog, 1962). Se incubaron por 20 días a 25 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 h/8 h luz/oscuridad.

Para la obtención de plántulas, en condiciones de esterilidad se cultivaron 3 brotes apicales de aproximadamente 3 cm de longitud, en medio MS semi-sólido, completo o a la mitad ($\frac{1}{2}$ MS), solidificado con agar o fitagel (MS 4.40 g/L o $\frac{1}{2}$ MS 2.2 g/L, sacarosa 20 g/L, IBA 0.5 mg/L, fitagel 2.20 g/L o agar 8 g/L, pH 5.8) adicionado con vitaminas (Murashige y Skoog, 1962). Se incubaron por 45 días a 25 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 h/8 h luz/oscuridad para permitir el crecimiento y enraizamiento. Se calcularon los índices de crecimiento (I. C.) de las plántulas de acuerdo a la fórmula:

$$I. C. = \frac{(L_f - L_i)}{L_i}$$

Donde L_f es la longitud final de las plántulas después de 45 días de cultivo y L_i es la longitud inicial de los brotes.

7.2.2. Material bacteriano

Se utilizó la cepa tipo agropina ATCC15834 de *Agrobacterium rhizogenes*, la cual contiene el plásmido silvestre Ri 15834, que alberga los genes *rol* A, B, C y D fundamentales en la inducción de raíces (Lütken *et al.*, 2017); dicha cepa fue obtenida de la Colección Nacional de Cepas microbianas y Cultivos celulares (CDBB) del CINVESTAV-IPN.

El crecimiento de la bacteria se realizó en agar nutritivo para la caracterización morfológica de colonias y, para los cultivos en medio líquido, se creció en tubos con 10 ml de caldo Luria Bertoni (LB) (peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0) a 28 °C en agitación constante de 180 rpm por 48 h (Calderón-Gabriel *et al.*, 2016). De estos cultivos se tomó 1/100 para inocular matraces de 50 ml de caldo LB y usarlos para caracterización, criopreservación de la cepa y/o infección de plántulas, según fuera el caso. Como parte de la caracterización de la cepa, además se llevó a cabo una cinética de crecimiento a fin de conocer su comportamiento en medio líquido. El crecimiento se monitoreó por cuantificación de la densidad óptica (D.O.) A_{600nm} en diferentes tiempos.

Para la criopreservación de la cepa, se realizaron cultivos en matraces con 20 ml de caldo LB a 28 °C en agitación a 180 rpm hasta alcanzar la fase media de crecimiento. Una vez lograda la concentración requerida, los cultivos se colocaron en hielo por 10 min, luego se adicionó glicerol estéril al 20 % (concentración final) frío y se homogeneizó la mezcla. La cepa se dividió en alícuotas de 1 ml congeladas en N₂ líquido previo a su almacenamiento a -80 °C.

7.2.3. Transformación genética de *Stevia rebaudiana* mediada por *Agrobacterium rhizogenes*

Para la inducción de raíces pilosas se siguió el protocolo reportado por Singh *et al.*, (2017) con modificaciones, descrito a continuación.

7.2.3.1. Condiciones de cultivo de *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 para infección de plántulas

La cepa ATCC15834 de *Agrobacterium rhizogenes* se creció en un tubo con 5 ml de caldo LB a 28 °C, 180 rpm en oscuridad por 48 h. Posteriormente, se inoculó con 1 ml del cultivo anterior un matraz con 50 ml de caldo LB y se incubó a 28 °C, 180 rpm en oscuridad. A las 53 h se midió la D.O. A_{600nm} teniendo 0.38 ± 0.02 , para luego coleccionar las células por centrifugación a 4 200 *xg* por 20 min a T.A. La pastilla celular se resuspendió en 50 ml de medio MS basal y se incubó a 28 °C, 180 rpm en oscuridad por 1 h para atemperar el cultivo.

7.2.3.2. Inducción de raíces pilosas en explantes de *Stevia rebaudiana*

En condiciones asépticas de campana de flujo laminar, se cortaron explantes meristemáticos de plántulas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* de 45 días de edad. Con ayuda de un bisturí estéril se realizaron incisiones en hojas y tallos para luego ser co-cultivados con la suspensión bacteriana en medio MS a 28 °C, 180 rpm, en oscuridad por 24 h y 48 h. Se incluyó como control el co-cultivo de explantes en agua destilada estéril. Al finalizar los tiempos de co-cultivo se realizó un lavado de los explantes infectados con medio MS líquido adicionado con cefotaxima (250 mg/L) por 1 min y posterior enjuague con agua destilada estéril por 1 min. Los explantes fueron sembrados en medio MS semisólido sin hormonas de crecimiento ni antibiótico. Se mantuvieron en el cuarto de cultivo a 25 °C ± 2 °C con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad. Las observaciones se tomaron a los 7, 14 y 21 días.

7.2.3.3. Propagación de raíces inducidas

Las raíces inducidas se separaron de los explantes después de su aparición cuando tenían ≈1 cm de longitud y fueron transferidas a medio MS semisólido sin reguladores de crecimiento, adicionado con vitaminas y cefotaxima (300 mg/L) para su desarrollo individual. Se mantuvieron en el cuarto de cultivo a 25 °C ± 2 °C con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad para observar el progreso de características típicas de raíces pilosas, tales como crecimiento acelerado en ausencia de fitohormonas, abundantes ramificaciones y ageotropismo (López *et al.*, 2014). Se realizaron 2 subcultivos a medio fresco adicionado con cefotaxima (200 mg/L) hasta conseguir cultivos axénicos.

Después de los primeros 10 días de cultivo individual se midieron las raíces y como primer filtro, se seleccionaron aquellas de mayor tamaño que mostraron las características típicas antes descritas. Éstas y el resto de raíces se mantuvieron por un período de 30 días en observación para realizar la selección fenotípica de candidatas y propagar biomasa suficiente para la posterior confirmación de transformación por PCR. Se determinaron los índices de crecimiento (I. C.) de las raíces de acuerdo a la fórmula:

$$I. C. = \frac{(L_f - L_i)}{L_i}$$

Donde L_f es la longitud final de las raíces después de 30 días de cultivo y L_i es la longitud a los 10 días.

7.2.4. Confirmación de la transformación de cultivos de raíces

Para confirmar la transformación se seleccionaron las raíces con el fenotipo característico para realizar la extracción de ADN genómico y posterior PCR punto final siguiendo los protocolos descritos a continuación.

7.2.4.1. Extracción de ADN genómico de raíces pilosas

Se aislaron aproximadamente 100 mg de raíces pilosas seleccionadas y raíces no transformadas (control negativo) y se maceraron con N_2 líquido para extracción de ADN genómico (ADNg) siguiendo el protocolo de Collins *et al.*, (1987) con modificaciones, mostrado a continuación.

A \approx 100 mg de raíces maceradas se agregaron 400 μ l de búfer de lisis (NaCl 0.08 M, Sacarosa 0.16 M, EDTA 0.06 M, SDS 5 %, Tris- HCl 0.1 M pH 8.6), se homogeneizó con vórtex. Se incubaron a 64 °C por 30 min. Se agregaron 56 μ l de acetato de potasio 8 M y se mezcló por inversión. Se incubó a -20 °C por 1 h. Se centrifugó a 24 200 xg por 5 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 500 μ l de isopropanol frío y se colocó en hielo por 5 min. Se centrifugó a 24 200 xg por 5 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Se agregaron 500 μ l de etanol al 70 % frío y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 24 200 xg por 5 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Se secaron las pastillas (pellets) invirtiendo los tubos sobre papel por 10 min. Los pellets se resuspendieron en 50 μ l de agua desionizada estéril. Se agregó ARNasa A (20 μ g/ml) y se incubaron a 37 °C por 1 h. El ADNg fue cuantificado con espectrofotómetro NanoDrop 2000 a 260 nm, la pureza con respecto a proteínas fue calculada por la relación de absorbancia 260 nm/280 nm.

7.2.4.2. PCR punto final

El análisis por PCR se realizó con primers para el gen *rol B* que amplifican un fragmento de 150 pb, dicho gen se ubica en el ADN de transferencia del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* (Bekheet *et al.*, 2013). Se utilizó el máster mix Crystal Taq master 2x (Jena Bioscience) que ya incluye dNTPs y sales amortiguadoras. Se prepararon reacciones de 20 μ l totales siguiendo las indicaciones del fabricante (Crystal Taq master 1x, 0.4 μ M de cada primer, 200 ng* ADN templado,

agua grado PCR). Se incluyeron controles de PCR y controles de transformación. Como control positivo de PCR (Ctrl+) se usó un extracto de plásmido de *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 (200 ng/μl), y como control negativo (Ctrl-) se incluyó un plásmido extraído de *E. coli* DH5α (200 ng/μl). Los controles de transformación fueron el extracto de ADN genómico de raíces transformadas K599 como control positivo transformado (RCtrlT) y el extracto de ADN genómico de raíces no transformadas de *Stevia rebaudiana* como control negativo silvestre (RCtrlS). Los primers utilizados para amplificar el gen *rol* B fueron diseñados previamente por el grupo de trabajo (ODro/B: 5'- AGAGCTTCAAGATGCCTTCG-3', ORro/B: 5'- CGCGTAAGGATTTCTGCATT-3'). Las condiciones de reacción en el termociclador (Veriti, Applied Biosystems) se programaron de la siguiente manera: desnaturalización inicial (95 °C, 2 min), seguido por 30 ciclos de desnaturalización (95 °C, 20 s), alineamiento (64 °C, 20 s) y elongación (72 °C, 20 s), luego elongación final (72 °C, 2 min) y por último, enfriamiento a 4 °C por tiempo indefinido.

7.2.4.3. Electroforesis de extractos de ADN genómico y productos de PCR

Los extractos de ADN genómico y los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1 % y 2 %, respectivamente. Se utilizaron los marcadores de peso molecular 1 kb DNA ladder (Jena Bioscience) para ADN genómico y 50 bp DNA ladder (Jena Bioscience) para productos de PCR. El corrimiento se llevó a cabo mediante un campo eléctrico en la cámara electroforética con búfer TAE 1X. Después, se tiñó el gel con bromuro de etidio al 1 % por 5 min y se enjuagó con agua destilada por 1 min. Al finalizar la electroforesis, los geles se visualizaron con la ayuda de un fotodocumentador para verificar la presencia del ADN correspondiente.

7.2.5. Establecimiento y propagación de cultivos de raíces transformadas en medio líquido

Las raíces confirmadas se usaron para establecer el cultivo en medio líquido bajo condiciones de asepsia estándar en campana de flujo laminar. Para ello, se tomó 1 g de biomasa de cada raíz para inocular matraces con 25 ml de medio MS sin reguladores de crecimiento, adicionado con cefotaxima (250 mg/L) y vitaminas, ajustado a pH 5.8. Éstos se incubaron a 25 °C ± 2 °C a 115 rpm con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad por 15 días para generar biomasa suficiente para realizar una cinética de crecimiento.

La cinética de crecimiento se llevó a cabo con el fin de conocer el comportamiento de las raíces transformadas de *S. rebaudiana* en medio líquido. La cuantificación del crecimiento celular fue realizada mediante peso fresco, tomando muestras cada 7 días durante 21 días. Se utilizó como control un cultivo de raíces no transformadas de *S. rebaudiana* crecidas en medio MS adicionado con IBA (0.5 mg/L). Para cada línea se inoculó 1 g de biomasa en matraces con 25 ml de medio MS sin reguladores de crecimiento adicionado con cefotaxima (250 mg/L) y vitaminas, ajustado a pH 5.8. Los cultivos se mantuvieron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 115 rpm con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad. Se determinaron los índices de crecimiento (I. C.) de la biomasa de las raíces de acuerdo a la fórmula:

$$I. C. = \frac{(P_f - P_i)}{P_i}$$

Donde P_f es el peso final de las raíces después de 24 días de cultivo y P_i es el peso inicial del inóculo.

7.2.6. Análisis estadístico

Los efectos de los diferentes tratamientos se evaluaron usando un diseño de bloques al azar y análisis de varianza siguiendo el modelo lineal general. Los análisis de comparación múltiple de medias se realizaron por el método de Tukey con un 95 % de confianza. Todos los análisis de datos se realizaron con el programa Minitab 16.1.0.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Propagación *in vitro* de plántulas de *Stevia rebaudiana*

8.1.1. Efecto del contenido de vitaminas en el medio de cultivo sobre la inducción de brotes

La inducción de brotes de *S. rebaudiana* usando explantes meristemáticos de brotes crecidos en medio MS con BAP (1 mg/L) y AIA (0.5 mg/L), se vio favorecida por el uso de medio sin vitaminas, donde el número de brotes por explante obtenido después de 20 días de cultivo fue de 25.33 ± 5.77 , mientras que al utilizar medio con vitaminas se consiguieron solamente 13.40 ± 2.10 brotes por explante (Tabla 4), estos resultados coinciden con la investigación de Dan y Mai, (2014), quienes encontraron mejores efectos sobre la multiplicación de brotes de *Stevia* con medio MS sin vitaminas y BAP (3.5 mg/L). Este efecto también se observó en el tamaño de los brotes, puesto que los brotes crecidos en medio MS sin vitaminas alcanzaron un tamaño de 2.43 ± 0.37 cm, siendo mayores que los brotes crecidos en medio MS con vitaminas, cuyo tamaño fue de 1.45 ± 0.37 cm (Tabla 4). Los resultados obtenidos coinciden con estudios anteriores donde se ha mencionado que el uso de BAP promueve un mayor número de brotes (Jitendra *et al.*, 2012; Hossain *et al.*, 2008). Además, se ha reportado que al aumentar el número de brotes es común que el tamaño de éstos se vea afectado, debido a que probablemente los nutrientes tomados por las células se distribuyen a más brotes (Dan y Mai 2014).

Tabla 4. Resultados de la inducción de brotes de *S. rebaudiana* después de 20 días de cultivo.

Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Brotes por explante	Tamaño de brotes (cm)
MS con vitaminas	BAP (1 mg/L), AIA (0.5 mg/L)	13.40 ± 2.10^b	1.45 ± 0.37^b
MS sin vitaminas	BAP (1 mg/L), AIA (0.5 mg/L)	25.33 ± 5.77^a	2.43 ± 0.37^a

Los datos son la Media \pm DE de 3 réplicas. Letras iguales en cada columna indican que no existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 %.

En cuanto al aspecto de los brotes, en ambos medios de cultivo los brotes obtenidos fueron de tallos muy delgados y hojas muy pequeñas, lanceoladas y sin pilosidades, de color verde (Figura 4). Estas respuestas coinciden con lo reportado por Das *et al.*, (2011) y Jitendra *et al.*, (2012), quienes mencionan que la incorporación de auxinas, como AIA o ANA, pese a que puede promover ligeramente la proliferación de *S. rebaudiana*, tiene consecuencias desfavorables en el

fenotipo de los brotes originados, resultando en tallos muy delgados y hojas poco desarrolladas. Además, se registró la formación de callos a partir de los 5 días de cultivo en medio sin vitaminas, en tanto que, en presencia de vitaminas no sucedió callogénesis en ningún momento del período de inducción. Este efecto ya ha sido reportado en estudios anteriores, donde el uso de las citoquininas BAP o TDZ, comúnmente ha inducido la formación secundaria de callos en la proliferación de brotes de *Stevia rebaudiana* (Das *et al.*, 2011; Javed *et al.*, 2017).

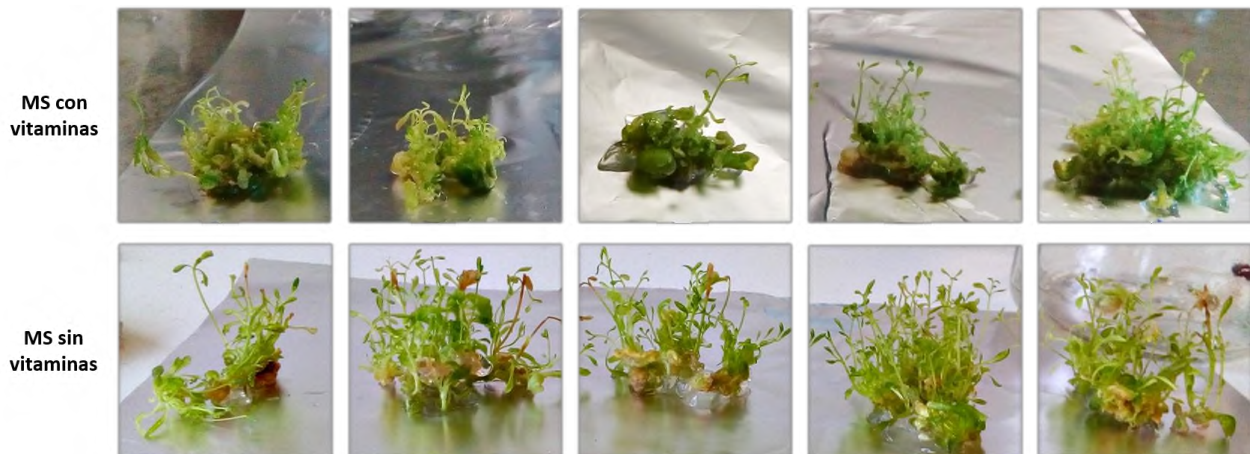


Figura 4. Brotes inducidos por explante de *S. rebaudiana* en medio MS con y sin vitaminas después de 20 días de cultivo.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la adición de vitaminas al medio de cultivo afecta la inducción de brotes de *Stevia* y que el uso de medio MS sin vitaminas con BAP (1 mg/L) y AIA (0.5 mg/L) es óptimo para inducir un alto número de brotes (25.33 ± 5.77). Si bien el tamaño de los brotes obtenidos con este medio fue bajo (2.43 ± 0.37 cm), al transferirse a medio de enraizamiento continuó su crecimiento, pues se ha mencionado que las auxinas necesarias para la inducción de raíces también juegan un papel importante en la elongación de brotes (Laribi *et al.*, 2012).

8.1.2. Efecto de la concentración del medio y el agente gelificante sobre la regeneración y enraizamiento de plántulas

En las Tablas 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos después de 45 días de cultivo del tamaño e índices de crecimiento de las plántulas, así como el número de raíces por brote y tamaño de las raíces en dos concentraciones de sales del medio MS (completo y a la mitad) combinadas con dos tipos de agente gelificante (agar y fitagel) e IBA (0.5 mg/L).

Tabla 5. Resultados de la regeneración de plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana* después de 45 días.

Concentración de medio	Agente gelificante	Tamaño (cm)	Índice de crecimiento de plántulas (L _f - L _i)/L _i
MS completo	Fitagel	10.23 ± 0.95 ^b	2.52 ± 0.32 ^b
	Agar	17.27 ± 0.74 ^a	5.70 ± 0.31 ^a
MS a la mitad	Fitagel	9.72 ± 1.28 ^b	2.54 ± 0.19 ^b
	Agar	17.95 ± 2.85 ^a	5.06 ± 0.27 ^a

Los datos son la Media ± DE de 3 réplicas. Letras iguales en cada columna indican que no existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 %. (L_f= longitud final, L_i= longitud inicial).

De manera general, la mejor respuesta en cuanto al crecimiento de las plántulas se consiguió al emplear agar como gelificante, teniendo el mayor tamaño (17.95 ± 2.85 cm) con MS a la mitad y un aumento máximo de 5.70 ± 0.31 veces del tamaño de acuerdo al índice de crecimiento con MS completo mientras que, los valores mínimos se produjeron usando fitagel con ambos medios. De acuerdo al análisis estadístico, el uso de las distintas concentraciones de medio MS fue igualmente efectivo, habiendo diferencias significativas solamente entre los agentes gelificantes siendo superior el uso de agar (Tabla 5). En comparación con los reportes de Javed *et al.*, (2017), el tamaño máximo de las plántulas en este estudio fue mayor, ya que dichos autores usando medio MS con IBA (0.5 mg/L) y agar consiguieron plántulas de sólo 11 cm. Además, el crecimiento de los brotes concuerda con los hallazgos de Sivaram y Mukundan, (2003), quienes mencionan que el medio de enraizamiento (MS + IBA (0.5 mg/L)) promovió la elongación de brotes de *Stevia*.

El enraizamiento se indujo al 100 % en todos los medios, sin embargo, el mayor número de raíces por brote (11.00 ± 0.98) y las raíces de mayor tamaño (11.21 ± 0.96 cm) se produjeron en medio MS a la mitad con fitagel, además, este efecto fue estadísticamente igual al uso de agar con ambas concentraciones de medio. Solamente el uso de MS completo con fitagel causó los resultados más bajos de número de raíces por brote (6.33 ± 1.01) y tamaño de raíces (8.25 ± 0.28 cm) (Tabla 6). Estos hallazgos están de acuerdo con lo señalado por estudios anteriores donde se encontró que tanto el medio MS como ½MS son útiles para la inducción de raíces a partir de brotes de *Stevia* (Dan y Mai, 2014; Lata *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos fueron similares a lo reportado por Janarthanam *et al.*, (2009), quienes obtuvieron una mejor respuesta al aplicar ½MS con IBA (0.5 mg/L), sin embargo, sus datos de número de raíces (7.3) y tamaño de raíces (5.5 cm) fueron inferiores a los aquí reportados.

Durante el enraizamiento se observó la formación secundaria de callos en la base de los tallos. Sobre esta consecuencia, el uso de fitagel tuvo el mismo efecto con ambas concentraciones de medio, seguido por la combinación de MS completo con agar, produciendo las mayores cantidades de callos. La menor callogénesis se observó con MS a la mitad y agar (Tabla 6). Esta respuesta secundaria se ha documentado en otros trabajos, donde se reporta que el uso de IBA o ANA promueve la formación de callos en la base de los tallos en mayor medida si se usan concentraciones altas (Ahmed *et al.*, 2007; Jahan *et al.*, 2014).

Tabla 6. Resultados del enraizamiento de plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana* después de 45 días.

Concentración de medio	Agente gelificante	Número de raíces por brote	Tamaño de raíces (cm)	Formación de callos en la base
MS completo	Fitagel	6.33 ± 1.01 ^b	8.25 ± 0.28 ^b	+++
	Agar	9.56 ± 1.13 ^a	9.53 ± 0.47 ^{ab}	++
MS a la mitad	Fitagel	11.00 ± 0.98 ^a	11.21 ± 0.96 ^a	+++
	Agar	10.56 ± 1.22 ^a	10.46 ± 1.05 ^a	+

Los datos son la Media ± DE de 3 réplicas. Letras iguales en cada columna indican que no existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 %. (+ = poco, ++ = medio, +++ = abundante).

Respecto a la apariencia de las plántulas, todas exhibieron hojas verdes, lanceoladas-ovaladas, aserradas, dispuestas de manera contraria siendo relativamente pequeñas, a excepción de aquéllas correspondientes a las plántulas de medio MS a la mitad con fitagel. Todas presentaron tallos verdes, delgados con la formación de callo blanco en la parte inferior sobre todo en medio MS a la mitad con agar (Figura 5). La aparición de los meristemos radicales sucedió a partir de los 18 a 20 días de cultivo en todos los medios probados. En la Figura 6 se muestran las raíces inducidas en las diferentes combinaciones de medio MS y agentes gelificantes después de 45 días de cultivo. Las raíces emergidas en todos los tratamientos fueron alargadas, gruesas y de color verde con tonalidades café, éstas características corresponden al fenotipo común de las raíces inducidas con IBA (Ahmed *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2016).

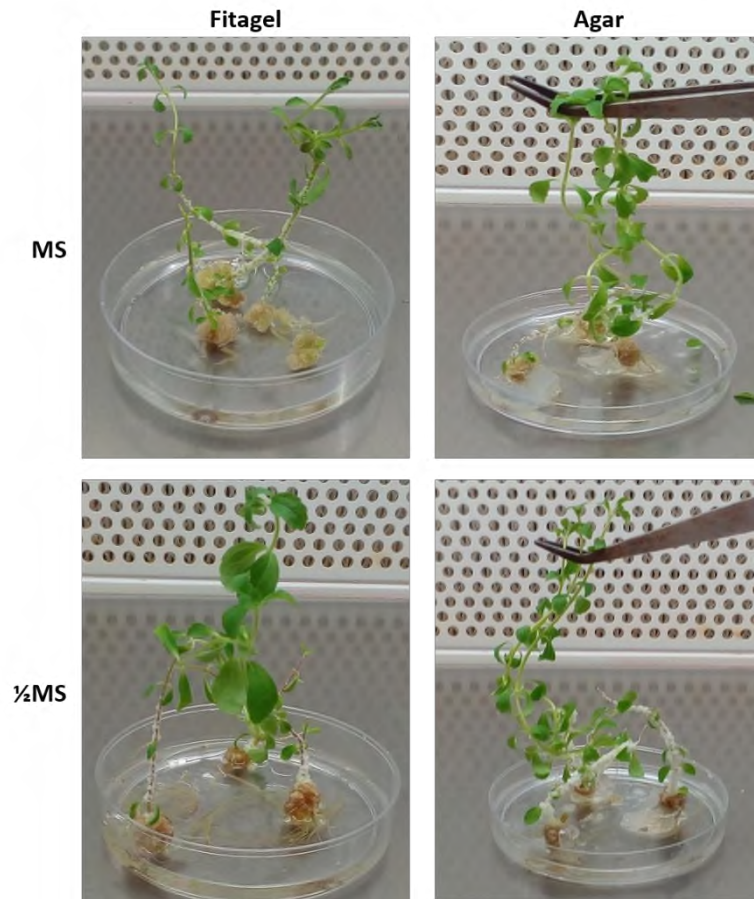


Figura 5. Plántulas de *S. rebaudiana* obtenidas después de 45 días de cultivo en medio MS semisólido.

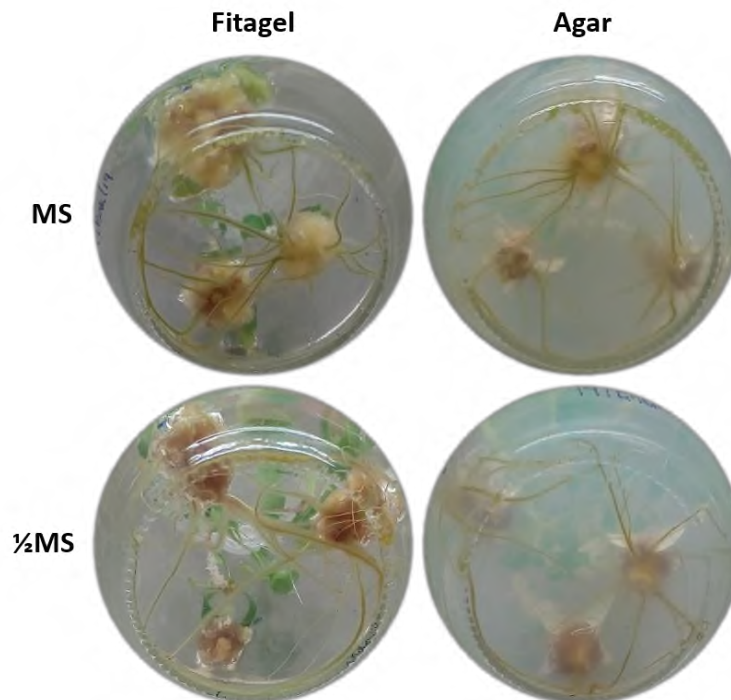


Figura 6. Raíces de *S. rebaudiana* inducidas en diferentes combinaciones de medio MS/Agente gelificante después de 45 días de cultivo.

La propagación *in vitro* de plántulas de *Stevia* fue satisfactoria. Se encontró que ambas concentraciones de medio MS (1 y ½) fueron efectivas en el enraizamiento y la elongación de las plántulas, mientras que el agente gelificante ejerció un efecto sobre el tamaño de éstas últimas. La mejor combinación para propagar el material vegetal fue medio MS a la mitad con IBA (0.5 mg/L) y agar, ya que originó las plántulas de mayor tamaño (17.95 ± 2.85 cm) con un alto número y tamaño de raíces por brote (10.56 ± 1.22 , 10.46 ± 1.05 cm, respectivamente) y además, propició la menor formación de callos como respuesta secundaria en un período de 45 días.

8.2. Caracterización de la cepa ATCC15834 de *Agrobacterium rhizogenes*

Para caracterizar la morfología colonial de la cepa bacteriana, se observó su crecimiento en medio agar nutritivo. Las colonias obtenidas fueron homogéneas y presentaron características típicas de *Agrobacterium*, de acuerdo a lo reportado por Alippi *et al.*, (2011), siendo mucosas, convexas, circulares y con márgenes enteros. Además, la coloración puede variar dependiendo de los componentes del medio empleado, teniendo en este caso un color amarillo blanquecino parecido al del medio agar nutritivo (Figura 7).

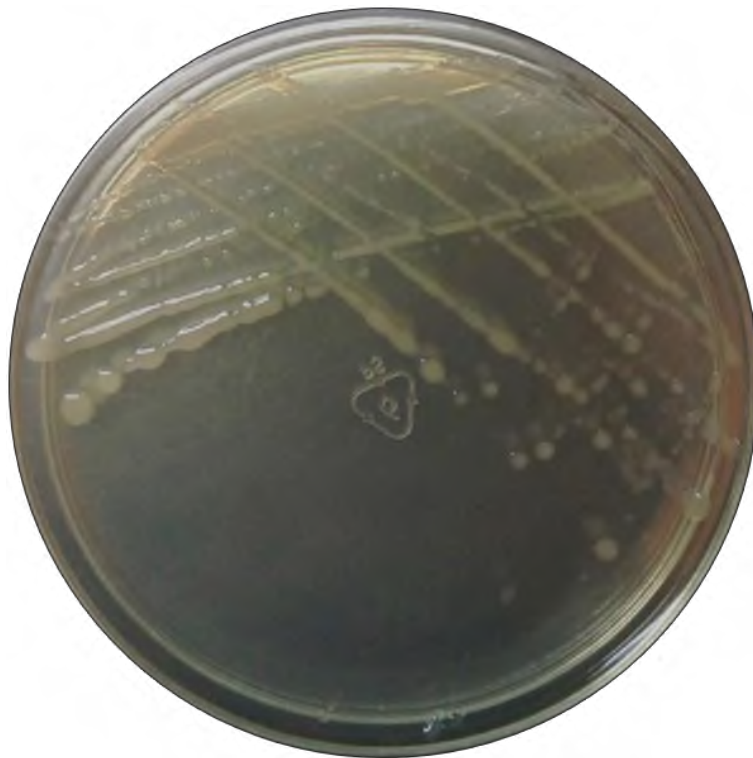


Figura 7. Morfología colonial de *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 en Agar nutritivo incubado 48 h a 28 °C.

Los protocolos de infección con *Agrobacterium* recomiendan emplear suspensiones bacterianas en fase media de crecimiento o por encima de ella para obtener mejores resultados (Michalec-Warzecha *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2017), por lo cual se realizó una cinética de crecimiento a fin de conocer el comportamiento de la cepa en medio líquido. En la Figura 8 se observa que la fase media logarítmica (D.O. A_{600nm} 0.57 ± 0.02) se alcanzó alrededor de las 22 h de cultivo. En este caso se observa que la fase exponencial de *A. rhizogenes* ATCC15834 transcurre entre las 20 a 30 h de cultivo, bajo condiciones de incubación típicas para *Agrobacterium* (Maistrenko *et al.*, 2015). También se exhibe que después de 26 h de cultivo la cepa rebasó el valor de D.O. A_{600nm} de 1.0, teniendo su máximo crecimiento a las 48 h (D.O. A_{600nm} 1.89 ± 0.01) sin alcanzar aún su fase estacionaria de crecimiento. Con base en estos resultados, los cultivos posteriores se realizaron aplicando las mismas condiciones, teniendo comportamientos de la cepa similares.

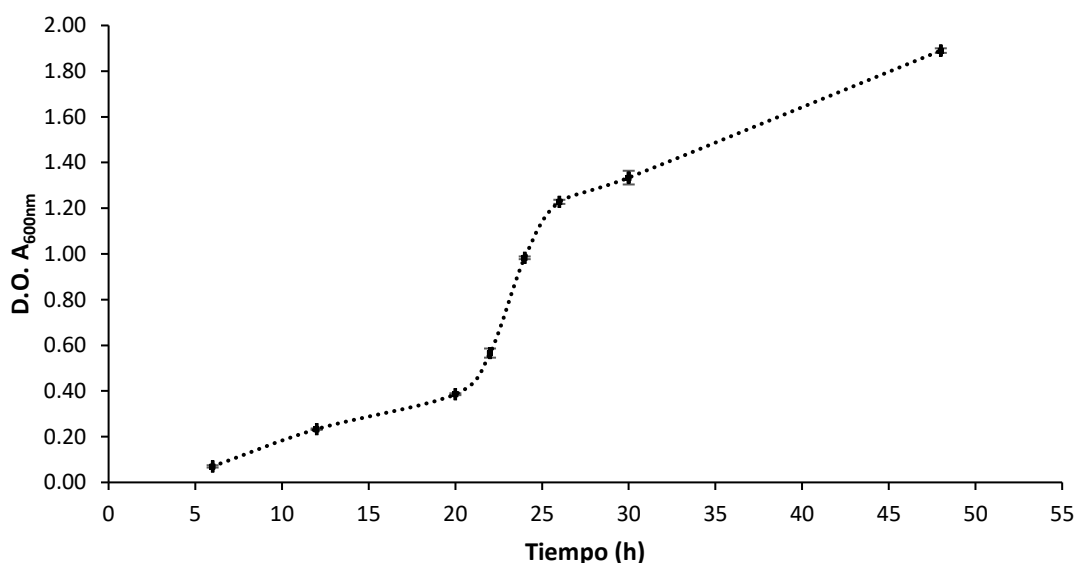


Figura 8. Cinética de crecimiento de *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 en medio LB líquido. Las barras son la DE de la media de 3 réplicas.

8.3. Transformación de *Stevia rebaudiana* mediada por *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834

8.3.1. Inducción de raíces pilosas en explantes de *Stevia rebaudiana*

La infección de *Stevia* por *Agrobacterium* se llevó a cabo al poner explantes meristemáticos de plántulas *in vitro* en co-cultivo con una suspensión bacteriana por 24 h y 48 h. Los explantes cultivados en agua destilada estéril bajo las mismas condiciones se utilizaron como controles. Las

observaciones se tomaron a los 7, 14 y 21 días, los valores obtenidos de frecuencias de inducción y número de raíces se reportan en la Tabla 7. Las primeras raíces pilosas emergieron alrededor de los 5 a 7 días para ambos co-cultivos de prueba (24 h y 48 h). Después de 7 días de inducción no se observaron raíces en los controles, sino hasta los 14 y 21 días para co-cultivos de 24 h y 48 h, respectivamente (Figura 11).

Tabla 7. Resultados de la inducción de raíces en explantes de *S. rebaudiana* infectados con *A. rhizogenes*.

Tiempo de co-cultivo	Período de inducción	Frecuencias de inducción (%)	Número de raíces inducidas por explante
24 h	7 días	33.33 ± 1.00 ^c	0.56 ± 0.10 ^c
	14 días	55.56 ± 6.50 ^b	1.33 ± 0.32 ^b
	21 días	88.89 ± 7.50 ^a	2.44 ± 0.35 ^a
Control 24 h	7 días	---	---
	14 días	---	0.44 ± 0.19 ^c
	21 días	---	0.44 ± 0.19 ^c
48 h	7 días	77.78 ± 5.50 ^a	1.00 ± 0.25 ^{b^c}
	14 días	77.78 ± 5.50 ^a	1.56 ± 0.25 ^b
	21 días	55.56 ± 6.50 ^b	0.89 ± 0.20 ^{bc}
Control 48 h	7 días	---	---
	14 días	---	---
	21 días	---	0.56 ± 0.19 ^c

Los datos son la Media ± DE de 3 réplicas. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 %.

En el período de 21 días se obtuvo la frecuencia de inducción más alta (88.89 ± 7.50 %) con co-cultivos de 24 h, sin embargo, el análisis estadístico arrojó que no existe diferencia significativa entre este resultado y aquéllos logrados con co-cultivos de 48 h luego de 7 y 14 días. En la Figura 9 se observa que la mayoría de las frecuencias de inducción se encontraron arriba del 50 %, a excepción del 33.33 ± 1.00 % de inducción logrado con co-cultivos de 24 h después de 7 días. Las frecuencias de inducción reflejan el porcentaje de explantes transformados del total de explantes co-cultivados.

Los mejores efectos en términos de número de raíces inducidas también se lograron con co-cultivos de 24 h después de 21 días de inducción, teniendo en promedio 2.44 ± 0.35 raíces por explante. En la Figura 10 se muestra que la tendencia de respuesta para co-cultivos de 24 h fue aumentando conforme al tiempo de inducción, mientras que para co-cultivos de 48 h se observó

un aumento gradual hasta los 14 días alcanzando el máximo de 1.56 ± 0.25 raíces por explante, después de este tiempo los efectos disminuyeron. De acuerdo al análisis estadístico, no hubo diferencias significativas en el número de raíces logrado durante los distintos períodos de inducción con co-cultivos de 48 h y, éstos además fueron iguales a aquéllos conseguidos con co-cultivos de 24 h después de 14 días. El número mínimo de raíces inducidas (0.56 ± 0.10) obtenido con co-cultivos de 24 h después de 7 días fue estadísticamente igual tanto a aquéllos alcanzados con los controles de 24 h y 48 h como a los obtenidos con co-cultivos de 48 h después de 7 y 21 días (Tabla 7, Figura 10).

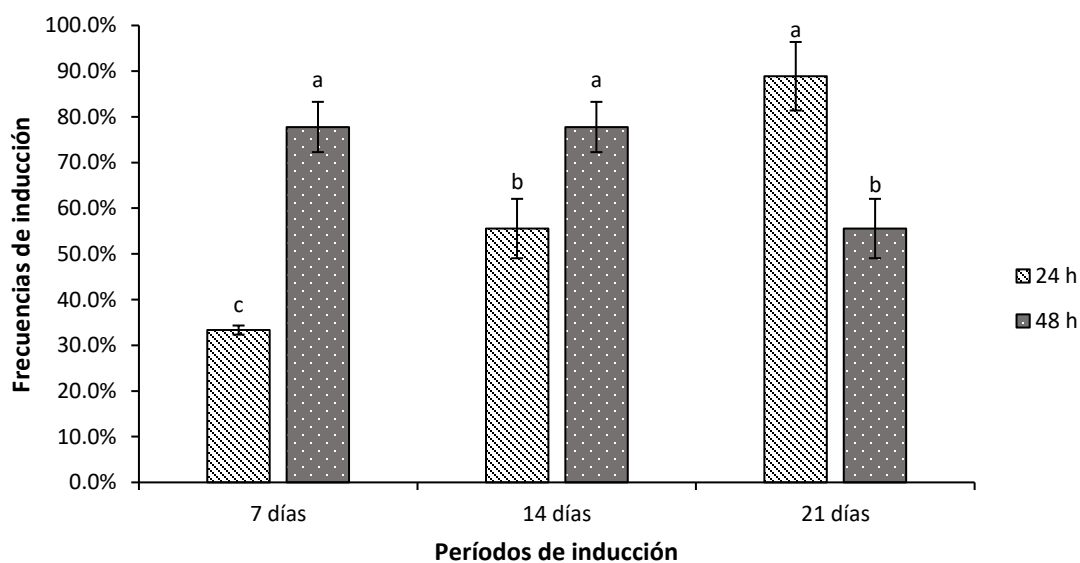


Figura 9. Frecuencias de inducción de raíces. Las barras son la DE de la media de 3 réplicas. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 %.

En estudios previos se ha encontrado que varios factores pueden afectar la transformación genética mediada por *Agrobacterium*, entre ellos destacan la cepa de *A. rhizogenes*, el tipo de explante, el método de infección y el tiempo de co-cultivo (Michalec-Warzecha *et al.*, 2016; Bathoju *et al.*, 2017). La virulencia de la cepa, es decir, la capacidad infecciosa de la bacteria, varía de acuerdo a cada especie vegetal reflejándose en la eficiencia de inducción lograda (Calderón-Gabriel *et al.*, 2016; Thwe *et al.*, 2016).

La susceptibilidad de *Stevia* se ha probado frente a diversas cepas de *A. rhizogenes*, tales como LBA9402, A4, ATCC15834, MTCC532, K599, AR4, R1000 y C58C1, con las que se ha logrado la transformación exitosa en todos los casos, con resultados variables influenciados sobre todo por

el tipo de explante y el tiempo de co-cultivo (Michalec-Warzecha *et al.*, 2016). Para *Stevia*, se han demostrado mejores eficiencias usando explantes de hojas y puntas de brotes (Pandey *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2017), lo cual funcionó exitosamente en este estudio al usar brotes apicales. El aumento en el tiempo de co-cultivo tiende a incrementar gradualmente tanto la eficiencia de transformación como el número de raíces, sin embargo, al igual que el período de inducción, el tiempo óptimo es dependiente de cada cepa (Singh *et al.*, 2014b; Singh *et al.*, 2017).

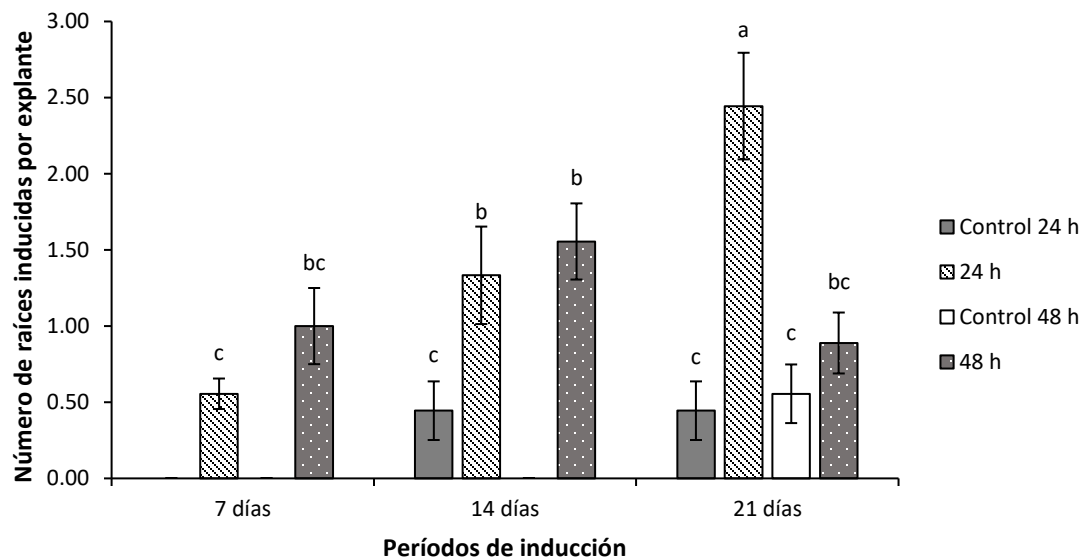


Figura 10. Número de raíces inducidas por explante. Las barras son la DE de la media de 3 réplicas. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 %.

Basados en el protocolo de Singh *et al.*, (2017), quienes reportaron una frecuencia de inducción máxima de 91.6 %, los resultados encontrados en el presente estudio vieron mejoradas las eficiencias de transformación al aplicar tiempos de co-cultivo prolongados logrando frecuencias de hasta el 88.89 ± 7.50 % de inducción, en comparación a otros trabajos de transformación de *Stevia* donde al implementar tiempos de co-cultivo cortos, las eficiencias fueron menores, teniendo un 48.7 % reportado por Liaei *et al.*, (2016) y tan solo un 3 % por parte de Michalec-Warzecha *et al.*, (2016), ambos con la cepa ATCC15834 en co-cultivos de 10 min. También se determinó que el período de inducción que se le da a los explantes después de la infección, ejerce un efecto significativo sobre los resultados originados, pues se registró un aumento en las respuestas conforme este período avanzaba, lo cual corresponde con lo detallado anteriormente por Singh *et al.*, (2014b).

Aunque las frecuencias de inducción aumentaron al usar los tiempos de co-cultivo reportados como óptimos para la cepa ATCC15834, el número de raíces fue mucho menor comparado con los resultados registrados por Singh *et al.*, (2017), quienes informaron máximos de 19.16 y 20.66 raíces por explante con co-cultivos de 24 h y 48 h, respectivamente, en un período de inducción de 24 días, mientras que los máximos de raíces por explante obtenidos en este trabajo fueron 2.44 ± 0.35 con co-cultivos de 24 h luego de 24 días y 1.56 ± 0.25 con co-cultivos de 48 h después de 14 días. Las variaciones encontradas podrían deberse a la concentración de inóculo inicial, ya que en este estudio se empleó una suspensión bacteriana en fase temprana de crecimiento (D.O. A_{600nm} 0.3) a diferencia del realizado por dichos autores, quienes utilizaron un cultivo por encima de la fase media de crecimiento (D.O. A_{600nm} 0.6). Al tener un cultivo más concentrado, aumenta la disponibilidad de un mayor número de células metabólicamente más activas, favoreciendo la infección por parte de *Agrobacterium* y reflejándose en un mayor número de raíces pilosas. Este efecto también fue evaluado previamente por Michalec-Warzecha *et al.*, (2016), quienes no obtuvieron resultados positivos con suspensiones bacterianas muy diluidas (D.O. A_{600nm} 0.1). Otras condiciones como la aplicación de sonicación a los explantes y la adición de acetosiringona al cultivo de *Agrobacterium* se han implementado para mejorar el número de raíces y las frecuencias de inducción (Grzegorzczuk-Karolak *et al.*, 2018).

El proceso de emergencia y desarrollo de las raíces se ilustra en la Figura 11, donde se exhibe que las raíces fueron aumentando tanto en número como en tamaño rápidamente en comparación con los controles. Todas las raíces inducidas fueron de color marrón blanquecino y emergieron de las partes que estaban en contacto o inmersas en el medio, en su mayoría de la parte inferior de los tallos, éstas características coinciden con lo observado previamente por Ray *et al.*, (2014). Sólo en los controles algunas raíces aparecieron en la parte aérea.

Se ha reportado que cuando se emplean tiempos de co-cultivo tan prolongados como los usados en esta investigación, los explantes se deterioran y se tornan café a causa del crecimiento excesivo de la bacteria (Bathoju *et al.*, 2017), sin embargo, no se observó deterioro de los explantes en ningún momento, éstos incluso llegaron a regenerarse y aumentar su tamaño en todos los casos de prueba y controles. Pandey *et al.*, (2014) y Sánchez-Córdova *et al.*, (2019), también registraron la regeneración de explantes durante el proceso de inducción.

Ligado a la aparición de raíces hubo, formación de pequeños callos tumorigénicos en los explantes infectados y, en menor número emergieron raíces de hojas e internodos sin callos, esta respuesta secundaria ya ha sido registrada en diversos experimentos de agrotransformación (Martins *et al.*, 2003; Valimehr *et al.*, 2014; Maistrenko *et al.*, 2015) y se ha atribuido a la transferencia de los genes incluidos en el ADN-T responsables de la biosíntesis de auxinas (Georgiev *et al.*, 2007).

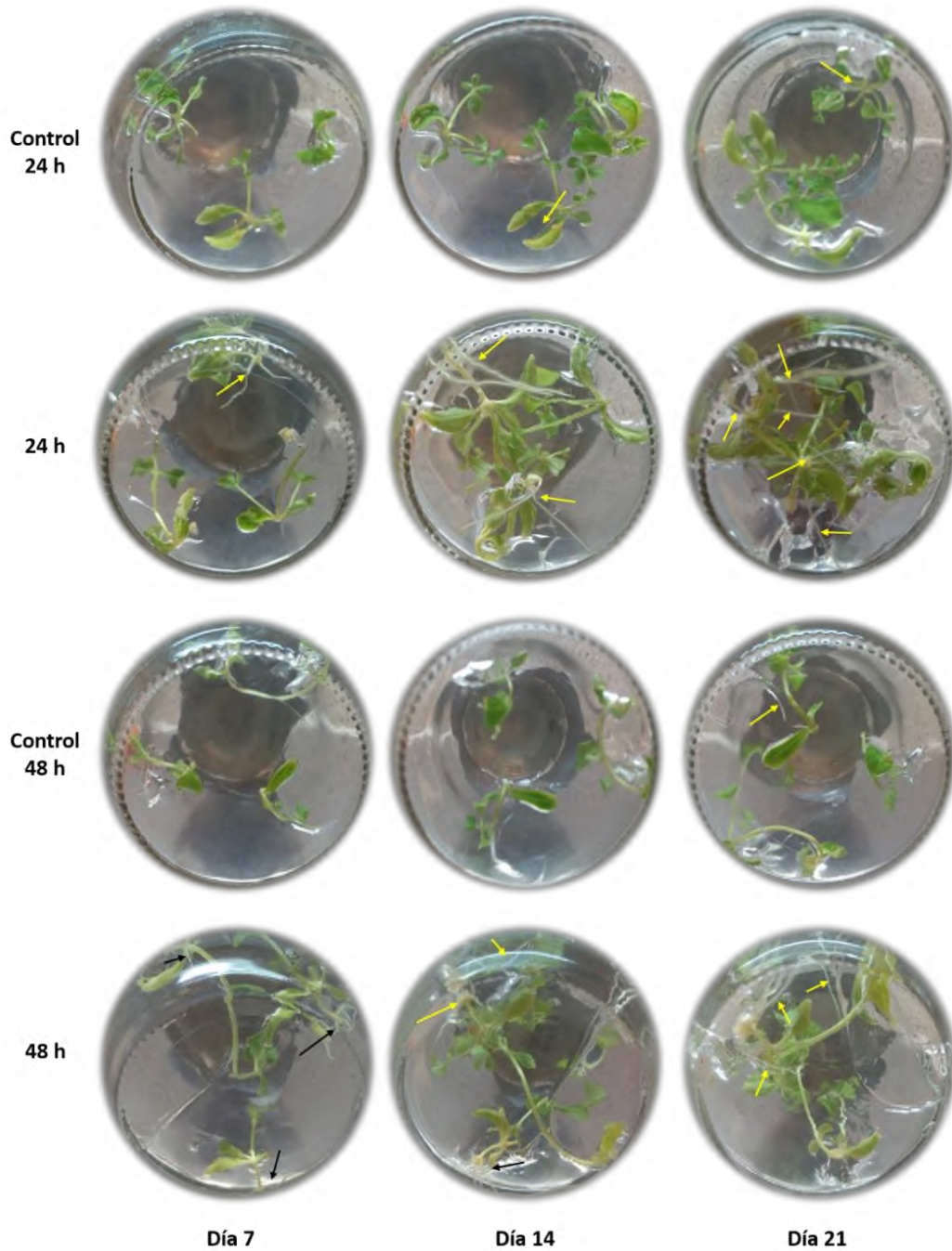


Figura 11. Inducción de raíces en explantes co-cultivados por 24 y 48 h en suspensión bacteriana, después de 7, 14 y 21 días. Las raíces pilosas están señaladas por flechas amarillas y negras.

8.3.2. Selección fenotípica de raíces inducidas

Las raíces de ≥ 1 cm de longitud se escindieron de los explantes y se separaron para su crecimiento individual en medio MS libre de fitohormonas. A los 10 días de separación, se midió su longitud y se observó el desarrollo de características fenotípicas como ageotropismo, múltiples ramificaciones y pilosidades. De un total de 49 raíces, sólo 16 presentaron dichas características, además de tener el mayor tamaño en los primeros 10 días de cultivo. Posterior a este tiempo, para corroborar las observaciones se dejó un período de crecimiento de 30 días, en los cuales el resto de raíces no presentaron ramificaciones ni ageotropismo, sólo un ligero aumento de longitud (Figura 13). Aproximadamente el 16 % del total de raíces, aquéllas que se separaron de un tamaño menor a 1 cm, fueron incapaces de sobrevivir en cultivo individual. Sin embargo, se observó que al mantener las raíces emergidas unidas al explante de origen mejoraba sustancialmente su supervivencia, tal como lo reportaron previamente López *et al.*, (2014).

La mayoría de las raíces aisladas se obtuvieron después de 21 días para co-cultivos de 24 h (38.8 %), seguido por el 22.5 % correspondiente a las raíces separadas después de 14 días para co-cultivos de 48 h. Las 16 raíces seleccionadas se escogieron a partir de estos dos grupos, representando el 27.6 % del total de raíces inducidas con co-cultivos de 24 h y 40.0 % del total de raíces inducidas con co-cultivos de 48 h.

Al finalizar los 30 días de cultivo, se midieron nuevamente las raíces y se calcularon los índices de crecimiento. Los resultados del crecimiento individual en medio MS semisólido de las 16 raíces pilosas seleccionadas, incluyendo su tamaño a los 10 días de separación (t_0) y a los 30 días después de esto (t_f), así como los índices de crecimiento (I. C.) para cada tiempo de co-cultivo se presentan en la Tabla 8 y Figura 12. El tamaño de las raíces seleccionadas inicialmente, es decir, 10 días después de ser separadas, fue mayor con co-cultivos de 48 h midiendo en promedio 5.84 ± 0.95 cm, en cambio, 30 días después las raíces más grandes fueron aquéllas provenientes de co-cultivos de 24 h y midieron en promedio 9.93 ± 1.56 cm. A pesar de ello, el análisis estadístico reflejó que las diferencias entre los valores logrados con ambos tiempos de co-cultivo no fueron significativas tanto al inicio ($t_0=10$ días) como al final del cultivo ($t_f=30$ días).

Tabla 8. Parámetros de crecimiento individual en medio semisólido de las raíces pilosas seleccionadas.

Tiempo de co-cultivo	Tamaño de raíces en $t_0=10$ días (cm)	Tamaño de raíces en $t_f=30$ días (cm)	Índices de crecimiento de raíces $(L_f - L_i)/L_i$
24 h	4.55 ± 0.98^a	9.93 ± 1.56^a	1.25 ± 0.12^a
48 h	5.84 ± 0.95^a	9.21 ± 1.42^a	0.60 ± 0.10^b

Los datos son la Media \pm DE de 3 réplicas. Letras iguales en cada columna indican que no existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 %. (L_f = longitud final, L_i = longitud inicial).

Las raíces inducidas a partir de co-cultivos de 24 h presentaron el índice de crecimiento más alto, con un aumento de 1.25 ± 0.12 veces en tamaño, siendo estadísticamente superiores. En la Figura 12 se muestra la tendencia de los parámetros de crecimiento para ambos grupos de raíces. Aunque los tamaños fueron muy similares, las diferencias en su incremento se atribuyen a la variedad dentro de cada grupo, es decir, cada raíz es un evento independiente de transformación y ésta se comporta de acuerdo a diversos factores ligados sobre todo a su variabilidad genética, sin embargo, en términos generales el crecimiento fue mayor para las raíces de co-cultivos de 24 h.

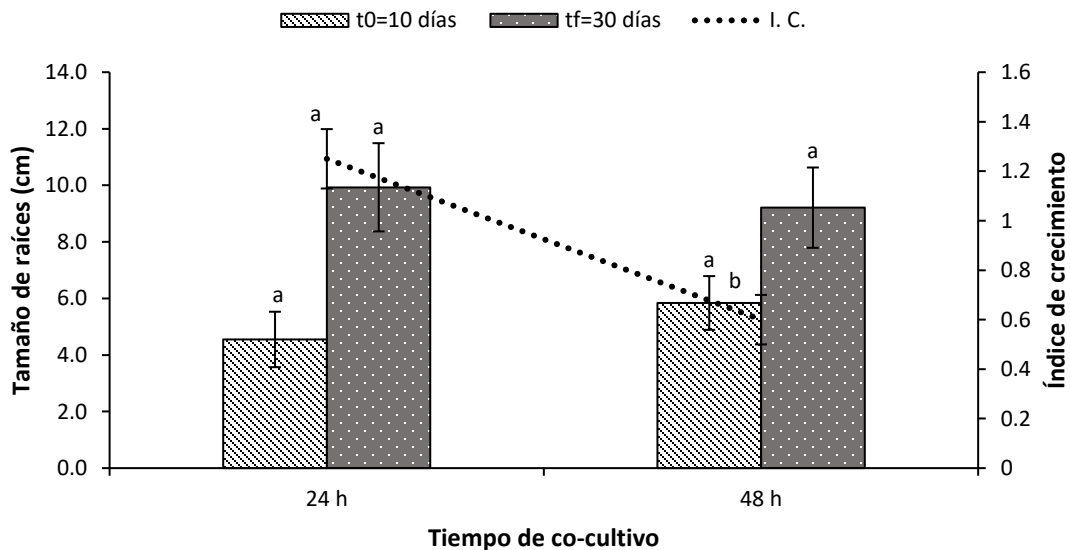


Figura 12. Parámetros de crecimiento individual en medio semisólido de las raíces pilosas seleccionadas. Las barras son la DE de la media de 3 réplicas. Letras iguales entre cada grupo de datos, indican que no existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 %. (t_0 : tiempo cero, t_f : tiempo final, I. C.: Índice de crecimiento).

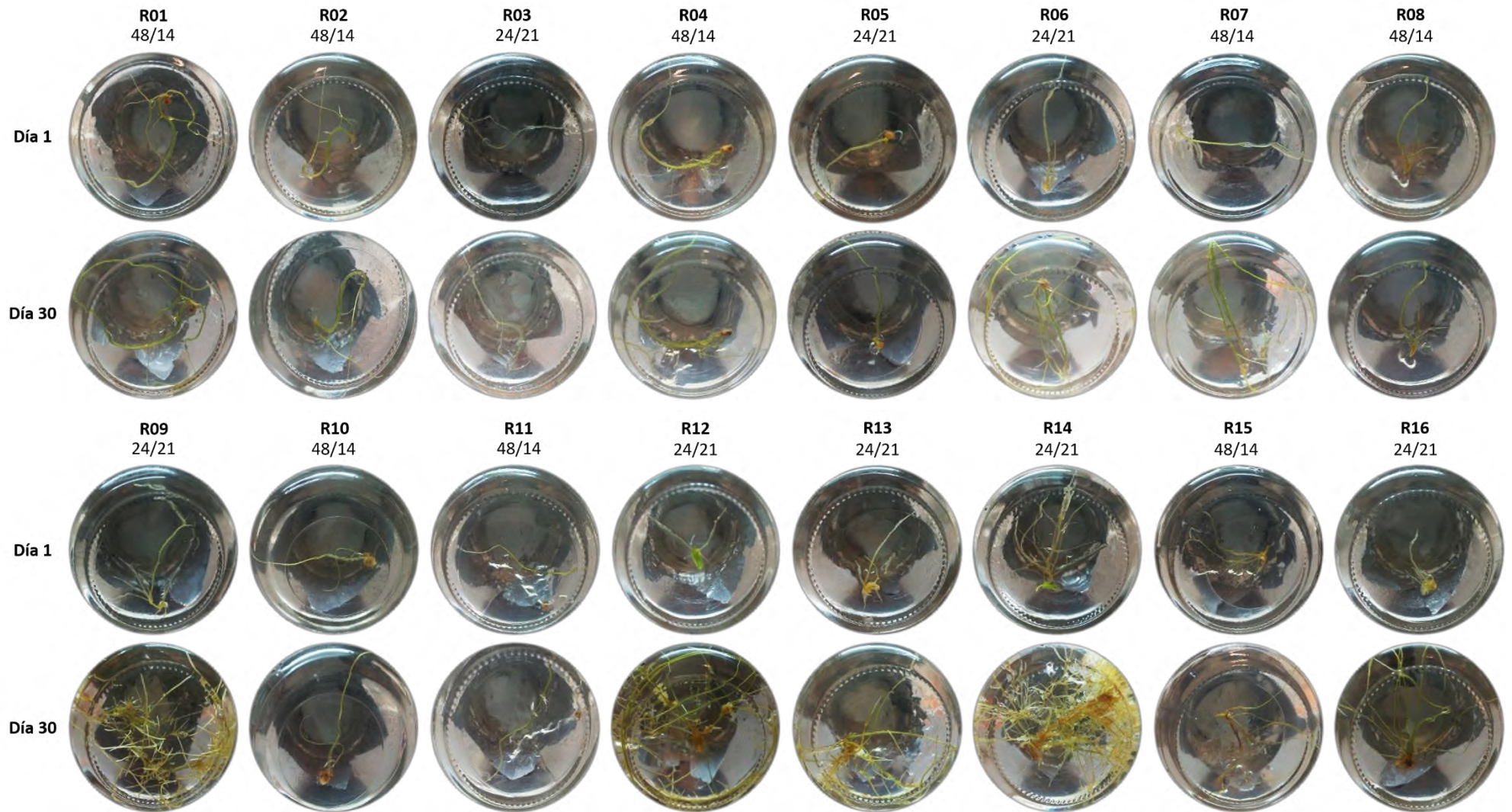


Figura 13. Raíces inducidas seleccionadas por características fenotípicas de raíces pilosas en cultivo individual en medio semisólido a los 10 días (Día 1) y 30 días. 24 y 48 se refieren a los tiempos de co-cultivo (h), 14 y 21 se refieren a los períodos de inducción (días).

En la Figura 13 se presentan las 16 raíces seleccionadas a los 10 días de su separación (Día 1) y 30 días después, éstas se enumeraron de manera descendente de acuerdo a su tamaño inicial. Concerniente a la apariencia de las raíces, éstas originalmente eran de color marrón blanquecino y cambiaron a color verde o amarillo durante el proceso. El número de ramificaciones varió para cada una y, como se mencionó previamente, se observó un mejor desarrollo en aquéllas que contaban con parte del explante de origen. También se registró ageotropismo en algunas de ellas desde los primeros días de cultivo (no mostrado). Las observaciones respecto a la coloración de las raíces coinciden con reportes hechos por Pandey *et al.*, (2016), que indican que los cultivos incubados bajo condiciones de fotoperíodo a veces tienden a tornarse de color verde, a diferencia de las raíces crecidas en oscuridad, las cuales mantienen la coloración café amarillenta. Esta cualidad es importante porque sugiere la presencia de clorofila en los tejidos verdes, lo que señala el potencial de las raíces para producir metabolitos exclusivos de partes aéreas de la planta (Sharma *et al.*, 2013), en el caso de *Stevia*, las raíces podrían ser capaces de producir esteviósidos, metabolitos secundarios de gran importancia por su uso como edulcorantes naturales no calóricos (Kolb *et al.*, 2001; Chatsudthipong y Muanprasat, 2009).

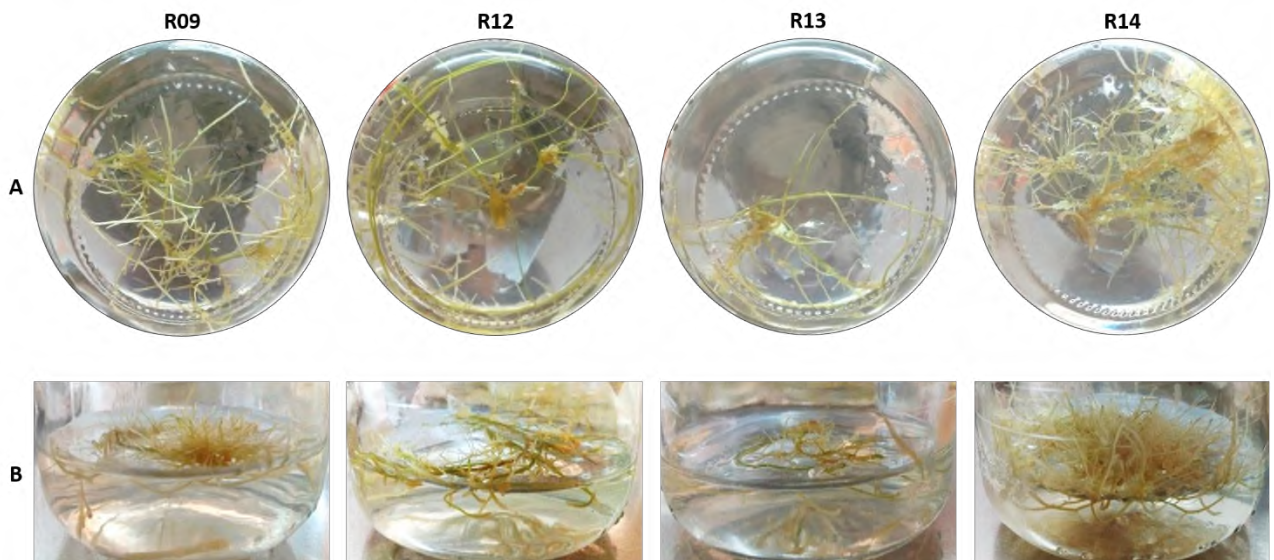


Figura 14. Raíces pilosas seleccionadas fenotípicamente para confirmar la transformación por PCR. A) Desarrollo de múltiples ramificaciones, B) Ageotropismo.

Al culminar el período de cultivo, sólo cuatro rizoclonas prosperaron constantemente en medio semisólido, definiendo y acentuando el fenotipo característico de raíces pilosas mostrando abundantes ramificaciones (Figura 14A), ageotropismo (Figura 14B) y crecimiento acelerado en ausencia de reguladores de crecimiento. En estudios de transformación es común que no todas las raíces logren una supervivencia prolongada o un desarrollo marcado (Himmelboe *et al.*, 2013), incluso cuando son tratadas con fitohormonas como auxinas (Pandey *et al.*, 2016). Esta variabilidad genética y morfológica dentro de las rizoclonas se ha atribuido al efecto complejo de la interacción entre el plásmido Ri con el genoma de la planta huésped en paralelo con la diversidad en el número de copias y los sitios de integración del ADN-T (Sheludko y Gerasymenko, 2013). Las 4 rizoclonas seleccionadas fueron R09, R12, R13 y R14, todas provenientes de cocultivos de 24 h, de las cuales dos se tornaron de color verde (R09 y R12) y las otras dos mostraron una coloración café amarillenta (R13 y R14) como se exhibe en la Figura 14. El resto de raíces no acumuló biomasa suficiente por lo que no fue posible realizar la posterior confirmación por PCR.

8.3.3. Confirmación de la transformación de los cultivos de raíces por PCR

Las raíces previamente seleccionadas por fenotipo se mantuvieron en crecimiento por 15 días más a fin de obtener biomasa suficiente para la extracción de ADN genómico (ADNg). En este período de tiempo, se obtuvieron diferentes subcultivos en medio MS semisólido libre de fitohormonas para cada línea de raíces, teniendo en promedio 3 subcultivos por línea. De éstos se escogió aquél con la mayor biomasa para extraer el ADNg (Figura 15A). Los extractos de ADNg de las raíces presuntamente transformadas y raíces control, se sometieron a corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1 % y después se visualizaron mediante un fotodocumentador utilizando bromuro de etidio. En la Figura 15B se confirma la integridad de los 4 extractos de interés (R09, R12, R13 y R14), el extracto del control positivo de transformación (RCtrlT, línea transformada por *A. rhizogenes* K599 previamente establecida) y del control negativo silvestre (RCtrlS, raíces de *S. rebaudiana in vitro* no transformadas). En todos los carriles se observa una sola banda de alto peso molecular (>10 kb) íntegra, característica de ADN genómico sin degradación. Además, se percibe notable diferencia entre la banda correspondiente al control silvestre y las demás bandas, esto podría deberse a la diferencia de concentración y al tiempo de corrimiento del gel.

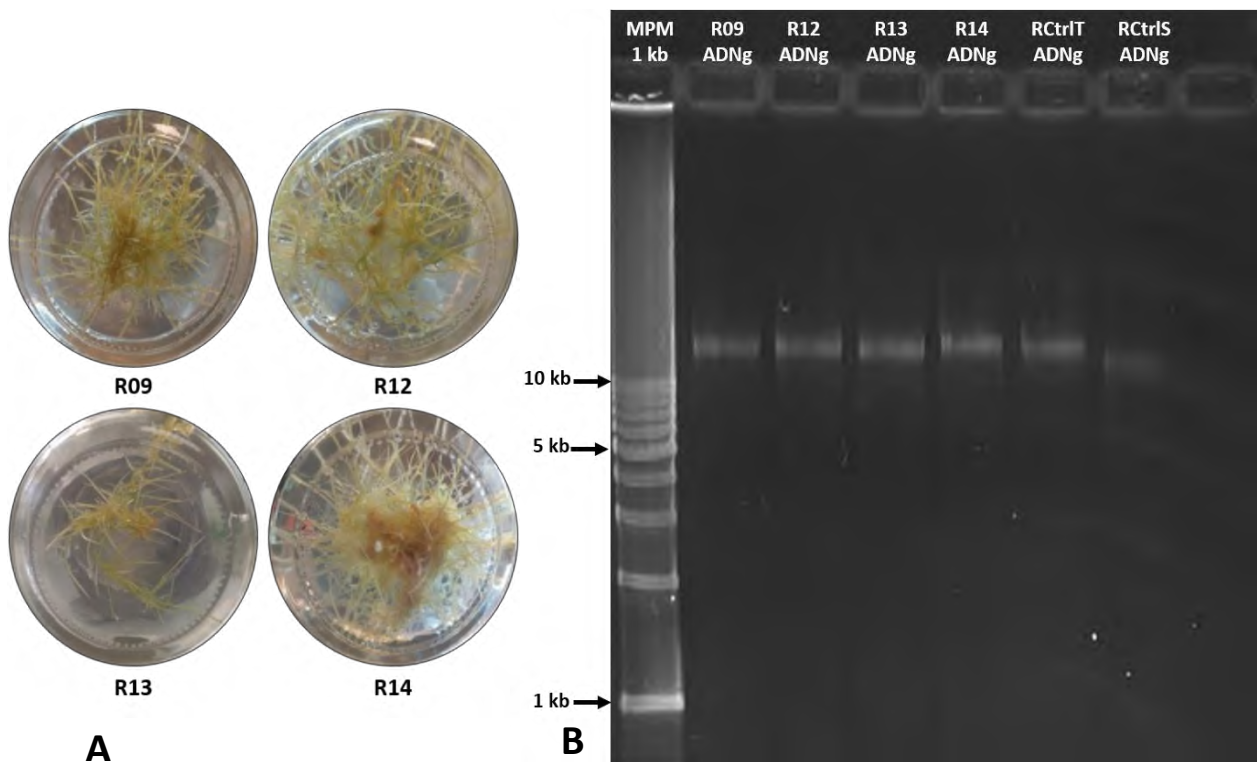


Figura 15. A) Raíces pilosas usadas para extracción de ADN genómico. B) Extractos de ADN genómico de raíces pilosas seleccionadas y raíces control de *S. rebaudiana* (RCtrlT: raíz control transformada, RCtrlS: raíz control silvestre). Gel de agarosa al 1 %, corrimiento en TAE 1X a 100 V por 50 min.

Luego de verificar la integridad de los extractos de ADNg, estas muestras se utilizaron para realizar la prueba de PCR a fin de amplificar el gen *rolB* y de esta manera confirmar la transformación genética de los cultivos de raíces. Este gen se encuentra en el ADN-T del plásmido silvestre Ri de las cepas de *A. rhizogenes*, el cual es transferido al genoma de la planta durante el proceso de agrotransformación (Pavlova *et al.*, 2014), dicho gen es responsable de la proliferación acelerada del tejido piloso (Lütken *et al.*, 2017). Los oligonucleótidos empleados fueron previamente diseñados por el grupo de trabajo y descritos anteriormente en la sección de materiales y métodos. Éstos amplifican un fragmento de 150 pb.

La amplificación por PCR del ADNg de las cuatro líneas previamente elegidas por su fenotipo (R09, R12, R13 y R14), mostró la banda esperada para el gen *rolB* definida en 150 pb con señal intensa (Figura 16). Además, se muestra que los controles positivos, tanto de PCR (Ctrl+, extracto de plásmido de *A. rhizogenes* ATCC15834) como de agrotransformación (RCtrlT, extracto de ADNg de raíces transformadas por *A. rhizogenes* K599) también presentan dicha banda de 150 pb, en menor intensidad de señal. Esto último puede deberse a la concentración de los extractos, puesto que los controles se tomaron de diluciones menores a los extractos de prueba. Asimismo, los

controles negativos (Ctrl- de PCR y RCtrlS de transformación) no mostraron ninguna amplificación. Estos resultados son indicativos de la presencia del gen *rol B* y, por lo tanto, del ADN-T en el genoma de las raíces pilosas de *Stevia rebaudiana*, confirmando así la transformación de las cuatro líneas.

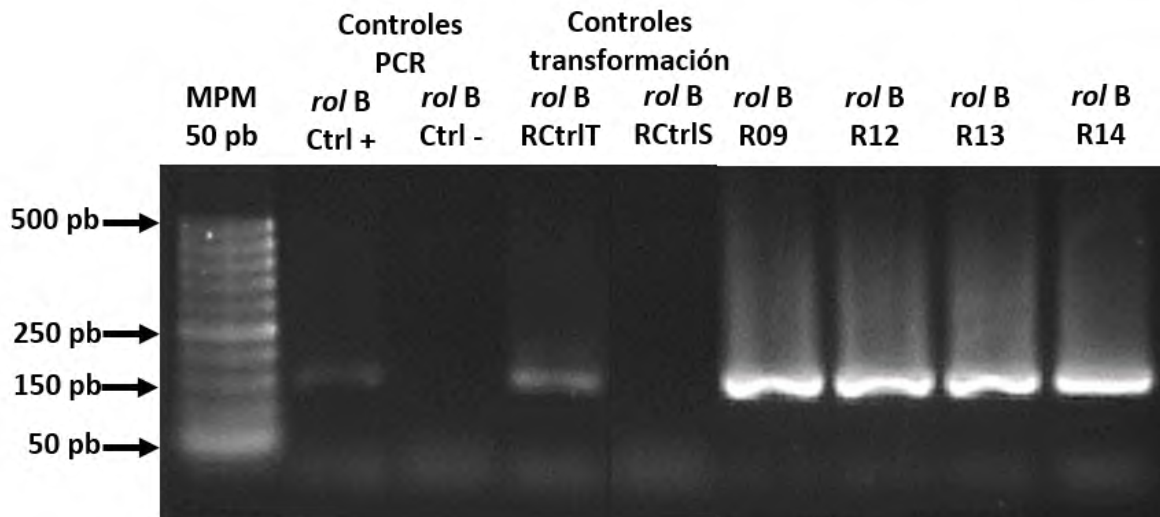


Figura 16. Amplificación del fragmento del gen *rol B* de *A. rhizogenes* en raíces transformadas de *S. rebaudiana*. (Ctrl+: control positivo de PCR, Ctrl-: control negativo de PCR, RCtrlT: raíz control transformada, RCtrlS: raíz control silvestre). Gel de agarosa al 2 %, corrimiento en TAE 1X a 80 V por 50 min.

La frecuencia de transformación refleja el porcentaje de raíces transformadas positivamente del total de raíces inducidas. Fenotípicamente, el 32.7 % de raíces mostraron características propias en los primeros días de cultivo, sin embargo, las 4 raíces confirmadas por PCR representan tan sólo el 8.2 % del total de raíces inducidas (Figura 17), siendo ésta la frecuencia de transformación obtenida. No obstante, haciendo la distinción entre los dos tiempos de co-cultivo aplicados, las frecuencias de transformación conseguidas fueron de 13.8 % con co-cultivos de 24 h y 0 % con co-cultivos de 48 h (Figura 18). Las modificaciones en el protocolo de agrotransformación mejoraron significativamente las frecuencias de transformación con respecto a las obtenidas previamente dentro del grupo de trabajo, ya que como antecedente directo Calderón-Gabriel *et al.*, (2016), reportaron frecuencias de transformación solamente en un rango de 0.5 % – 1 % con las cepas K599, AR4 y LBA9402.

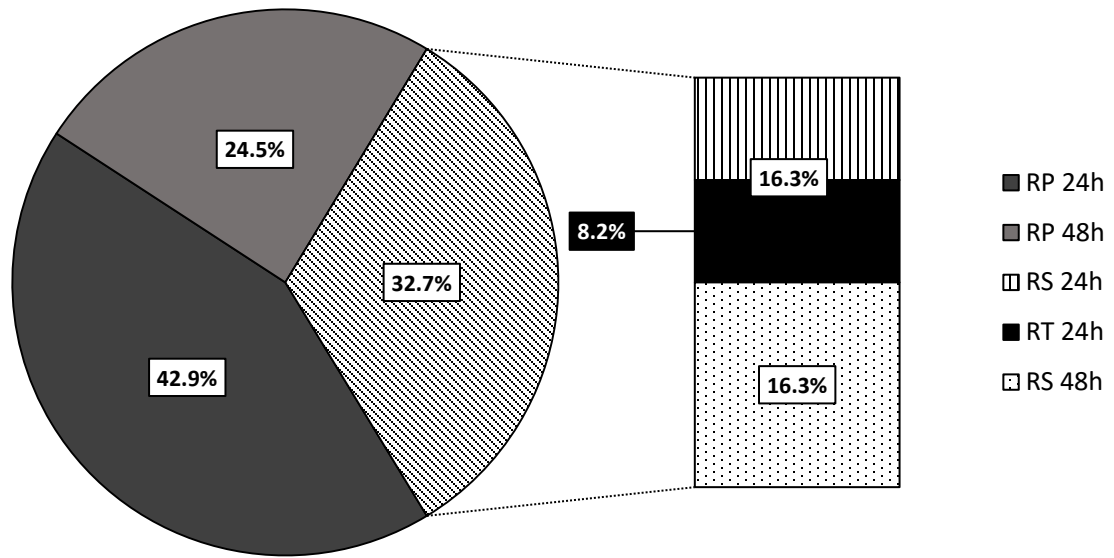


Figura 17. Frecuencias de transformación respecto al total de raíces inducidas. RP: raíces pilosas no seleccionadas, RS: raíces seleccionadas, RT: raíces transformadas, 24 h y 48 h se refieren a los tiempos de co-cultivo.

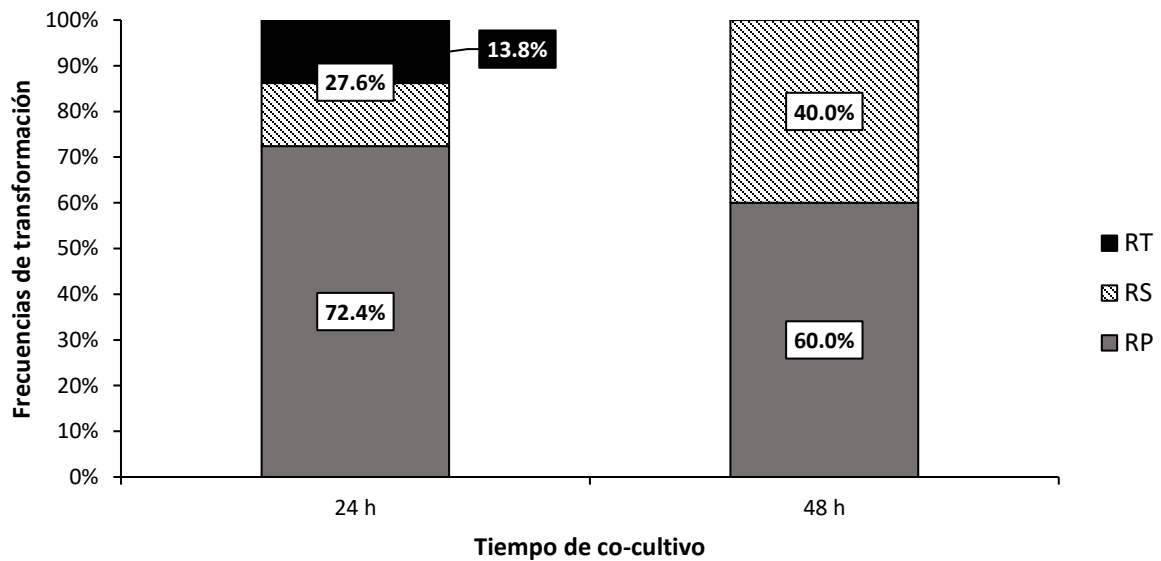


Figura 18. Frecuencias de transformación por tiempo de co-cultivo. RT: raíces transformadas, RS: raíces seleccionadas, RP: raíces pilosas no seleccionadas.

Además, las frecuencias de transformación logradas respecto a las líneas de raíces confirmadas por PCR, fueron relativamente bajas en comparación a otros trabajos, por ejemplo, Dehdashti *et al.*, (2017) reportaron el 87.7 % de transformación confirmada por amplificación de genes *rol* B usando explantes de puntas de brote de *Withania somnifera* infectados con la cepa ATCC15834. Por otro lado, El-Esawi *et al.*, (2017) si bien alcanzaron el 74 % de inducción con la cepa

ATCC15834 al infectar explantes de *Lactuca serriola* L., sólo pudieron establecer 5 líneas confirmadas por PCR. Esta situación también fue reportada por Pandey *et al.*, (2016) quienes pese a obtener el 86 % de inducción con la cepa A4 en explantes de *Stevia*, sólo lograron seleccionar 10 rizoclonas de las cuales finalmente pudieron establecer únicamente 4 líneas transformadas. La supervivencia de las raíces pilosas después de la inducción es una limitante en el establecimiento de cultivos de raíces transformadas, pues a pesar de obtener altas frecuencias de inducción, los resultados se ven reducidos en cuanto a eficiencias de transformación confirmadas genética o molecularmente (Fu *et al.*, 2014).

8.3.4. Establecimiento de cultivos de raíces transformadas en medio líquido

Luego de ser confirmada la transformación de las 4 líneas de raíces, éstas se cambiaron de medio MS semisólido a medio MS líquido sin reguladores de crecimiento y adicionado con antibiótico. Posteriormente, mediante una cinética de crecimiento se evaluó el aumento de peso fresco de las raíces durante 7, 14 y 21 días, cuyos valores se muestran en la Tabla 9. El cultivo de raíces no transformadas de *Stevia rebaudiana* se estableció en medio MS adicionado con IBA (0.5 mg/L) para ser usado como control.

Tabla 9. Peso fresco de raíces en medio líquido MS (g).

Tiempo de cultivo	Control	RT09	RT12	RT13	RT14
Día 1	1.00 ± 0.01 ^h	0.90 ± 0.01 ^h	1.10 ± 0.01 ^{gh}	1.00 ± 0.01 ^h	1.10 ± 0.01 ^{gh}
Día 7	1.24 ± 0.08 ^{fgh}	1.55 ± 0.06 ^{fgh}	1.84 ± 0.17 ^f	1.77 ± 0.23 ^{fg}	1.46 ± 0.10 ^{fgh}
Día 14	1.79 ± 0.32 ^f	3.02 ± 0.04 ^{de}	4.89 ± 0.30 ^c	3.57 ± 0.27 ^d	2.97 ± 0.09 ^{de}
Día 21	2.57 ± 0.18 ^e	5.31 ± 0.39 ^{bc}	7.52 ± 0.49 ^a	5.78 ± 0.33 ^b	4.70 ± 0.27 ^c

Los datos son la Media ± DE de 3 réplicas. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 %.

En la Figura 19 se observa que no hubo gran diferencia en el crecimiento después de 7 días de cultivo sino hasta los 14 días, pues en este punto se observa un despegue en el crecimiento de las líneas transformadas respecto al cultivo control. En general, el cultivo que tuvo una mayor acumulación de biomasa en medio líquido fue la línea RT12, alcanzando el peso máximo de 7.52 ± 0.49 g a los 21 días. Por el contrario, de las líneas transformadas, el cultivo RT14 fue el que tuvo el menor crecimiento en medio líquido, alcanzando solamente un máximo de 4.70 ± 0.27 g de biomasa a los 21 días. Particularmente, ésta línea presentó un comportamiento en medio líquido

contrario a su previo crecimiento en medio semisólido, puesto que bajo esas condiciones tuvo el crecimiento mayor comparado al resto de raíces. Las líneas RT09 y RT13 tuvieron un crecimiento estadísticamente similar tanto a los 14 como a los 21 días. A su vez, el crecimiento de la línea RT09 fue significativamente igual al de la línea RT14 al finalizar la cinética. En el período evaluado ningún cultivo llegó a su fase estacionaria.

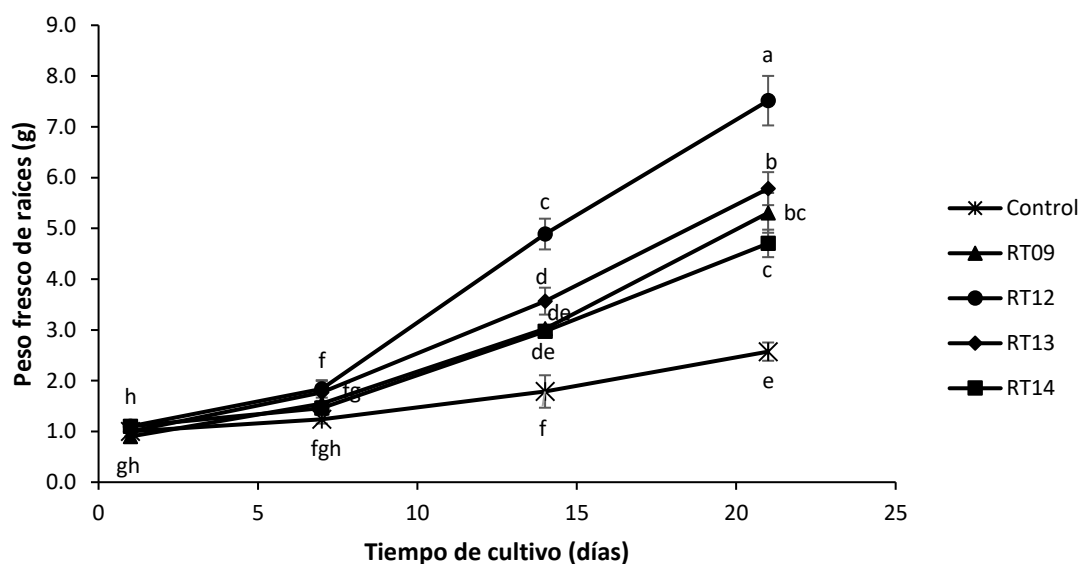


Figura 19. Cinética de crecimiento de raíces transformadas en medio MS líquido. Las barras son la DE de la media de 3 réplicas. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 %.

A partir de los datos de peso fresco acumulado a los 21 días de cultivo se determinaron los índices de crecimiento para cada línea de raíces (Tabla 10). En correlación a los valores de biomasa acumulada al finalizar la cinética, los índices de crecimiento tuvieron el mismo comportamiento, se encontró que la línea RT12 tuvo el mayor índice de crecimiento de biomasa, con un incremento de 5.83 ± 0.44 veces el peso fresco, seguida por las líneas RT09 y RT13. Mientras que, la línea RT14 mostró el menor índice de crecimiento respecto a los cultivos transformados, aumentando solamente 1.57 ± 0.18 veces el peso fresco, sin embargo, fue incluso estadísticamente mayor al índice correspondiente al cultivo control. En general, las cuatro líneas establecidas mostraron buenos índices de crecimiento, en comparación con estudios como el realizado por Michalec-Warzecha *et al.*, (2016), quienes obtuvieron solamente un peso fresco de 1.79 g de biomasa de una línea de raíz transformada de *Stevia* luego de 30 días de cultivo en medio líquido, lo que implicó un índice de crecimiento de apenas 2.25. Asimismo, los resultados aquí hallados son

comparables con los informados por Bathoju *et al.*, (2017), quienes determinaron índices de crecimiento de 4.26 para dos líneas de raíces transformadas de *Chlorophytum borivillianum* en un período de 20 días, alcanzando el aumento de biomasa máximo a los 25 días de cultivo. Por otro lado, Pandey *et al.*, (2016) encontraron el crecimiento máximo de líneas de raíces transformadas de *Stevia* a los 60 días de cultivo.

Tabla 10. Índices de crecimiento de raíces después de 21 días de cultivo en medio MS líquido.

Cultivos de raíces	Índices de crecimiento de biomasa ($P_f - P_i$)/ P_i
Control	1.57 ± 0.18 ^d
RT09	4.89 ± 0.44 ^b
RT12	5.83 ± 0.44 ^a
RT13	4.78 ± 0.32 ^b
RT14	3.28 ± 0.25 ^c

Los datos son la Media ± DE de 3 réplicas. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 %. (Pf= peso final, Pi= peso inicial).

En la Figura 20 se muestra el proceso de desarrollo de cada línea durante los 7, 14 y 21 días de cultivo en medio líquido, y en la Figura 21 se observa la apariencia de la biomasa obtenida al finalizar la cinética. Durante el proceso las líneas RT09 y RT12 mantuvieron su coloración verde, mientras que la línea RT13 cambió de verde a amarillo marrón después de los 14 días. La línea RT14 permaneció de color amarillo marrón durante todo el período de cultivo, además desarrolló pilosidades cubiertas de callos tumorigénicos de color blanquecino en los meristemas radiculares. La formación de callos más grandes y de color café se registró en los cultivos control. Debido a que los callos tumorigénicos no son adecuados para cultivos a gran escala, es óptima una baja producción de estos (Liaei *et al.*, 2016). En la Figura 21 se puede apreciar el comportamiento ageotrópico de algunas raíces de las líneas transformadas, a diferencia de las raíces control que se dispusieron de manera plana y superenrollada.

Estudios previos han demostrado que mantener el cultivo de raíces en condiciones de oscuridad resulta en una proliferación mayor de la biomasa (Michalec-Warzecha *et al.*, 2016; Pandey *et al.*, 2016), mientras que, cuando se lleva a cabo en condiciones de luz o fotoperíodo, si bien el aumento de biomasa llega a ser menor, las raíces pueden desarrollar coloración verde (Sharma *et al.*, 2013; Liaei *et al.*, 2016), lo que está ligado a la presencia de pigmentos fotosintéticos y a su vez, es sugerente de la posible producción de glucósidos de esteviol debido a que la síntesis de éstos se realiza en gran parte en los cloroplastos (Brandle y Telmer, 2007). No obstante, Pandey

et al., (2016) informaron que la presencia de pigmentos fotosintéticos no es el factor determinante de la síntesis de glucósidos de esteviol; ésta más bien depende del grado de desarrollo y actividad funcional de los cloroplastos. Además, dichos autores encontraron que los cultivos que produjeron esteviósidos bloquearon la producción de otros metabolitos (rebaudiósido A y C, ácido clorogénico) comúnmente encontrados en las hojas de *Stevia*.

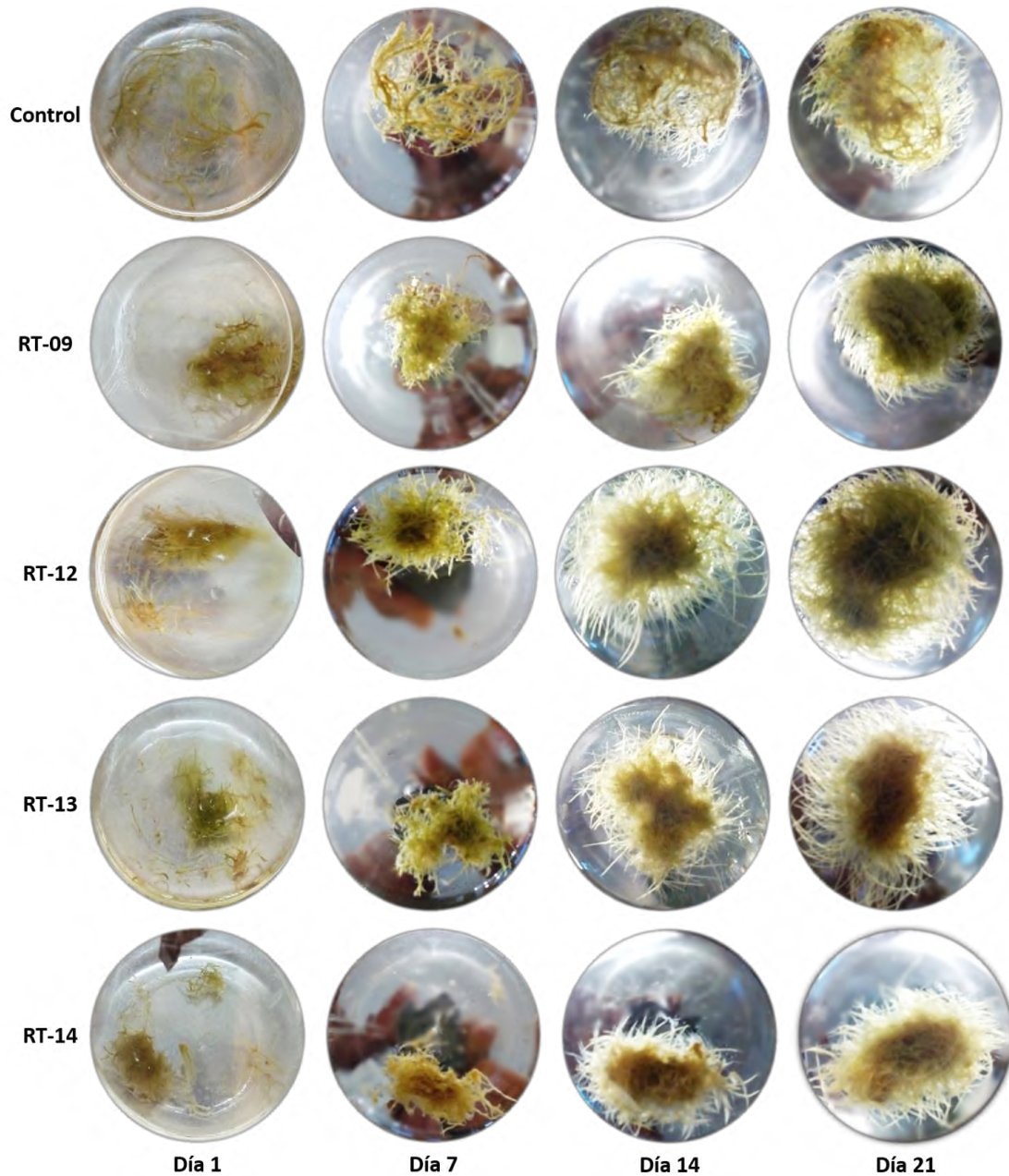


Figura 20. Crecimiento de biomasa de raíces en medio MS líquido durante 7, 14 y 21 días de cultivo.

Por lo tanto, es necesario realizar estudios subsecuentes en cultivos de raíces de *Stevia* que muestren desarrollo de pigmentos fotosintéticos para determinar su producción de metabolitos

secundarios de interés como lo son los glucósidos de esteviol y con ello poder seleccionar líneas de raíces transformadas funcionales en la obtención de dichos compuestos bioactivos.

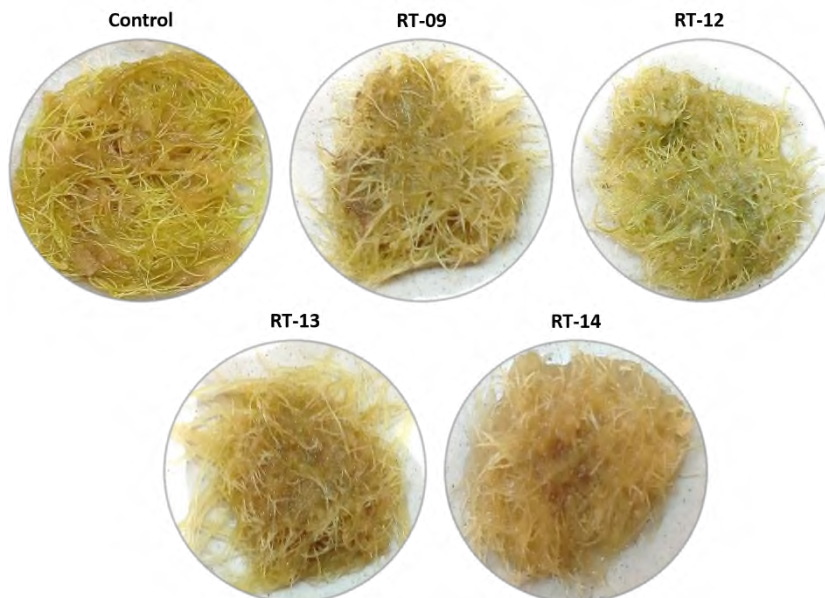


Figura 21. Biomasa de raíces acumulada después de 21 días de cultivo en medio MS líquido.

La mejor línea transformada en términos de adaptación a medio líquido fue RT12, cuyo aumento en biomasa fue de 5.83 ± 0.44 veces en 21 días y además, presentó formación mínima de callos tumorigénicos. Aunado a esto, desarrolló pigmentación verde lo cual es sugerente de su potencial para producir glucósidos de esteviol. A pesar de la variabilidad en la morfología y el crecimiento entre rizoclonas, las cuatro líneas establecidas fueron capaces de crecer en medio líquido con acumulación de biomasa superior al cultivo no transformado y, además, dos de ellas desarrollaron coloración verde, por lo que serán útiles para estudios posteriores sobre la evaluación de la influencia de diferentes factores en la producción de glucósidos de esteviol y el análisis de las vías metabólicas involucradas en su biosíntesis.

Las variaciones en el crecimiento y desarrollo exitoso entre rizoclonas pueden atribuirse a diversos factores, desde las condiciones de cultivo, como el medio, la exposición a luz u oscuridad (Pandey *et al.*, 2016), sus capacidades biosintéticas y la capacidad que tienen para sobrevivir al estrés de la infección y de los subcultivos (Bathoju *et al.*, 2017), hasta implicaciones moleculares relacionadas a los sitios de inserción del ADN-T en el genoma de la planta, pues éste podría integrarse en regiones transcripcionalmente silenciosas lo que llevaría a una expresión ineficiente del transgen (Kakkar y Verma, 2011).

9. CONCLUSIONES

El protocolo de transformación desarrollado rindió frecuencias de inducción altas, sin embargo, el número de raíces transformadas fue bajo.

El tiempo de co-cultivo y el período de inducción son factores que afectan significativamente la eficiencia de inducción y el número de raíces inducidas.

Se establecieron cuatro cultivos de líneas de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* con la cepa silvestre ATCC15834 de *A. rhizogenes*, de las cuales dos presentaron coloración verde.

Las cuatro líneas de raíces transformadas tuvieron un patrón de crecimiento y acumulación de biomasa en medio líquido superior al del cultivo de raíces no transformadas mantenidas con reguladores de crecimiento.

10. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Optimizar las condiciones de crecimiento de la cepa ATCC15834 para homogeneizar las densidades de inóculo.

Examinar condiciones de cultivo que ayuden en la proliferación y supervivencia de las raíces inducidas.

Evaluar el contenido de glucósidos de esteviol en los cultivos establecidos e investigar la relación de la presencia de clorofila en los cultivos verdes con la producción de metabolitos secundarios propios de las hojas de *Stevia*.

11. REFERENCIAS

1. Ahmed, M. B., Salahin, M., Karim, R., Razvy, M. A., Hannan, M. M., Sultana, R., Hossain M., & Islam, R. (2007). An efficient method for *in vitro* clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 2(2), 121-125.
2. Ahmed, S. R., Howlader, M. M. S., Sutradhar, P., & Yasmin, S. (2016). An efficient protocol for *in vitro* regeneration of *Stevia rebaudiana*. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 2(1), 95-106.
3. Alhady, M. R. A. A. (2011). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. A new sweetening crop in Egypt. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistr*, 6(4), 178-182.
4. Alippi, A. M., López, A. C., & Balatti, P. A. (2011). Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. *Revista Argentina de Microbiología*, 43, 278-286.
5. Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell, T. P., Citovsky, V., Conrad, L. J., Gelvin, S. B., Jackson, D. P., Kausch, A. P., Lemaux, P. G., Medford, J. I., Orozco-Cárdenas, M. L., Tricoli, D. M., Eck, J. V., Voytas, D. F., Walbot, V., Wang, K., Zhang, Z. J., & Stewart Jr., C. N. (2016). Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell*, 28(7), 1510-1520.
6. Anton, S. D., Martin, C. K., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W. T., Geiselman, P., & Williamson, D. A. (2010). Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, 55(1), 37-43.
7. Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C., & Restrepo, J. (2009). Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna*, 76(157), 109-121.
8. Bathoju, G., Rao, K., & Giri, A. (2017). Production of sapogenins (stigmasterol and hecogenin) from genetically transformed hairy root cultures of *Chlorophytum borivilianum* (Safed musli). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131(3), 369-376.
9. Bekheet, S. A., Taha, H. S., & Gabr, A. M. M. (2013). Protocol for *in vitro* morphogenesis and hairy root cultures of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn). *Journal of Applied Sciences Research*, 9(1), 860–866.
10. Bondarev, N., Reshetnyak, O., & Nosov, A. (2001). Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Science*, 161(1), 155-163.
11. Brandle, J. E., Starratt, A. N., & Gijzen, M. (1998). *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of plant science*, 78(4), 527-536.
12. Brandle, J. E., & Telmer, P. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68, 1855-1863.
13. Bulgakov, V. P. (2008). Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*, 26(4), 318-324.
14. Calderón-Gabriel, L., Jiménez B., A., Huerta H., A. A., Capataz T., J., & García L., E. (2016). Efecto de tres cepas de *Agrobacterium rhizogenes* y el tipo de explante sobre la transformación genética de *Stevia rebaudiana*. *Mexican Journal of Biotechnology*, 1(1), 34-41.
15. Canter, P. H., Thomas, H., & Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation:

- opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 23(4), 180-185.
16. Carvalho, A. C. G. D., Oliveira, R. C. G. D., Navacchi, M. F. P., Costa, C. E. M. D., Mantovani, D., Dacôme, A. S., ... & Costa, S. C. D. (2013). Evaluation of the potential use of rebaudioside-A as sweetener for diet jam. *Food Science and Technology*, 33(3), 555-560.
 17. Chandra, S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters*, 34(3), 407-415.
 18. Chatsudthipong, V., & Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(1), 41-54.
 19. Cho, A. S., Jeon, S. M., Kim, M. J., Yeo, J., Seo, K. I., Choi, M. S., & Lee, M. K. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and chemical toxicology*, 48(3), 937-943.
 20. Collins, F. H., Mendez, M. A., Rasmussen, M. O., Mehaffey, P. C., Besansky, N. J., & Finnerty, V. (1987). A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(1), 37-41.
 21. Dan, N. T. M., & Mai, T. T. X. (2014). Investigation of effective *in vitro* propagation media for *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 19, 172-180.
 22. Das, A., Gantait, S., & Mandal, N. (2011). Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Agricultural Research*, 6(1), 40-48.
 23. Das, A., Golder, A. K., & Das, C. (2015). Enhanced extraction of rebaudioside-A: experimental, response surface optimization and prediction using artificial neural network. *Industrial Crops and Products*, 65, 415-421.
 24. Dehdashti, S. M., Acharjee, S., Kianamiri, S., & Deka, M. (2017). An efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation protocol of *Withania somnifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(1), 55-65.
 25. Durán, S., Rodríguez, M. Del P., Cordón, K., & Record, J. (2012). Estevia (*Stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(4), 203-206.
 26. El-Esawi, M. A., Elkelish, A., Elansary, H. O., Ali, H. M., Elshikh, M., Witczak, J., & Ahmad, M. (2017). Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-8.
 27. Fu, X., Yin, Z. P., Chen, J. G., Shangguan, X. C., Wang, X., Zhang, Q. F., & Peng, D. Y. (2014). Production of chlorogenic acid and its derivatives in hairy root cultures of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(1), 262-268.
 28. Gallego, P. P., Gago, J., & Landín, M. (2011). Artificial neural networks technology to model and predict plant biology process. *Artificial Neural Networks-Methodological Advances and Biomedical Applications*, 197-217.
 29. Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-158.
 30. Gantait, S., Das, A., & Mandal, N. (2015). *Stevia*: a comprehensive review on ethnopharmacological properties and *in vitro* regeneration. *Sugar Tech*, 17(2), 95-106.
 31. Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37.
 32. Gelvin, S. B. (2010). Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic

- transformation. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 45-68.
33. Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., & Bley, T. (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1175-1185.
 34. Giri, A., & Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18(1), 1-22.
 35. Goyal, S. K., & Goyal, R. K. (2010). *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(1), 1–10.
 36. Grzegorzczak-Karolak, I., Kuźma, Ł., Skąła, E., & Kiss, A. K. (2018). Hairy root cultures of *Salvia viridis* L. for production of polyphenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 117, 235-244.
 37. Guleria, P., & Yadav, S. K. (2013). *Agrobacterium* mediated transient gene silencing (AMTS) in *Stevia rebaudiana*: insights into steviol glycoside biosynthesis pathway. *PLOS ONE*, 8(9), 1-10.
 38. Guleria, P., Masand, S., & Yadav, S. K. (2014). Overexpression of SrUGT85C2 from *Stevia* reduced growth and yield of transgenic *Arabidopsis* by influencing plastidial MEP pathway. *Gene*, 539(2), 250-257.
 39. Himmelboe, M., Lauridsen, U. B., Hegelund, J. N., Müller, R., & Lütken, H. (2013). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Rhodiola sp.*-an approach to enhance the level of bioactive compounds. *International Symposium on Medicinal Plants and Natural Products*, 1098, 143-149.
 40. Hossain, M. A., Shamim Kabir, A. H. M., Jahan, T. A., & Hasan, M. N. (2008). Micropropagation of *Stevia*. *International Journal of Sustainable Crop Production.*, 3(4), 1-9.
 41. Hooykaas, P. J. (2001). Plant Transformation. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–6.
 42. Hu, Z. B., & Du, M. (2006). Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(2), 121-127.
 43. Horn, C. (2012). Highly anticipated *Stevia* approval for the EU. *Food Science & Technology Journal*, 25(4), 29-31.
 44. Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, 1-28.
 45. Hwang, H. H., & Gelvin, S. B. (2004). Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *The Plant Cell*, 16(11), 3148-3167.
 46. Hwang, S. J. (2006). Rapid *in vitro* propagation and enhanced stevioside accumulation in *Stevia rebaudiana* Bert. *Journal of Plant Biology*, 49(4), 267-270.
 47. Ibrahim, I. A., Nasr, M. I., Mohammed, B. R., & El-Zefzafi, M. M. (2008). Plant growth regulators affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech*, 10(3), 254-259.
 48. Jahan, M. T., Islam, M. R., Mamun, P. R. A., & Islam, M. A. (2014). *In vitro* clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni through node and shoot tip culture. *Nuclear Science and Applications*, 23(1), 61-65.
 49. Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M., Sai, G. L., & Sekar, T. (2009). Plant regeneration from leaf derived callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 19(2), 133-141.
 50. Javed, R., Yucesan, B., Zia, M., & Gurel, E. (2017). Differential effects of plant growth

- regulators on physiology, steviol glycosides content, and antioxidant capacity in micropropagated tissues of *Stevia rebaudiana*. *Biologia*, 72(10), 1156-1165.
51. Jiménez-Brigada, A., Calderón-Gabriel, L., Gregorio-Ramírez, O., Huerta-Heredia, A. A., & García-López, E. (2017). Agrotransformación de *Stevia rebaudiana* con el plásmido binario pCAMBIA 1105.1. Presentado en la sesión de posters del XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, México del 25 al 30 de junio de 2017.
 52. Jitendra, M., Monika, S., Ratan, S. D., Priyanka, G., Priyanka, S., & Kiran, D. J. (2012). Micropropagation of an Antidiabetic Plant-*Stevia rebaudiana* Bertoni, (Natural Sweetener) in Hadoti Region of South-East Rajasthan, India. *Journal of Biological Sciences*, 1(3), 37-42.
 53. Joshee, N., Tascan, A., Medina-Bolivar, F., Parajuli, P., Rimando, A. M., Shannon, D. A., & Adelberg, J. W. (2013). *Scutellaria*: biotechnology, phytochemistry and its potential as a commercial medicinal crop. In *Biotechnology for Medicinal Plants*, (69-99).
 54. Kakkar, A., & Verma, V. K. (2011). *Agrobacterium* mediated biotransformation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(7), 29-35.
 55. Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239.
 56. Klee, H., Horsch, R., & Rogers, S. (1987). *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annual Review of Plant Physiology*, 38, 467-486.
 57. Kolb, N., Herrera, J. L., Ferreyra, D. J., & Uliana, R. F. (2001). Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: improved HPLC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4538-4541.
 58. Kujur, R. S., Singh, V., Ram, M., Yadava, H. N., Singh, K. K., Kumari, S., & Roy, B. K. (2010). Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetis rats. *Pharmacognosy Journal*, 2(14), 27-32.
 59. Kumar, H., Kaul, K., Bajpai-Gupta, S., Kaul, V. K., & Kumar, S. (2012). A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene*, 492(1), 276-284.
 60. Kumari, M., & Chandra, S. (2014). *Stevia rebaudiana*: beyond sweetness. Handbook of Medicinal Plants and Their Bioactive. *Trivandrum: Research Signpost*, 11-26.
 61. Lata, H., Chandra, S., Wang, Y. H., Raman, V., & Khan, I. A. (2013). TDZ-induced high frequency plant regeneration through direct shoot organogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni: an important medicinal plant and a natural sweetener. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 117–128.
 62. Laribi, B., Rouatbi, N., Kouki, K., & Bettaieb, T. (2012). *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert.)-A non-caloric sweetener and antidiabetic medicinal plant. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 2(2), 333-339.
 63. Liaei, Z. A., Maleki, M., & Omid, M. (2016). Production of stevioside by hairy root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Trabajo presentado en el 2nd International & 14th Iranian Genetics Congress en Tehran, Iran del 21 al 23 de mayo de 2016. No publicado.
 64. Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain

- laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagators' Society*, 30, 421-427.
65. López, E. G., Ramírez, E. G. R., Gúzman, O. G., Calva, G. C., Ariza-Castolo, A., Pérez-Vargas, J., & Rodríguez, H. G. M. (2014). MALDI-TOF characterization of hGH1 produced by hairy root cultures of *Brassica oleracea* var. *italica* grown in an airlift with mesh bioreactor. *Biotechnology Progress*, 30(1), 161-171.
 66. Lütken, H., Meropi-Antypa, N., Kemp, O., Hegelund, J. N., & Müller, R. (2017). Hairy root cultures of *Rhodiola rosea* to increase valuable bioactive compounds. In *Production of Plant Derived Natural Compounds Through Hairy Root Culture*, (65-88).
 67. Maistrenko, O. M., Luchakivska, Y. S., Zholobak, N. M., Spivak, M. Y., & Kuchuk, M. V. (2015). Obtaining of the transgenic *Heliantus tuberosus* L. plants, callus and “hairy” root cultures able to express the recombinant human interferon alpha-2b gene. *Cytology and Genetics*, 49(5), 308-313.
 68. Martins, T. M., Domingos, A., Novo, C., & Lourenco, P. M. L. (2003). Effect of *Agrobacterium rhizogenes* infection on *in vitro* rooting of *Vitis vinifera*. *Vitis*, 42(3), 159-162.
 69. McCullen, C. A., & Binns, A. N. (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 101-127.
 70. Michalec-Warzecha, Ż., Pistelli, L., D’Angiolillo, F., & Libik-Konieczny, M. (2016). Establishment of highly efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for *Stevia rebaudiana* Bertoni explants. *Acta Biológica Cracoviensia Series Botánica*, 58(1), 113-118.
 71. Mishra, B. N., & Ranjan, R. (2008). Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 49(1), 1-10.
 72. Modi, A. R., Patil, G., Kumar, N., Singh, A. S., & Subhash, N. (2012). A simple and efficient *in vitro* mass multiplication procedure for *Stevia rebaudiana* Bertoni and analysis of genetic fidelity of *in vitro* raised plants through RAPD. *Sugar Tech*, 14(4), 391-397.
 73. Mohamed, A. A., Ceunen, S., Geuns, J. M., Van den Ende, W., & De Ley, M. (2011). UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides. *Journal of plant physiology*, 168(10), 1136-1141.
 74. Moktaduzzaman, M., & Rahman, S. M. M. (2009). Regeneration of *Stevia rebaudiana* and analysis of somaclonal variation by RAPD. *Biotechnology*, 8(4), 449-455.
 75. Montes-Palmeros, M., Alvarado-Orea, I. V., Pavón-Orozco, P., García-López, E., & Huerta-Heredia, A. A. (2016). Producción de glucósidos de esteviol en plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* elicidas con metil jasmonato. *Mexican Journal of Biotechnology*, 1(1), 113-119.
 76. Moriuchi, H., Okamoto, C., Nishihama, R., Yamashita, I., Machida, Y., & Tanaka, N. (2004). Nuclear localization and interaction of *rol* B with plant 14-3-3 proteins correlates with induction of adventitious roots by the oncogene *rol* B. *The Plant Journal*, 38(2), 260-275.
 77. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
 78. Pal, P. K., Prasad, R., & Pathania, V. (2013). Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia*

- rebaudiana* Bertoni. *Journal of Plant Physiology*, 170(17), 1526-1535.
79. Pandey, R., Krishnasamy, V., Kumaravadivel, N., & Rajamani, K. (2014). Establishment of hairy root culture and production of secondary metabolites in *Coleus* (*Coleus forskohlii*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(1), 58-62.
 80. Pandey, H., Pandey, P., Pandey, S. S., Singh, S., & Banerjee, S. (2016). Meeting the challenge of stevioside production in the hairy roots of *Stevia rebaudiana* by probing the underlying process. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126(3), 511-521.
 81. Pavlova, O. A., Matveyeva, T. V., & Lutova, L. A. (2014). *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes*. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 4(2), 137-145.
 82. Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195-211.
 83. Philippe, R. N., De Mey, M., Anderson, J., & Ajikumar, P. K. (2014). Biotechnological production of natural zero-calorie sweeteners. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 155-161.
 84. Potrykus, I. (1990). Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/technology*, 8(6), 535-542.
 85. Preethi, D., Sridhar, T. M., & Naidu, C. V. (2011). Direct shoot organogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Phytology*. 3(5): 69-73.
 86. Ray, S., Samanta, T., Majumder, A., Bandyopadhyay, M., & Jha, S. (2014). Cytogenetic characterization of *Agrobacterium rhizogenes* transformed root lines of *Rauvolfia serpentina*. *The Nucleus*, 57(2), 105-112.
 87. Reis, R. V., Borges, A. P. P. L., Chierrito, T. P. C., de Souto, E. R., de Souza, L. M., Iacomini, M., ... & Gonçalves, R. A. C. (2011). Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(2), 329-335.
 88. Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia: CIAT.
 89. Roychowdhury, D., Majumder, A., & Jha, S. (2013). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: prospects and challenges. *Biotechnology for Medicinal Plants*, (29-68).
 90. Saad, A. I., & Elshahed, A. M. (2012). Plant tissue culture media. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, (29-40).
 91. Saito, K., Sudo, H., Yamazaki, M., Koseki-Nakamura, M., Kitajima, M., Takayama, H., & Aimi, N. (2001). Feasible production of camptothecin by hairy root culture of *Ophiorrhiza pumila*. *Plant Cell Reports*, 20(3), 267-271.
 92. Sánchez-Córdova, Á. de J., Capataz-Tafur, J., Barrera-Figueroa, B. E., López-Torres, A., Sanchez-Ocampo, P. M., García-López, E., & Huerta-Heredia, A. A. (2019). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances steviol glycosides production and growth in *Stevia rebaudiana* plantlets. *Sugar Tech*, 21(3), 398-406.
 93. Schenk, R. U., & Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1), 199-204.
 94. Sharma, P., Padh, H., & Shrivastava, N. (2013). Hairy root cultures: A suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants. *Engineering in Life Sciences*, 13(1), 62-75.

95. Sheludko, Y., & Gerasymenko, I. (2013). Biosynthetic potential of hairy roots for production of new natural products. *Biotechnology for Medicinal Plants*, (241-262).
96. Shin, H. S., Satsu, H., Bae, M. J., Zhao, Z., Ogiwara, H., Totsuka, M., & Shimizu, M. (2015). Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food chemistry*, 168, 167-175.
97. Shkryl, Y. N., Veremeichik, G. N., Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Fedoreyev, S. A., & Zhuravlev, Y. N. (2008). Individual and combined effects of the *rol A*, *B*, and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(1), 118-125.
98. Singh, P., Dwivedi, P., & Atri, N. (2014a). *In vitro* shoot multiplication of *Stevia* and assessment of stevioside content and genetic fidelity of the regenerants. *Sugar Tech*, 16(4), 430-439.
99. Singh, R., Kamal, S., Rani, D., Mukhopadhyay, K., & Banerjee, M. (2014b). Development of hairy root culture system of *Phlogacanthus thyrsoiflorus* Nees. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1(3), 107-112.
100. Singh, S., Mishra, P., Haider, Z. A., & Banerjee, M. (2017). Efficacy of *Rhizobium rhizogenes* strains on hairy root transformation in *Stevia rebaudiana* L. Bertoni. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 55-60.
101. Sivaram, L., & Mukundan, U. (2003). *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39(5), 520-523.
102. Smith, R. H. (2012). Explant preparation. *Plant tissue culture: techniques and experiments*, (45-51). Academic Press.
103. Thiyagarajan, M., & Venkatachalam, P. (2012). Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 111-117.
104. Thwe, A., Valan Arasu, M., Li, X., Park, C. H., Kim, S. J., Al-Dhabi, N. A., & Park, S. U. (2016). Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). *Frontiers in Microbiology*, 7(318), 1-10.
105. Tzfira, T., & Citovsky, V. (2002). Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends in Cell Biology*, 12(3), 121-129.
106. Tzfira, T., & Citovsky, V. (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 147-154.
107. Valderrama, A. M. (2005). Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "Ingeniería genética natural aplicada". *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 58(1), 2569-2585.
108. Valimehr, S., Sanjarian, F., Sharafi, A., & Sabouni, F. (2014). A reliable and efficient protocol for inducing genetically transformed roots in medicinal plant *Nepeta pogonosperma*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(3), 351-356.
109. Watanabe, T., Arai, Y., Mitsui, Y., Kusaura, T., Okawa, W., Kajihara, Y., & Saito, I. (2006). The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. *Clinical and experimental hypertension*, 28(5), 439-449.
110. Wilhelmson, A., Kallio, P. T., Oksman-Caldentey, K. M., & Nuutila, A. M. (2005). Expression of *Vitreoscilla hemoglobin* enhances growth of *Hyoscyamus muticus* hairy root

- cultures. *Planta Medica*, 71(01), 48-53.
111. Yadav, S. K., & Guleria, P. (2012). Steviol glycosides from *Stevia*: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(11), 988-998.
112. Yadav, K., Singh, N., & Verma, S. (2012). Plant tissue culture: a biotechnological tool for solving the problem of propagation of multipurpose endangered medicinal plants in India. *Journal of Agricultural Technology*, 8(1), 305-318.
113. Yamazaki, T., Flores, H. E., Shimomura, K., & Yoshihira, K. (1991). Examination of steviol glucosides production by hairy root and shoot cultures of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Natural Products*, 54(4), 986-992.
114. Zheng, J., Zhuang, Y., Mao, H. Z., & Jang, I. C. (2019). Overexpression of SrDXS1 and SrKAH enhances steviol glycosides content in transgenic *Stevia* plants. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1-16.

12. ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadísticos y pruebas de medias

Inducción de brotes

One-way ANOVA: Brotes/Explante versus Medio

Source	DF	SS	MS	F	P
Medio	1	213.5	213.5	11.32	0.028
Error	4	75.4	18.9		
Total	5	288.9			

S = 4.342 R-Sq = 73.90% R-Sq(adj) = 67.37%
Grouping Information Using Tukey Method

Medio	N	Mean	Grouping
2	3	25.330	A
1	3	13.400	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Medio

Individual confidence level = 95.00%

One-way ANOVA: Tamaño Brotes versus Medio

Source	DF	SS	MS	F	P
Medio	1	1.441	1.441	10.52	0.032
Error	4	0.548	0.137		
Total	5	1.988			

S = 0.37 R-Sq = 72.46% R-Sq(adj) = 65.57%
Grouping Information Using Tukey Method

Medio	N	Mean	Grouping
2	3	2.4300	A
1	3	1.4500	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Medio

Individual confidence level = 95.00%

Regeneración y enraizamiento de plántulas

One-way ANOVA: Tamaño plántulas versus [Medio]/AG

Source	DF	SS	MS	F	P
[Medio]/AG	3	175.96	58.65	20.93	0.000
Error	8	22.42	2.80		
Total	11	198.39			

S = 1.674 R-Sq = 88.70% R-Sq(adj) = 84.46%
Grouping Information Using Tukey Method

[Medio]/AG	N	Mean	Grouping
------------	---	------	----------

22	3	17.950	A
12	3	17.270	A
11	3	10.230	B
21	3	9.720	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of [Medio]/AG

Individual confidence level = 98.74%

One-way ANOVA: I. C. plántulas versus [Medio]/AG

Source	DF	SS	MS	F	P
[Medio]/AG	3	25.0252	8.3417	108.82	0.000
Error	8	0.6133	0.0767		
Total	11	25.6385			

S = 0.2769 R-Sq = 97.61% R-Sq(adj) = 96.71%

Grouping Information Using Tukey Method

[Medio]/AG	N	Mean	Grouping
12	3	5.6990	A
22	3	5.0590	A
21	3	2.5360	B
11	3	2.5170	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of [Medio]/AG

Individual confidence level = 98.74%

One-way ANOVA: Raíces por brote versus [Medio]/AG

Source	DF	SS	MS	F	P
[Medio]/AG	3	40.05	13.35	11.25	0.003
Error	8	9.49	1.19		
Total	11	49.54			

S = 1.089 R-Sq = 80.84% R-Sq(adj) = 73.66%

Grouping Information Using Tukey Method

[Medio]/AG	N	Mean	Grouping
21	3	11.000	A
22	3	10.560	A
12	3	9.560	A
11	3	6.330	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of [Medio]/AG

Individual confidence level = 98.74%

One-way ANOVA: Tamaño raíces versus [Medio]/AG

Source	DF	SS	MS	F	P
[Medio]/AG	3	14.650	4.883	8.41	0.007
Error	8	4.647	0.581		
Total	11	19.297			

S = 0.7621 R-Sq = 75.92% R-Sq(adj) = 66.89%
 Grouping Information Using Tukey Method

[Medio]/AG	N	Mean	Grouping
21	3	11.2100	A
22	3	10.4600	A
12	3	9.5300	A B
11	3	8.2500	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
 All Pairwise Comparisons among Levels of [Medio]/AG

Individual confidence level = 98.74%

Inducción de raíces pilosas

One-way ANOVA: Frecuencias inducción versus Tco-Tin

Source	DF	SS	MS	F	P
Tco-Tin	5	0.62352	0.12470	37.00	0.000
Error	12	0.04045	0.00337		
Total	17	0.66397			

S = 0.05806 R-Sq = 93.91% R-Sq(adj) = 91.37%
 Grouping Information Using Tukey Method

Tco-Tin	N	Mean	Grouping
243	3	0.88890	A
482	3	0.77780	A
481	3	0.77780	A
483	3	0.55560	B
242	3	0.55560	B
241	3	0.33330	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
 All Pairwise Comparisons among Levels of Tco-Tin

Individual confidence level = 99.43%

One-way ANOVA: Raíces inducidas versus Tco/Tin

Source	DF	SS	MS	F	P
Tco/Tin	8	11.1144	1.3893	24.60	0.000
Error	18	1.0164	0.0565		
Total	26	12.1308			

S = 0.2376 R-Sq = 91.62% R-Sq(adj) = 87.90%
 Grouping Information Using Tukey Method

Tco/Tin	N	Mean	Grouping
2421	3	2.4400	A
4814	3	1.5600	B
2414	3	1.5600	B
487	3	1.0000	B C
4821	3	0.8900	B C
48021	3	0.5600	C
247	3	0.5600	C
24021	3	0.4400	C
24014	3	0.4400	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Tco/Tin

Individual confidence level = 99.75%

One-way ANOVA: Tamaño raíces t10días versus Tco

Source	DF	SS	MS	F	P
Tco	1	2.496	2.496	2.68	0.177
Error	4	3.726	0.931		
Total	5	6.222			

S = 0.9651 R-Sq = 40.12% R-Sq(adj) = 25.15%
Grouping Information Using Tukey Method

Tco	N	Mean	Grouping
48	3	5.8400	A
24	3	4.5500	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Tco

Individual confidence level = 95.00%

One-way ANOVA: Tamaño raíces t30días versus Tco

Source	DF	SS	MS	F	P
Tco	1	0.78	0.78	0.35	0.586
Error	4	8.90	2.23		
Total	5	9.68			

S = 1.492 R-Sq = 8.04% R-Sq(adj) = 0.00%
Grouping Information Using Tukey Method

Tco	N	Mean	Grouping
24	3	9.930	A
48	3	9.210	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Tco

Individual confidence level = 95.00%

One-way ANOVA: I. C. raíces pilosas versus Tco

Source	DF	SS	MS	F	P
Tco	1	0.6338	0.6338	51.95	0.002
Error	4	0.0488	0.0122		
Total	5	0.6826			

S = 0.1105 R-Sq = 92.85% R-Sq(adj) = 91.06%
Grouping Information Using Tukey Method

Tco	N	Mean	Grouping
24	3	1.2500	A
48	3	0.6000	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Tco

Individual confidence level = 95.00%

One-way ANOVA: Peso raíces versus Cinética raíces

Source	DF	SS	MS	F	P
Cinética raíces	19	212.2655	11.1719	228.65	0.000
Error	40	1.9544	0.0489		
Total	59	214.2199			

S = 0.2210 R-Sq = 99.09% R-Sq(adj) = 98.65%
Grouping Information Using Tukey Method

Cinética raíces	N	Mean	Grouping
1221	3	7.5150	A
1321	3	5.7820	B
921	3	5.3050	B C
1214	3	4.8880	C
1421	3	4.7030	C
1314	3	3.5660	D
914	3	3.0210	D E
1414	3	2.9730	D E
C21	3	2.5710	E
127	3	1.8370	F
C14	3	1.7860	F
137	3	1.7690	F G
97	3	1.5460	F G H
147	3	1.4580	F G H
C7	3	1.2380	F G H
141	3	1.1000	G H
121	3	1.1000	G H
C1	3	1.0000	H
131	3	1.0000	H
91	3	0.9000	H

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Cinética raíces

Individual confidence level = 99.95%

One-way ANOVA: I. C. biomasa versus Raíces cultivos

Source	DF	SS	MS	F	P
Raíces cultivos	4	33.445	8.361	71.52	0.000
Error	10	1.169	0.117		
Total	14	34.614			

S = 0.3419 R-Sq = 96.62% R-Sq(adj) = 95.27%
Grouping Information Using Tukey Method

Raíces cultivos	N	Mean	Grouping
R12	3	5.8300	A
R9	3	4.8900	B
R13	3	4.7800	B
R14	3	3.2800	C
Ctrl	3	1.5700	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Raíces cultivos

Individual confidence level = 99.18%