

Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec

“Plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* expuestas a metil jasmonato”

Tesis para obtener el grado de:
Maestro en Biotecnología

Presenta:

Ing. Mauro Montes Palmeros

Director

Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia

Co-Director

Dra. Ileana Vera Reyes

San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca, 2017

Esta tesis fue realizada en la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec. En el laboratorio de Cultivo de Células Vegetales, bajo la dirección de la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia y la Dra. Ileana Vera Reyes. La investigación fue realizada con financiamiento del CONACyT (Proyecto de Cátedra CONACyT 3212 “Estudio integral de plantas medicinales para la producción y estandarización de fitoextractos” No. 235307) y al proyecto INFR201501 N° 255514: Equipamiento para fortalecer la investigación en Cultivo de Tejidos y Producción de Metabolitos Secundarios Vegetales de la Universidad del Papaloapan.



Agradecimientos

Un sincero agradecimiento a la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia y a la Dra. Ileana Vera Reyes por su apoyo durante este tiempo, por sus ideas y por la paciencia que siempre me tuvieron.

A los doctores de la universidad, quienes brindaron parte de su conocimiento para culminar este trabajo.

Al Dr. Adolfo López Torres por el apoyo técnico en el procesamiento y análisis de muestras y cuantificación de metabolitos.

A la Dra. Ana Ramos por su apoyo durante la estancia de investigación.

A Estefanía del Carmen Urdiana Arteaga por su apoyo técnico en el análisis y cuantificación de muestras en el HPLC, en la primera etapa del proyecto.

A Anamare por su apoyo técnico en el manejo del software Melanie 7.0.

Quiero agradecer a mi Comité Tutorial por su apoyo y comentarios durante el desarrollo del trabajo.

A CONACyT por la beca otorgada (Número de becario 571244) y beca-mixta (BECAS MIXTAS 2016 - MZO 2017 PARA MOVILIDAD NACIONAL).

Los productos de este trabajo fueron presentados en el congreso:

Montes-Palmeros M., Alvarado-Orea IV., Pavón-Orozco P., García-López E., Huerta-Heredia A. A. (2005). PRODUCCIÓN DE REBA EN LANTULAS MICROPROPAGADAS DE *Stevia rebaudiana* ELICITADAS CON METIL JASMONATO. CARTEL. II Encuentro Nacional sobre Biotecnología en la UATx. 6 al 9 de diciembre. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

Montes-Palmeros M., Alvarado-Orea IV., Pavón-Orozco P., García-López E., Huerta-Heredia A. A. (2016). Steviol glucosides production in micropropagated seedlings of *Stevia rebaudiana* elicited with methyl jasmonate Producción de glucosidos de esteviol en plantúlas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* elicidadas con metil jasmonato. *Mexican journal of Biotecnology*, 1(1): 113-119.

índice

Índice de figuras	vii
Índice de tablas	viii
Notación	ix
Resumen	10
Abstract	11
1. Marco teórico.....	12
1.1 <i>Stevia rebaudiana</i>	12
1.2 Metabolitos secundarios en las plantas	15
1.2.1 Biosíntesis de glucósidos de esteviol: ruta del ácido mevalónico (MVA) y 2-C-metil-D- etril-4-fosfato (MEP).....	16
1.2.2 Biosíntesis de fenoles	17
1.3 Estrategias para la producción de metabolitos secundarios	19
1.3.1 Cultivo <i>in vitro</i>	19
1.3.2 Elicitación biótica y abiótica en <i>S. rebaudiana</i>	21
1.3.4 Jasmonatos como inductores del metabolismo secundario	23
1.4 Proteómica.....	25
2. Justificación.....	28
3. Hipótesis.....	29
4. Objetivos	29
4.1 Objetivo General	29
4.2 Objetivo específico.....	29
5. Materiales y Métodos	30
5.1 Material vegetal y desinfección.....	30
5.1.1 Medio de cultivo y condiciones de crecimiento.....	30

5.2 Elicitación de plántulas con MeJa	30
5.2.1 Preparación del elicitor (MeJa).....	30
5.2.2 Condiciones de elicitación	31
5.3 Extracción de GE de plántulas micropropagadas de <i>Stevia rebaudiana</i>	31
5.3.1 Cromatografía en capa fina.....	31
5.3.2 Cuantificación de GE en HPLC	32
5.4 Extracción y cuantificación de fenoles totales (FT)	33
5.5 Cuantificación de clorofila	34
5.6 Extracción de proteína	34
5.6.1 Extracción de proteína total soluble	35
5.7 Análisis bidimensional de proteínas.....	35
5.7.1 Isoelectrenfoque (IEF).....	36
5.7.2 Separación de proteínas en una segunda dimensión	37
5.8 Análisis estadístico	37
6. Resultados y discusión.....	38
6.1 Micropropagación de <i>Stevia rebaudiana</i>	38
6.2 Cinéticas de elicitación con MeJa a plántulas micropropagadas de <i>Stevia rebaudiana</i>	39
6.2.1 Crecimiento y contenido total de clorofila	39
6.2.2 Acumulación de MetS	43
6.2.3 Cinética de elicitación con 25 μ M de MeJa a plántulas micropropagadas de <i>Stevia rebaudiana</i>	44
6.3 Perfil proteómico de plántulas micropropagadas de <i>Stevia rebaudiana</i> elicitadas con MeJa.	47
6.3.1 Identificación de proteínas mediante bioinformática.....	51
7. Conclusiones.....	61

8. Recomendaciones.....	62
9. Referencias bibliográficas	63
10. Anexos	73

Índice de figuras

Fig. 1 Ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol.	18
Fig. 2 Biosíntesis de compuestos fenólicos en <i>Stevia rebaudiana</i>	19
Fig. 3 Clasificación de las proteínas expresadas diferencialmente en <i>A. thaliana</i> después de la exposición a MeJa.	26
Fig. 4 Micropropagación de <i>Stevia rebaudiana</i>	38
Fig. 5 Inducción de raíces en brotes de <i>Stevia rebaudiana</i>	39
Fig. 6 Respuesta fisiológica en plántulas micropropagadas de <i>Stevia rebaudiana</i> elicidadas con MeJa.	41
Fig. 8 Contenido total de clorofila en plantas micropropagadas de <i>S. rebaudiana</i> expuesta a MeJa.	42
Fig. 9 Producción de GE en plántulas micropropagadas de <i>Stevia rebaudiana</i> después de la adición de MeJa.	43
Fig. 10 Producción de GE en plántulas micropropagadas de <i>Stevia rebaudiana</i> expuestas a 25 μ M de MeJa durante 120 h.	44
Fig. 11 Cinética de producción de GE en plántulas micropropagadas de <i>Stevia rebaudiana</i> elicidadas con 25 μ M de MeJa durante 24 h.	45
Fig. 12 Producción de FT en plántulas de <i>Stevia rebaudiana</i> durante 120 h de exposición a MeJa.	46
Fig. 13 Gel SDS PAGE al 12% con proteína total soluble utilizando diferentes metodologías de extracción.	47
Fig. 14 Geles 2D (SDS-PAGE) de PTS de plántulas de <i>Stevia rebaudiana</i>	49

Fig. 15 Identificación de manchas proteicas (spots) de un gel SDS-PAGE de proteínas de <i>S. rebaudiana</i> , analizadas con el software Melanie 7.....	50
Fig. 16 Comparación de Geles 2D (SDS-PAGE) de plántulas de <i>S. rebaudiana</i> expuestas a MeJa.	50
Fig. 17 Diagrama de Venn. Número de manchas proteicas detectadas en el gel 2–D de plántulas de <i>S. rebaudiana</i>	51
Fig. 18 Imagen 2-D para calcular el pI y PM experimental de extractos proteicos de plántulas micropropagadas de <i>S. rebaudiana</i>	52
Fig. 19 Clasificación de las proteínas expresadas diferencialmente en plántulas micropropagadas de <i>S. rebaudiana</i> expuestas a MeJa.	59
Fig. 20 Proteínas identificadas en el gel 2-D elicitado, que están involucradas en la ruta de biosíntesis de GE.	60

Índice de tablas

Tabla. 1 Glucósidos de esteviol que produce <i>S. rebaudiana</i>	12
Tabla. 2 Explantes y concentración de fitorreguladores empleados en la micropropagación de <i>S. rebaudiana</i>	20
Tabla. 3 Concentraciones de MeJa utilizadas para incrementar la producción de MetS en cultivos vegetales.....	24
Tabla. 4 Condiciones de operación del isoelectroenfoque.	36
Tabla. 5 Metodología probada para la extracción de proteína total soluble de plántulas micropropagadas de <i>Stevia rebaudiana</i>	48
Tabla. 6 Posibles proteínas identificadas utilizando el pI y PM experimental del proteoma de 4 plantas (<i>A. thaliana</i> , arroz hoja de cítricos y <i>Catharanthus roseus</i>).	53
Tabla. 7 Resultados del multialineamiento de secuencias de proteínas de <i>A. thaliana</i> y <i>S. rebaudiana</i>	59

Notación

GE	Glucósidos de esteviol
Reb A	Rebaudiósido A
Est	Esteviósido
FT	Fenoles totales
ERO	Especies reactivas de oxígeno
AJ	Ácido jasmónico
MeJa	Metil jasmonato
MS	Medio de cultivo Murashige & Skoog
MetS	Metabolitos Secundarios
IAA	Ácido indolacético
BAP	Ácido benzilamino purina
IBA	Ácido indolbutírico
KIN	Cinetina
IEF	Isoelectroenfoque
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
PS	Peso Seco

Resumen

Stevia rebaudiana es una planta herbácea que produce glucósidos de esteviol, como metabolitos secundarios. Estos metabolitos han tomado un gran auge por las propiedades edulcorantes y medicinales que se le atribuyen. El establecimiento del cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* se obtuvo utilizando el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) complementado con 2% (p/v) de sacarosa, 1 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de IAA, posteriormente las plántulas se enraizaron en medio MS suplementado con 2% (p/v) de sacarosa y 0.5 mg/L de IBA.

Los experimentos de elicitación se realizaron a los 45 días de enraizadas las plántulas, se evaluaron tres concentraciones de metil jasmonato (MeJa) 25, 50 y 100 μM , en tres tiempos de exposición (24, 72 y 120 h), sobre la producción de Esteviósido (Est.), Rebaudiósido (Reb A), crecimiento y acumulación de clorofila en plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*. Se observó que las tres concentraciones evaluadas (25, 50 y 100 μM) incrementaron la producción de glucósidos de esteviol (GE), el efecto fue independiente de la concentración y el tiempo de exposición. El descenso en el contenido total de clorofila es asociado al daño provocado por el estrés a la planta. Se observó que la clorofila disminuyó 48.6 y 58.9% a las 120 h de exposición con 50 y 100 μM , respectivamente, en comparación con el control (0.15 mg/g_{p.i}). La adición de 25 μM durante 24 h de exposición, indujo la mayor acumulación de Reb A, Est. y fenoles totales incrementando 2.11 (4.53 mg/g_{p.s}); 2.6 (7.51 mg/g_{p.s}) y 1.74 (29.24 $\mu\text{g EC/mg}_{\text{Ext}}$) veces respectivamente, comparadas con las plantas sin tratamiento (2.14 mg/g_{p.s}, 2.90 mg/g_{p.s} y 16.75 $\mu\text{g EC/mg}_{\text{Ext}}$). El análisis proteómico reveló 34 proteínas expresadas diferencialmente en las plántulas tratadas a las 6 h con 25 μM de MeJa.

Abstract

Stevia rebaudiana is an herbaceous plant that produces steviol glycosides, as secondary metabolites. These metabolites have become attractive due to their attributed sweetening and medicinal properties. Shoot *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* were obtained on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with sucrose 2% (p/v), 1.0 mg/L BAP and 0.54 mg/L IAA. Individual shoots were transferred to MS with 0.5 mg/L IBA to induce rooting. After 45 days of rooting, elicitation experiments were carried out at three MeJA concentrations (25, 50 y 100 μ M) and three exposition times (24, 72 y 120 h). Stevioside (St), Rebaudioside A (Reb A), growth and total chlorophyll content were evaluated. Steviol glycosides production (SG) increased with the different concentrations and exposition times of the elicitor. The decrease in total chlorophyll content it could be related with damage caused by stress in plantlets. After 120 h of exposition with 50 and 100 μ M, chlorophyll content dropped by 48.6 and 58.9% respectively, compared to control (0.15 mg/g_{FW}). Addition of 25 μ M of MeJA for 24 h induced the higher accumulation of de Reb A, Est. y total phenols increasing by 2.11 (4.53 mg/g_{DW}); 2.6 (7.51 mg/g_{DW}) and 1.74 times (29.24 μ g EC/mg_{Ext}) respectively, compared to plants without treatment (2.14 mg/g_{DW}, 2.90 mg/g_{DW}, 16.75 μ g EC/mg_{Ext}). Differential proteomics showed 34 proteins expressed in plantlets treated for 6 h with 25 μ M MeJA.

1. Marco teórico

1.1 *Stevia rebaudiana*

Stevia rebaudiana, comúnmente conocida como estevia u hoja miel es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia *Asteráceae*, utilizada por los indígenas Guaraníes del sur de Brasil y Paraguay, como medicinal y endulzante. Los glucósidos de esteviol (GE) son diterpenos responsables del dulzor en la planta, en su forma pura y cristalina son hasta 300 veces más dulces que la sacarosa. La hoja de la planta es la parte que más se utiliza, ya que es el lugar donde se acumulan principalmente y en mayor concentración, hasta un 20% en base a su peso seco. El contenido depende de la variedad y de las condiciones en que se desarrolle el cultivo (Genus, 2003). Los GE que más se acumulan son el esteviósido (Est.) y rebaudiósido (Reb A). Existen otros glucósidos presentes en la planta, pero en menor concentración como el esteviolbíosido, rebaudiósido B, C, D, E, F y dulcósido A (Tabla. 1) (Ceuens y Geuns, 2013).

Tabla. 1 Glucósidos de esteviol que produce *S. rebaudiana*.

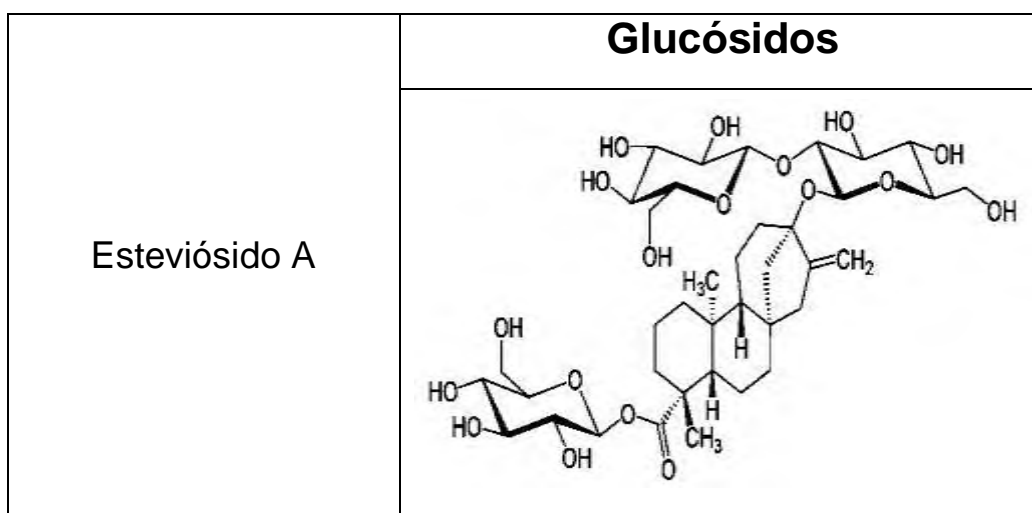


Tabla. 1 Continuación

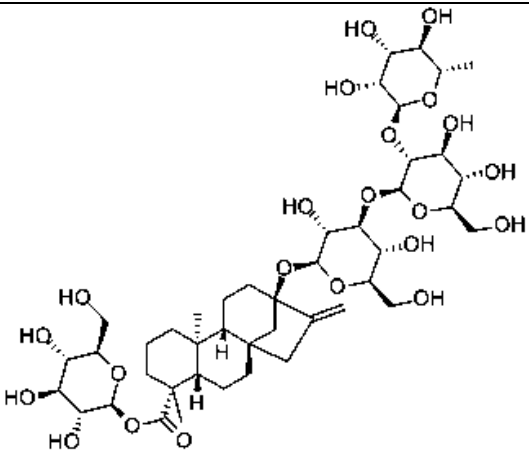
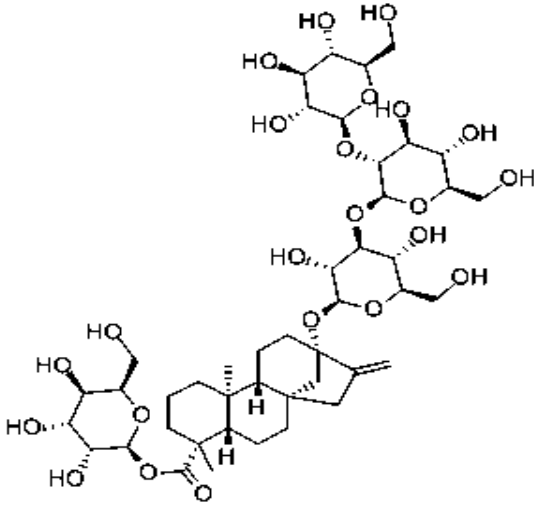
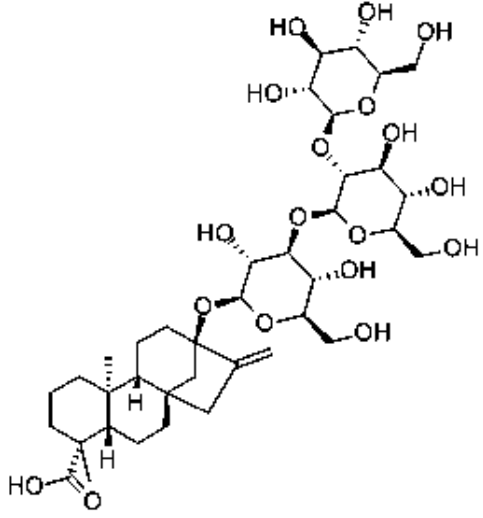
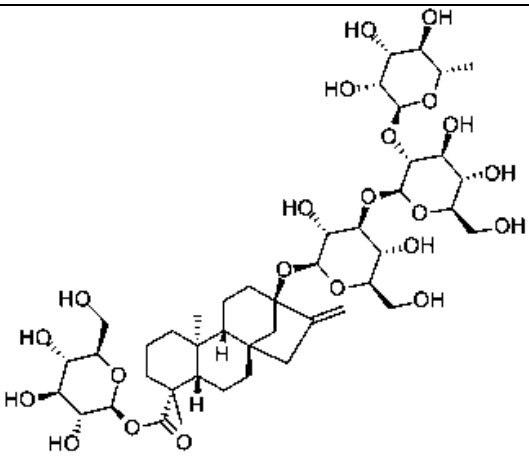
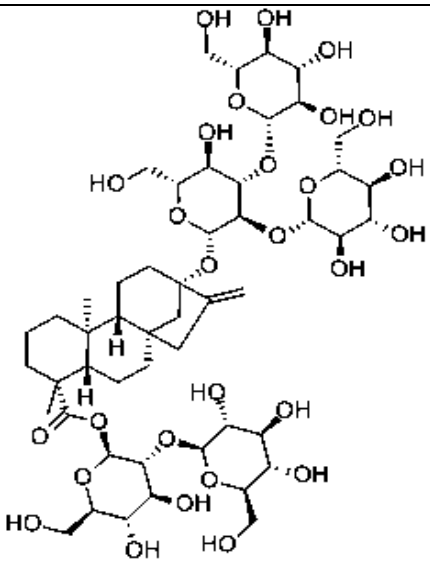
<p>Esteviósido B</p>	 <p>The chemical structure of Stevioside B consists of a steviol aglycone core. The aglycone has a pentacyclic ring system with a carboxylic acid group at C-13 and a methyl group at C-14. It is glycosylated at C-13 with a disaccharide unit (glucose and fructose) and at C-15 with a tetrasaccharide chain (glucose, fructose, glucose, and fructose).</p>
<p>Rebaudiósido A</p>	 <p>The chemical structure of Rebaudioside A features a steviol aglycone core. It is glycosylated at C-13 with a disaccharide unit (glucose and fructose) and at C-15 with a tetrasaccharide chain (glucose, fructose, glucose, and fructose). The aglycone core is identical to that of Stevioside B.</p>
<p>Rebaudiósido B</p>	 <p>The chemical structure of Rebaudioside B consists of a steviol aglycone core. It is glycosylated at C-13 with a disaccharide unit (glucose and fructose) and at C-15 with a tetrasaccharide chain (glucose, fructose, glucose, and fructose). The aglycone core is identical to that of Stevioside B.</p>

Tabla. 1 Continuación.

Rebaudiósido C	 The chemical structure of Rebaudiósido C consists of a central steviol skeleton, which is a pentacyclic triterpene. It is substituted with a carboxylic acid group at C-13 and a dihydrochalcone side chain at C-14. Attached to the steviol core are three glucose units: one at C-13 and two at C-14, forming a branched oligosaccharide chain.
Rebaudiósido D	 The chemical structure of Rebaudiósido D features a steviol skeleton with a carboxylic acid group at C-13 and a dihydrochalcone side chain at C-14. It is substituted with a branched oligosaccharide chain consisting of four glucose units: one at C-13 and three at C-14.

El género *Stevia* comprende 154 especies, de las cuales solo dos especies producen glucósidos de esteviol, *S. phlebophylla* A. (Ceunen *et al.*, 2013) y *S. rebaudiana* (Bert.), esta última cuenta con más de 148 variedades a nivel mundial (Madan *et al.*, 2010). Ante la creciente demanda de productos bajos en calorías o cero calóricos, esta planta ha tomado gran importancia agronómica debido a los GE que produce, y que son utilizados principalmente como edulcorantes. Japón fue el primer país de Asia en comercializar el Est. como edulcorante en alimentos, además ha sido introducido en varios países como China, Malasia, Singapur, Corea del Sur, Taiwán, Estados Unidos, Indonesia, Canadá y toda América del sur (Lee *et al.*, 1979; Chatsudthipong y Muanprasat, 2009).

Los extractos de *Stevia* poseen una variedad de compuestos con actividad antimicrobiana, antihipertensivos, antitumorales, hepatoprotector, antiinflamatorios y con actividades inmunomodulares (Gupta *et al.*, 2013). Entre los que se encuentran diterpenos, flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos grasos, proteínas y vitaminas (Gupta *et al.*, 2013).

Los GE suprimen la gluconeogénesis y estimulan la liberación de insulina en la sangre manteniendo los niveles de glucosa, por tanto, se pueden plantear como una alternativa de origen natural para la población afectada por la diabetes (Gardana *et al.*, 2003; Shivanna *et al.*, 2013; Aranda *et al.*, 2014). Por otro lado, el esteviol y sus derivados han demostrado tener capacidad citotóxica contra leucemia en la línea celular HL60, pulmón (A549), estomago (AZ521) y cáncer de mama en dos líneas celulares (SK-BR-3 y MCF-7) (Ukiya M. *et al.*, 2013; Paul *et al.*, 2012). Estudios toxicológicos demuestran que los GE no presentan efectos mutagénicos teratogénicos o carcinogénicos (Pól *et al.*, 2007).

1.2 Metabolitos secundarios en las plantas

Las plantas en su ambiente están expuestas a dos tipos de estrés, biótico (infección por patógenos, ataque de herbívoros y heridas) y abiótico (Calor, nutrientes, pH, salinidad, radiación UV, déficit de agua, etc.) (Huerta-Heredia, 2010). En respuesta a las condiciones ambientales, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de defensa como la producción de proteínas que degradan la pared celular de los microorganismos, pueden modificar la composición y la estructura de la pared celular vegetal, que a su vez se combina con la modificación de estructuras contra sus depredadores, tales como espinas, espigas y los tricomas (Sepúlveda *et al.*, 2003). Como parte de la protección química, una estrategia más es la producción de MetS con actividad antimicrobiana, insecticida, repelente o con actividad antioxidante (Croteau *et al.*, 2000).

Los MetS son aquellos compuestos que no son esenciales para el crecimiento y desarrollo de los organismos, pero desempeñan un papel importante en la interacción de las especies con su entorno, lo cual garantiza su supervivencia en el ecosistema (Verpoorte, 2000). La biosíntesis de estas moléculas es el resultado del metabolismo secundario. Se calcula que más de 100,000 metabolitos secundarios son producidos por plantas, mientras que el número total se estima que supera a más 500,000 (Hadacek, 2002).

Los MetS pueden tener funciones en las interacciones ecológicas de las plantas con otros organismos, también pueden ser de beneficio para la humanidad al ser usados en las industrias farmacéutica, alimentaria, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de interés agroquímico (Zerbe *et al.*, 2013).

1.2.1 Biosíntesis de glucósidos de esteviol: ruta del ácido mevalónico (MVA) y 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP)

Los GE son diterpenos tetracíclicos derivados del Kaureno mismo precursor de las Giberelinas. Existen dos vías para la síntesis de estos compuestos, la vía del Ácido Mevalónico (MVA) en el citosol y la vía alterna metil-D-erythritol 4-fosfato (MEP) en los plástidos.

La biosíntesis de diterpenos se realiza a partir de unidades de acetil-CoA en la ruta del MVA (Fig. 1a). El Acetil CoA se condensa a 3-hidroxi-3 metilglutaril-CoA (HMG-CoA) como intermediario. El HMG-CoA se reduce hasta formar mevalonato, este es fosforilado (MVA-P y MVA-PP) y descarboxilado para dar como producto los precursores de los terpenos el Isopentil pirofosfato (IPP) y el dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Esta molécula ingresa al cloroplasto para formar geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) y formar kaureno, un compuesto que tienen 4 sistemas de anillos. El kaureno es el compuesto donde divergen los glucósidos de steviol y las giberelinas; en *Stevia*, el kaureno es convertido a esteviol (núcleo básico de los glucósidos) en el retículo endoplásmico; dicho esteviol puede ser glucosilado en el aparato de

Golgi, para formar los principales edulcorantes como, el esteviósido (triglicosilado esteviol) y Rebaudiósido A y C (tetraglicosilado esteviol), Dulcósido A, los cuales van finalmente a las vacuolas (Brandle y Telmer, 2007) (Fig. 1a).

La vía del MEP (Fig. 1b), utiliza como precursores el piruvato y gliceraldehído 3-fosfato que se convierten en 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS). El DXP se convierte en MEP por la enzima DXP reductoisomerasa (DXR). El MEP es convertido a metil eretritol-2,4 ciclo-difosfato a través de 4-difosfocitidil-2-C metil D-eretritol (CDP-ME) y 4-difosfocitidil metil eretritol 2- fosfato (CDP-ME-P). La biosíntesis de las estructuras del diterpeno y giberelinas comienza en paralelo con la condensación de dimetilalil difosfato (DMAPP) y tres moléculas de isopentil pirofosfato (IPP) resultando un geranilgeranil pirofosfato (GGPP). EL GGPP es catalizado a kaureno. La conversión de IPP a kaureno ocurre en los cloroplastos. El kaureno es oxidado a ácido kaurénico por una enzima microsomal mono-oxigenasa. El punto de ramificación con la biosíntesis de giberelinas corresponde a la hidroxilación del ácido kaurénico a un esteviol ordinario de 13 C, el precursor de los glucósidos de esteviol (Totté *et al.*, 2000; Brandle y Telmer, 2007). La glucosilación posterior resulta en esteviolmonósido, esteviolbiósido, esteviósido y rebaudiósido (Fig. 1b) (Brandle y telmer, 2007; Ohta *et al.*, 2010; Modi *et al.*, 2014).

1.2.2 Biosíntesis de fenoles

Los fenilpropanoides se derivan de del ácido cinámico, que se forma por la acción de fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima clave en el punto de ramificación de la vía del Shikimato. El ácido cinámico por una serie de hidroxilación, metilación y deshidratación genera p-cumárico, ácido cafeico, ferúlico y sináptico (Fig. 2) (Dixon y Paiva, 1995; Solecka, 1997).

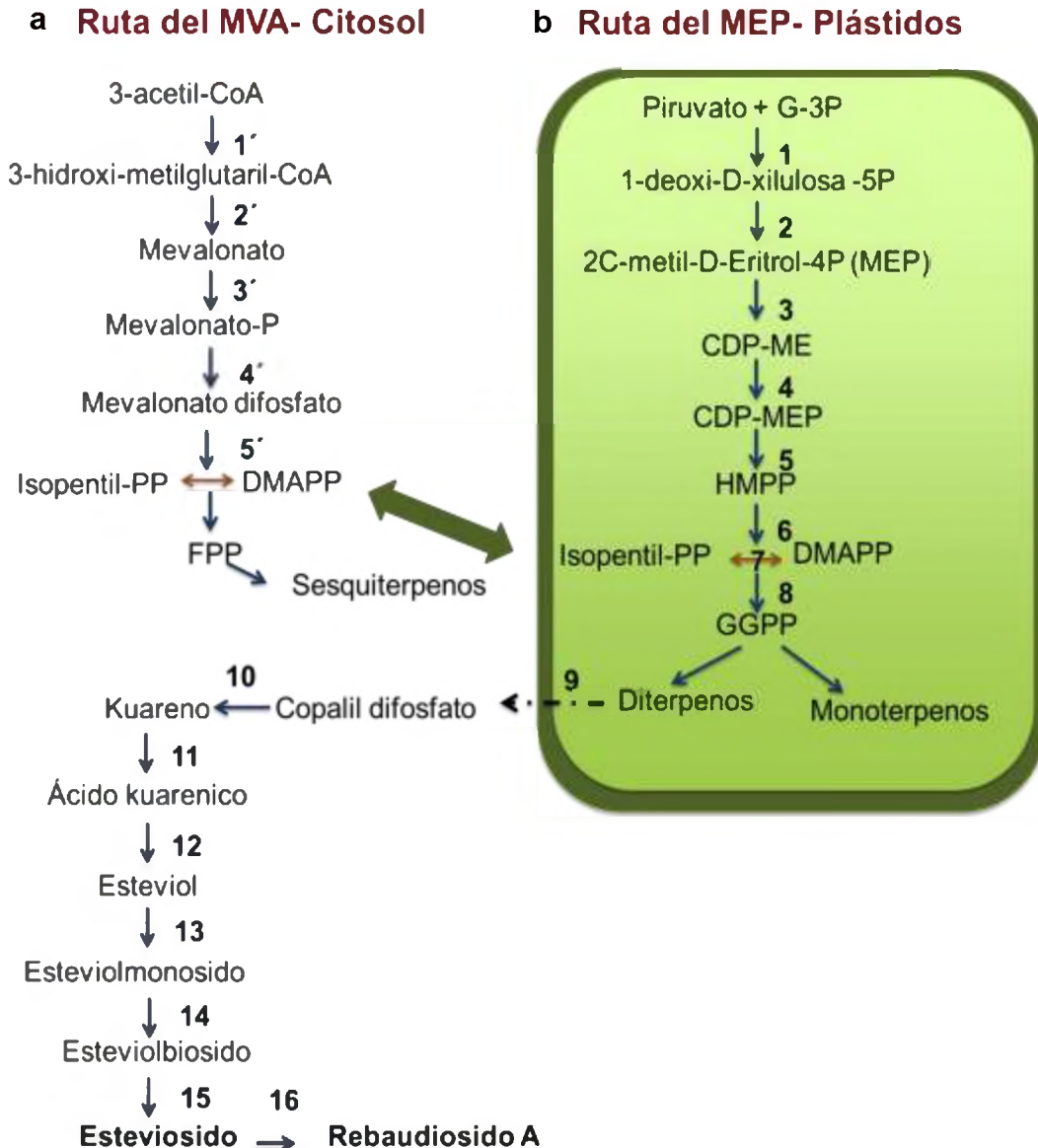


Fig. 1 Ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol. **a)** Vía del mevalonato. 1' (Acetoato acetil CoA tiolasa), 2' (3-Hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductoisomerasa), 3' (Mevalonato cinasa), 4' (Fosfato mevalonato descarboxilasa), 5' (Isopentil difosfato isomerasa). **b) Vía MEP.** 1 (*DXS*-1-deoxixilulosa-5-fosfato sintasa), 2 (*DXR*-1-deoxi-D-xilulosa-fosfocitidil reductoisomerasa), 3 (*CMS*-4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa), 4 (*CMK*-4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol cinasa), 5 (*MCS*-Metil eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa), 6 (*HDS*-1-hidroxi-2-metil-2 (E)-butenil 4 difosfato sintasa), 7 (*HDR*-1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4 difosfato reductasa), 8 (*GGDPS*- Geranilgeranil difosfato sintasa), 9 (*CDPS*-Copalil difosfato sintasa), 10 (*KS*-kuareno sintasa), 11 (*KO*-Kuareno oxidasa), 12 (*KAH*- Ácido kuarenico hidroxilasa), 13 (*UGT-85C2*-UDP glucasil trans ferasas-85C2), 14 (*UGT*-Glucosil transferasas), 15 (*UGT74G1*-UDP glucosil transferasa-74G1) y 16 (*UGT76G1*-UDP glucosil transferasa-76G1) (Modificada de Wölwer *et al.*, 2014).

En *S. rebaudiana* Molina *et al.*, (2017), encontraron 21 compuestos fenólicos agrupados en dos principales familias: flavonoides, y derivados de ácido quínico y cafeico. Gawel-Bęben *et al.*, (2015), caracterizaron el contenido y la actividad biológica de extractos, acuosos (A), etanólico (E) y glicol-acuoso (GA) de hojas secas de *S. rebaudiana*, y observaron que el extracto de GA presentaba el máximo contenido de fenoles (ácido cafeico, cloragénico y ferúlico) y flavonoides (catequina, epicatequina, luteolina y rutina).



Fig. 2 Biosíntesis de compuestos fenólicos en *Stevia rebaudiana* (Modificada de Dixon y Paiva, 1995).

1.3 Estrategias para la producción de metabolitos secundarios

1.3.1 Cultivo *in vitro*

Se refiere al conjunto de técnicas que permiten obtener plantas libres de enfermedades bajo condiciones asépticas de órganos, tejidos, células empleando medios nutritivos artificiales. Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl y Paul, 2000).

El cultivo de tejidos presenta aspectos y prácticas muy variadas entre las que se destacan la producción de MetS de plantas (Kreis, 2007). Además, es un método de propagación alternativo que se utiliza ampliamente en la propagación masiva de un gran número de especies de plantas de interés comercial y medicinal (George y Sherrington, 1984; Rout *et al.*, 2000). *S. rebaudiana* se propaga principalmente por semillas o por esquejes, sin embargo, la propagación por semillas no es eficiente debido a la baja viabilidad (Tadhani *et al.*, 2006). La micropropagación es una alternativa para superar estos problemas, debido a que tiene el potencial de producir un gran número de plántulas de *Stevia* en menor tiempo (Razak *et al.*, 2014).

1.3.1.1 Plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*

Existen diferentes protocolos reportados para la propagación *in vitro* de *S. rebaudiana* (Namdari *et al.*, 2015; Razak *et al.*, 2014; Pande y Gupta, 2013). En la Tabla 2, se resumen los diferentes tipos de explantes, concentraciones y combinaciones de fitorreguladores utilizados para la micropropagación de esta planta.

Tabla. 2 Explantes y concentración de fitorreguladores empleados en la micropropagación de *S. rebaudiana*.

Tipo de explante	Inducción de brotes	Inducción de raíces	Referencia
Segmentos nodales	BAP 0.5 mg/L KIN 0.25 mg/L	IBA 1.0 mg/L	Razak <i>et al.</i> , 2014.
Segmentos nodales	BAP 1.0 mg/L IAA 0.5 mg/L	IAA 0.5 mg/L	Laribi <i>et al.</i> , 2012.
Hojas	BAP 2 mg/L	IBA 0.5 mg/L	Preethi <i>et al.</i> , 2011.
Segmentos nodales y hoja	BAP 1.0 mg/L IAA 0.5 mg/L	IAA 1 mg/L	Anbazhagan <i>et al.</i> , 2010.

Segmentos nodales	BAP 0.6 mg/L	IBA 1 mg/L	Tadhani <i>et al.</i> , 2006.
Ápice, segmentos nodales y hoja	BAP 2 mg/L IAA 1 mg/L	IBA 1 mg/L	Sivaran y Mukunda, 2003.

1.3.2 Elicitación biótica y abiótica en *S. rebaudiana*

El término elicitor o inductor se utiliza comúnmente para denominar los factores físicos y químicos que son responsables de las respuestas fisiológicas o morfológicas de las plantas. Según su origen y estructura molecular, han sido clasificados como físicos o químicos, abióticos o bióticos, y dentro de este grupo como elicitores de composición química compleja o definida (Radman *et al.*, 2003).

La elicitación es uno de los métodos más efectivos en procesos a gran escala para inducir la expresión de genes asociados con enzimas responsables de la biosíntesis de MetS de interés comercial o, para inducir resistencia en las plantas contra el ataque de patógenos y condiciones ambientales (Davis y Verpoorte, 2005; Namdeo, 2007; Baldi *et al.*, 2007). Ahmad *et al.*, (2016), evaluaron el efecto de diferentes luces de colores en callos de *S. rebaudiana* y observaron que la exposición a la luz de color azul aumentó el contenido de fenoles (102.32 $\mu\text{g/g}_{\text{p.s}}$), flavonoides (22.07 $\mu\text{g/g}_{\text{p.s}}$), y la capacidad antioxidante (11.63 $\mu\text{g/g}_{\text{p.s}}$). Por otro lado, el estrés provocado por la adición de 0.10% NaCl y 0.025% Na₂CO₃ en el medio de cultivo para callos, incrementó la concentración de GE en 1.43 y 1.57% respectivamente; en suspensiones celulares adicionando las mismas concentraciones a 10 días de exposición, también favoreció la producción de GE que aumentó 2.61 y 5.14% respectivamente (Gupta *et al.*, 2014). Sinhg *et al.*, (2014), observaron que la adición de 75 mM de NaCl incrementó el contenido total de fenoles de 16.94 a 22.42 mg/g_{p.f} en 2 cultivares de *Stevia rebaudiana* regenerada *in vitro*. Álvarez *et al.*, (2016), adicionaron 0.1, 0.5, 1.5 y 2.5% de metanol (MeOH) al medio líquido donde crecieron brotes apicales de *S. rebaudiana*, observaron que al adicionar 0.1% de MeOH se incrementó la producción de Reb A (10.5 mg/g_{p.s}) y Est (52.11 $\mu\text{mol eq. Reb A/g}_{\text{p.s}}$),

mientras que el tratamiento con 1.5% de metanol acumulo 90.32 $\mu\text{mol eq. ácido gálico/g}_{p.s}$ de compuestos fenólicos.

Wölwer-Rieck *et al.*, 2014, estudiaron la ruta de biosíntesis de los GE en esquejes no enraizados de *S. rebaudiana* utilizando precursores claves marcados [5,5- $^2\text{H}_2$]-ácido mevalónico lactona (d_2 - MVL) y [5,5- $^2\text{H}_2$]-1-desoxi-D xilulosa (d_2 -DOX) con esto demostraron que ambas vías (MEP y MVA) contribuyen a la biosíntesis de los sesquiterpenos, mientras que los monoterpenos y diterpenos, en particular los GE se sintetizan predominantemente por la vía MEP.

Por otro lado, diferentes autores han validado que la vía MEP es la ruta que se activa bajo condiciones de estrés. Mandal *et al.*, 2015, inocularon plantas de *S. rebaudiana* con hongos micorrízicos arbusculares (AMF), observaron que la simbiosis de AMF reguló positivamente la expresión de once genes que codifican a enzimas de la vía MEP, mejorando la proporción de Est. y Reb A. Yang *et al.*, 2015, evaluaron la influencia de altas y bajas temperaturas, deshidratación, fotoperiodos y diferentes etapas de crecimiento en el contenido y los niveles de transcripción de quince genes implicados en la biosíntesis de GE, demostrando que los cambios ambientales influyeron en la producción de GE y los niveles de transcripción. Modi *et al.*, 2014, demostraron en plántulas endurecidas de *S. rebaudiana* durante 30 días, que 9 de los quince genes implicados en la biosíntesis de GE de la vía MEP se expresaron a niveles más altos comparados con las plántulas control y el mayor contenido de Est. (13.57%) se vio después de los 30 días de endurecimiento, lo que sugiere que mecanismos de regulación transducional y post-traducciona l están implicados. Kumar *et al.*, 2013, estudiaron la expresión del gen 1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4 difosfato reductasa (HDR) responsable de la conversión del (E)-4-hidroxi-3-metil butanil-difosfato (HMPP) a isopentil pirofosfato (IPP) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP), precursores de la formación de GE. Observaron que la expresión del gen HDR es mayor durante el día que la noche, y validaron la importancia de HDR en la regulación del contenido de GE.

1.3.4 Jasmonatos como inductores del metabolismo secundario

Las plantas producen ácido jasmónico (AJ) y metil jasmonato (MeJa) en respuesta a muchos tipos de estrés biótico y abiótico como mecanismos de defensa para asegurar la homeostasis y la supervivencia (Creelman *et al.*, 1992). Los Jasmonatos son sintetizados de la ruta del octadecanoico. La primera reacción es catabolizada por la lipoxigenasa (LOX) para formar 13 moléculas de ácido hidroxilinolénico (13-HPOT), que es convertido a ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) por la acción de aleno óxido sintetasa (AOS) y aleno óxido ciclasa (AOC). El AJ es sintetizado por la reducción de la OPDA y tres pasos de β -oxidación, posterior a esto se cataboliza por AJ metil carboxil transferasa para formar su homólogo MeJa (Creelman y Mullet, 1997).

Dichas moléculas, están implicadas en la regulación celular de procesos de desarrollo como la germinación de semillas, el crecimiento de raíces, maduración de frutos, la senescencia, la formación de tricomas glandulares, así como el desarrollo de embriones y polen (Wasternack y Parthier, 1997; Cheong; Choi, 2003; Wasternack, 2014). Además de su función en el desarrollo de la planta, también juegan un papel importante en la defensa de infecciones por patógenos, insectos y respuesta a heridas (Ellis *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Kempema *et al.*, 2007).

La percepción de los jasmonatos desencadena una extensa reprogramación transcripcional que conduce a la activación de rutas metabólicas completas (De Geyter *et al.*, 2012). Por lo tanto, la aplicación exógena de jasmonatos (MeJa y AJ) ha demostrado la capacidad de estimular la biosíntesis de compuestos derivados del metabolismo secundario (alcaloides, terpenoides, fenoles, fitoalexinas, cumarinas y taxanos) en muchas especies de plantas (Popava, 2013). Estas moléculas han sido ampliamente utilizadas como elicitores por su eficacia activando las rutas del metabolismo secundario (Van der Fits y Memelink, 2000) (Tabla 3).

Tabla. 3 Concentraciones de MeJa utilizadas para incrementar la producción de MetS en cultivos vegetales

CULTIVO	[MeJa]	RESULTADOS	REFERENCIA
Células <i>Ocimum sanctum</i>	25 y 50 μ M	La máxima producción de Terpenoides y Alcaloides se obtuvo con la adición de 25 μ M a las 48 h de exposición.	Mathew y Sankar, 2014.
<i>Stevia rebaudiana</i>	100 μ M	Baja la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de GE.	Kumar <i>et al.</i> , 2011.
Brotos de <i>Salvia officinalis</i> L.	20, 50 y 100 μ M	La máxima producción de diterpenos (Ácido carnósico y carnosol) se obtuvo a los tres días después de la adición de 20 μ M de MeJa.	Grzegorkczyk y Wisokinska, 2009.
<i>Picea abies</i>	5, 25, 50 y 100 Mm	Aumentó alrededor de 2 veces la producción de mono y diterpenos.	Zeneli <i>et al.</i> , 2006.
Cultivo de raíz de <i>Scopilia parviflora</i>	10, 100, 1000 y 2000 μ M	Meja 1000 y 2000 μ M inhibió el crecimiento de raíz. MeJa (100 μ M) aumento la producción de escopolamina a las 12 horas. Mientras que MeJa (10 μ M) alcanzó el rendimiento máximo de hioscamina a las 24 horas.	Kang <i>et al.</i> , 2004.
Tallos jóvenes (2 meses de edad) de Abeto rojo	1, 10 y 100 mM	La acumulación de diterpenos con la adición de tres concentraciones de MeJa 1 mM (11 veces) 10 mM (38 veces) y con 100 mM (20 veces).	Martin <i>et al.</i> , 2002.
Germinados de <i>Catharantus roseus</i> y <i>Chinchona</i>	5.57 μ M	Aumento hasta 255% la acumulación de alcaloides a los 7 días de exposición.	Aerts <i>et al.</i> , 1994.

1.4 Proteómica

La proteómica es una herramienta utilizada para el análisis de las proteínas expresadas en un sistema biológico en condiciones normales o sometidas a estrés. Este estudio permite identificar las proteínas y la función que cumplen en el organismo vivo. El estrés biótico y abiótico tiene la capacidad de alterar los niveles de expresión de proteínas en la célula vegetal, lo que conduce a la modulación de las rutas metabólicas y de defensa. Debido a la expresión de genes expresados bajo condiciones de estrés, los cambios cualitativos y cuantitativos de las proteínas son evidentes (Qureshi *et al.*, 2007). En un estudio de elicitación en *A. thaliana* con MeJa, se analizó el perfil proteómico y se encontraron proteínas con respuesta a MeJa, estas cubren un amplio rango de funciones moleculares las cuales se clasifican en 13 grupos en base a sus funciones bioquímicas, el 11% de las proteínas activadas se encuentran relacionadas con la respuesta al estrés y mecanismo de defensa y un 7% relacionado con el metabolismo secundario (Fig. 3) (Chen *et al.*, 2011).

Otros estudios han evaluado el efecto del estrés abiótico en el proteoma de diferentes sistemas vegetales con el objetivo de encontrar proteínas relacionadas con el mecanismo de defensa y la biosíntesis del metabolismo secundario de plantas. Por ejemplo el análisis proteómico en hojas de *Mahonia bealei* irradiadas encontraron tres proteínas del metabolismo secundario, sanguinarina reductasa involucrada en el metabolismo secundario como enzima clave en la detoxificación de benzofenantridina, PAL enzima relacionada con la respuesta de las plantas al estrés abiótico, la cual juega un papel importante en la biosíntesis de fenilpropanoides y la enzima isoflavona reductasa involucrada en la biosíntesis de isoflavonoides, esta última relacionada con la resistencia a especies reactivas de oxígeno (ERO) (Zhang *et al.*, 2014).



Fig. 3 Clasificación de las proteínas expresadas diferencialmente en *A. thaliana* después de la exposición a MeJa. El gráfico circular muestra la distribución de las proteínas en sus clases funcionales y porcentajes (Tomado de Chen *et al.*, 2011).

Aghaei y Komatsu, (2013), analizaron el perfil proteómico de plantas medicinales en respuesta al estrés salino, encontraron 3 proteínas relacionadas con la biosíntesis de alcaloides (triptófano sintasa, codeína reductasa y estreptosidina reductasa) y la enzima 12-oxo fitodienoato reductasa (OPRs), implicada en la biosíntesis de AJ.

Por otro lado, en estudios previos se ha evaluado el efecto de la adición de Jasmونات (AJ y MeJa) para el análisis de la expresión diferencial de proteínas involucradas con la biosíntesis de MetS. Por ejemplo, Gharechahi *et al.*, 2013, analizaron

el perfil proteómico de raíces de *Salibum marianum* tratadas con 100 μ M de MeJa, observando que la actividad de la LOX se incrementaba, así como la actividad de enzimas antioxidantes (POD y APx). De acuerdo con Chen *et al.*, (2011), en plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a 12, 24, 36 y 48h con 200 μ M de MeJa, se revelaron dos proteínas involucradas con la biosíntesis de fenilpropanoides (CAD 9 y DET3) y cuatro con la biosíntesis de glucosilanatos (TGG1, TGG2, ESM1 y proteína de la familia lectina jacalin).

En células en suspensión de *Catharanthus roseus* encontraron dos isoformas de estrictosidina sintasa, que cataliza la formación de estrictosidina y la biosíntesis de alcaloides, triptófano sintasa que participa en la biosíntesis triptamina que es el precursor de alcaloides y 12-oxo fitodienoato reductasa, que es indirectamente relacionado ya que cataliza el último paso de la biosíntesis del ácido jasmónico (Jacobs *et al.*, 2005). Por otro lado, Vera *et al.*, (2015), adicionaron 0.2 mM de AJ en cultivo de raíces de *Uncaria tomentosa*, y el perfil proteómico reveló dos isoformas de la estrictosidina sintasa involucrada en la biosíntesis de alcaloides.

2. Justificación

Stevia rebaudiana acumula glucósidos de esteviol, compuestos con alto valor edulcorante y cero calóricos, que además poseen capacidad antioxidante, antidiabético (Shivanna *et al.*, 2012; Aranda *et al.*, 2014) y citotóxica contra diferentes tipos de cáncer como leucemia, pulmón, estómago y mama (Ukiya M. *et al.*, 2013; Paul *et al.*, 2012). De ahí la importancia de buscar sistemas biotecnológicos en la producción de compuestos con propiedades medicinales.

El uso de condiciones de estrés biótico y/o abiótico es una estrategia biotecnológica en cultivo *in vitro* para inducir la acumulación de MetS y conocer o dilucidar el mecanismo de regulación para la producción de compuestos de interés farmacológico. Los Jasmonatos son compuestos ampliamente utilizados para inducir la biosíntesis de MetS. Por lo que este trabajo propone estudiar el perfil proteómico y la biosíntesis de rebaudiósido A, esteviósido y fenoles totales en plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* expuestas a MeJa. Este estudio permitirá tener un avance en el conocimiento de posibles mecanismos de la regulación de estos metabolitos de interés comercial en cultivos *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.

3. Hipótesis

La adición de MeJa a plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* activará proteínas involucradas con la ruta de biosíntesis del metabolismo secundario de GE como mecanismo de defensa de la planta.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la adición de MeJa en plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*.

4.2 Objetivo específico

- Establecer el cultivo *in vitro* de plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*.
- Evaluar la producción de metabolitos secundarios (rebaudiósido A, esteviósido y fenoles totales) y el crecimiento de plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* elicitadas con diferentes concentraciones y tiempos de exposición a MeJa.
- Analizar el perfil proteómico de plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* a la concentración de MeJa seleccionada.

5. Materiales y Métodos

5.1 Material vegetal y desinfección

El cultivo de plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* se estableció en el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Tuxtepec Oaxaca. Para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *S. rebaudiana* se utilizaron explantes foliares obtenidos de plantas de 2 meses de edad cultivadas en invernadero. Las hojas se lavaron en agua con jabón en agitación constante durante 5 min para eliminar las partículas de polvo, posteriormente se sometieron a un ciclo de desinfección con hipoclorito de sodio al 5% (v/v) por 2 min y etanol al 70% (v/v) por 1 min, seguido de dos enjuagues con agua destilada estéril.

5.1.1 Medio de cultivo y condiciones de crecimiento

La generación de brotes *in vitro* de *Stevia rebaudiana* se realizó en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad, adicionado con sacarosa al 2% (p/v) y como fitorreguladores 1 mg/L de Bencil amino purina (BAP) y 0.5 mg/L de ácido indolacético (IAA), solidificado con agar (8 g/L) de acuerdo con Anbzhagan *et al.*, (2010). El pH se ajustó con 1 M de hidróxido de sodio (NaOH) entre 5.8 - 6.0 antes de agregar el agar. Después de 15 días los brotes se pasaron a medio para enraizamiento, el cual contenía medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con 2% (p/v) de sacarosa y 0.5 mg/L de ácido indolbutírico (IBA). Todos los cultivos se mantuvieron en fotoperiodo de 16-8 h a 25 ± 2 °C.

5.2 Elicitación de plántulas con MeJa

5.2.1 Preparación del elicitor (MeJa)

El metil jasmonato (392707-Sigma Aldrich) fue disuelto en etanol al 96%, a una concentración final de 174, 400 μM y esterilizado con filtros de nylon de 0.48 μM previo a su uso (Mathew y Sankar, 2012).

5.2.2 Condiciones de elicitación

La elicitación se realizó a los 45 días después del enraizamiento de las plántulas micropropagadas de *S. rebaudiana*. El diseño experimental establecido fue un factorial general con 2 factores: la concentración de MeJa (4 niveles, 0, 25, 50 y 100 μM) y el tiempo de exposición (tres niveles, 1, 3 y 5 d). La colecta de las muestras se realizó utilizando nitrógeno líquido, las cuales se conservaron en un ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El experimento se realizó por triplicado.

5.3 Extracción de GE de plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*

La determinación de GE se llevó a cabo por dos métodos de extracción: el primer método consistió en secar las plántulas de *S. rebaudiana* (hoja y tallo) en una estufa a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar el peso constante, posteriormente se realizó una extracción hidroalcohólica al 80% etanol (v/v). Durante la extracción se conservó una proporción de 10% (p/v) (Bondarev, 2001). El extracto obtenido se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min y se concentró en una estufa con vacío a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. El segundo método consistió en liofilizar las plántulas, estas se mezclaron con acetonitrilo-agua al 30% (v/v), seguido de un tratamiento de sonicación por 30 min a temperatura ambiente. Durante la extracción se conservó una proporción de 20% (p/v). El extracto obtenido se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min y el sobrenadante se colocó en un tubo limpio.

5.3.1 Cromatografía en capa fina

Los extractos obtenidos de plántulas elicidadas con MeJa (25, 50 y 100 μM) se re-suspendieron en 100 μL de etanol. Posteriormente se aplicaron 5 μL en la placa de cromatografía (sílica gel 60 F₂₅₄). Como estándares se utilizaron Est. (S3572-Sigma

Aldrich) y Reb A (1432-Sigma Aldrich). Para la separación de las muestras las placas se colocaron en una cámara cromatográfica saturada utilizando la fase móvil reportada por Londhe y Nanaware, (2013), que consiste en acetato de etilo-etanol-acetona-agua (15:3:6:6, v/v/v/v). Las placas se revelaron con una solución de orcinol 0.5% en metanol-ácido sulfúrico (95:5, v/v), las cuales se calentaron ligeramente (Reis *et al.*, 2011). La identificación de GE se realizó por comparación con los estándares empleados y su factor de retención (Rf). Para determinar el Rf se utilizó la siguiente ecuación:

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

Donde:

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

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

5.3.2 Cuantificación de GE en HPLC

El contenido de GE se determinó empleando dos métodos de cuantificación el primero, consistió en resuspender las muestras provenientes de la extracción hidroalcohólica con una mezcla de 500 µL relación 70:30 (acetonitrilo-agua) respectivamente. Los extractos se sonicaron 5 min a 35 W. Las muestras se filtraron con discos de nylon de 0.45 µm antes de ser inyectadas al HPLC y se colocaron en viales Perkin Elmer de 2 mL. Las muestras se cuantificaron por HPLC (Perkin Elmer), utilizando la columna C-18 fase reversa (CSPHERI 5 RP-18 5 µm 250x4.6 mm) El volumen de inyección usado para la cuantificación de las muestras fue de 10 µL. El sistema de eluyentes consistió en una mezcla de 70:30 acetonitrilo-agua respectivamente, con un flujo isocrático de 1 mL/min a 30 °C, con un tiempo de corrida de 10 min por cada muestra (Dey *et al.*, 2013). Mientras que en el segundo método la cuantificación de GE se realizó mediante UHPLC (Water), se inyectaron

10 μL del extracto con una columna C-18 fase reversa (Luna 5 μm C18 (2) 100 \AA , 250 x 4.6 mm). La elución se llevó a cabo con una mezcla de acetonitrilo-agua (32:68) y 10 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 2.6) con flujo isocrático de 1 mL/min a 40 $^{\circ}\text{C}$, con un tiempo de corrida de 10 min (73rd JECFA 2010). Para ambos métodos la identificación de GE se efectuó comparando el espectro de absorción UV A 210 nm y tiempo de retención de los estándares de Reb A (1432-Sigma Aldrich) y Est. (S3572-Sigma Aldrich). La concentración de GE se calculó en base a la curva calibración de los estándares mencionados anteriormente, las concentraciones utilizadas para preparar las curvas calibración de los estándares fueron de 0.5-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 12, 25, 50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el primer y segundo método respectivamente.

5.4 Extracción y cuantificación de fenoles totales (FT)

Las muestras de plántulas secas fueron maceradas con etanol 80% (v/v). Durante la extracción se utilizó una proporción biomasa-solvente del 10% (p/v) para la extracción. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min, el sobrenadante fue recuperado en tubos limpios para secar el extracto en una estufa de vacío a 70 $^{\circ}\text{C}$, hasta alcanzar el peso constante. El extracto concentrado se resuspendió en etanol al 80%, utilizando el volumen necesario para ajustar a una concentración de 50 μg de extracto/ μL . La cuantificación de fenoles totales (FT) se realizó por la metodología reportada por Pourmorad *et al.*, (2006). Se utilizó para la mezcla de reacción Folin-Ciocalteu (F9252-Sigma-Aldrich) al 10% (v/v) y 1 M de Na_2CO_3 (230952-Sigma-Aldrich). La absorbancia de las reacciones se midió utilizando un espectrofotómetro (UV/VIS Optizen pop) a una longitud de onda de 765 nm. El contenido de FT se determinó en base a una curva calibración utilizando una solución concentrada del estándar de catequina (C1251-Sigma-Aldrich). Los resultados se expresaron en microgramos equivalentes de catequina por miligramos de extracto ($\mu\text{g CE}/\text{mg}_{\text{Ext}}$).

5.5 Cuantificación de clorofila

La extracción y cuantificación de clorofila se realizó por el método de Bruinsma, (1961), que consiste en triturar en nitrógeno líquido 1 g de tejido fresco y homogeneizar con 3 mL de acetona al 80% (v/v). Se sonicó durante 10 min a temperatura ambiente, protegido de la luz. Posteriormente se centrifugó durante 10 min a 4000 rpm. El sobrenadante se aforó a 5 mL con acetona al 80% (v/v) y midió la absorbancia a 652 nm en el espectrofotómetro (UV/VIS Optizen pop). La concentración (mg/L) de clorofila total se determinó con la siguiente ecuación de Bruinsma, (1961).

$$\text{Clorofila total} = 20.2 A_{645} + 8.02 A_{663}$$

Donde: A es la absorbancia.

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

$$\text{mg/g} = \frac{CV}{P}$$

Dónde:

C = Concentración en mg/L⁻¹

V = Volumen aforado

P = Peso de la muestra

5.6 Extracción de proteína

Se utilizaron muestras almacenadas a -80 °C, después de las 6 horas de exposición a 25 µM de MeJa. El tejido vegetal se trituró en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero con pistilo estéril hasta obtener un polvo fino, evitando el descongelamiento de la muestra.

5.6.1 Extracción de proteína total soluble

Las muestras de tejido triturado se le adicionó 1 mL de TRI reagent (Sigma-aldrich) por 50 a 100 mg de muestra, se incubó por 10 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Se centrifugó la muestra a 12000 g por 10 min a 4 °C (Centrifuga Universal 320 R, Hettich Lab Technology). La fase acuosa se transfirió por pipeteo a un tubo nuevo. Se añadieron 0.2 mL de cloroformo cada mL de TRI Reagent utilizado para la homogenización. Se agitó el tubo durante 20 seg y posteriormente se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4 °C. Se eliminó la fase acuosa y se le adicionó 0.3 mL de etanol al 100% se mezcló por inversión y se incubó por 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 2000 g por 5 min a 4 °C. Al sobrenadante se le añadió 1.5 mL de isopropanol por mL de reactivo de TRI Reagent, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g el sobrenadante es descartado y la pastilla se lavó con etanol al 100%. La muestra se mezcló en el vórtex y se centrifugó a 7500 g a 4 °C por 5 min. Se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla (30 min aproximadamente). Posteriormente, se resuspendió en 50 µL de buffer de rehidratación del Kit Ready Prep™ 2-D añadiéndole 2 M de tiourea. La proteína total soluble se cuantificó por el método de Peterson, (1977), utilizando albumina de suero de bovino (BSA) como estándar (500-0209 BioRad).

5.7 Análisis bidimensional de proteínas

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

5.7.1 Isoelectrenfoque (IEF)

El IEF permitió separar las proteínas con base en su carga neta. Se utilizó el equipo Hoefer IEF100 y tiras de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 4-7, de 7 cm (SERVA). Se llevó a cabo una rehidratación pasiva de 16 h a una temperatura de -20 °C, donde se colocó la muestra de proteína (220 µg, en 130 µL) en cada sarcófago; enseguida se colocaron las tiras de gradiente inmovilizado de pH (IPG) en contacto con la muestra evitando la formación de burbujas para evitar una mala separación y posteriormente se adicionaron 2 mL de aceite mineral (Bio-rad, USA) para evitar la evaporación de la muestra y cristalización de la urea. Para el isoelectroenfoque de las proteínas se utilizó el programa 1 (Hoefer IEF100) (Tabla 4). Todo el IEF se hizo a una temperatura de 20 °C debido, a que a temperaturas mayores de 37 °C pueden producir la carbamilación de las proteínas y, por otro lado, temperaturas menores a 10 °C pueden ocasionar la cristalización de la urea. El paso de primera a segunda dimensión involucra dos etapas la reducción y la alquilación de los grupos sulfhídricos. Las IPG fueron equilibradas adicionando 2 mL de amortiguador de equilibrio I (6 M urea, SDS 2%, buffer Tris/HCl 0.375 M, pH 8.8, glicerol 20%, DTT 2%) durante 20 min en agitación, para reducir los grupos sulfhídricos. Posteriormente, se decantó y se adicionó el amortiguador de equilibrio II compuesto de urea 6 M, SDS 2%, buffer Tris/HCl 0.375 M, pH 8.8, glicerol 20%, iodoacetamida 2.5%) para alquilar los grupos sulfhídricos. Se agitaron las tiras durante 10 min y posteriormente se colocaron en el gel para realizar la segunda dimensión.

Tabla. 4 Condiciones de operación del isoelectroenfoque.

Programa 1	
Paso 1	Gradiente de voltios, 500 V, 0:30 Hr.
Paso 2	Gradiente de voltios, 1000 V, 0:30 Hr.
Paso 3	Gradiente de voltios, 6000 V, 0:30 Hr.
Paso 4	Voltios constantes, 6000 V, 8:00 Hr.
Paso 5	Voltios constantes, 1000 V, 1:00 Hr.

5.7.2 Separación de proteínas en una segunda dimensión

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

5.8 Análisis estadístico

Para el análisis de resultados del diseño factorial se realizó un ANOVA en el programa Minitab versión 2016 empleando una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05%.

6. Resultados y discusión

6.1 Micropropagación de *Stevia rebaudiana*

El establecimiento del cultivo de plántulas micropropagadas de *S. rebaudiana* se logró a partir de explantes de hoja colocados en medio de cultivo para generar brotes MS complementado con sacarosa 2% (p/v) con la adición de 1 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de IAA (Fig. 4 a y b). Se obtuvieron un promedio de 8 brotes por explante después de 15 días de siembra. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Laribi *et al.*, (2012) y Anbazhagan *et al.*, (2010), donde utilizan el mismo medio de cultivo, ellos reportan que el mayor número de brotes inducidos se obtiene a partir de explantes de segmentos nodales y hoja. De acuerdo con Razak *et al.*, (2014), el número máximo de brotes a partir de segmentos nodales fue observado en medio MS complementado con 0.5 mg/L de BAP y 0.25 mg/L de CIN (cinetina) después de cuatro semanas del cultivo. Tadhani *et al.*, (2006), reportó que el medio MS que contenía 0.6 mg/L de BAP induce el mayor número de brotes. Por otro lado, Sivaran y Mukunda, en el 2003, reportaron que el medio MS complementado con 2 mg/L de BAP y 1 mg/L de IAA obtenían el mayor número de brotes.

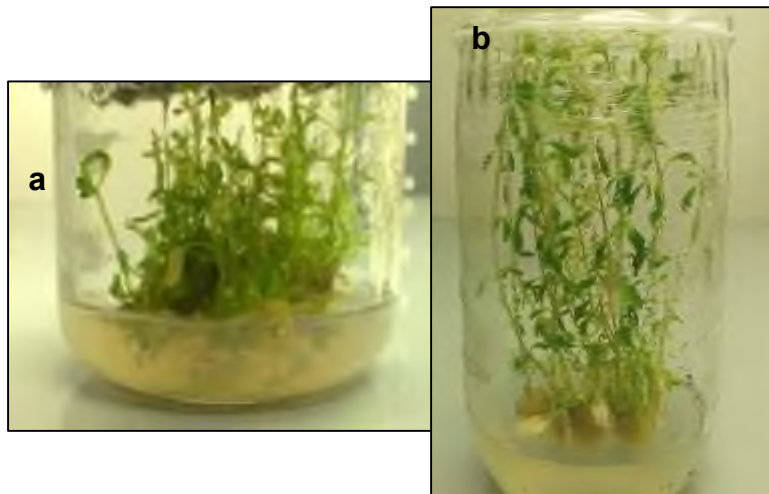


Fig. 4 Micropropagación de *Stevia rebaudiana* **a)** brotes de 15 días de edad y **b)** plántulas de 25 días de edad.

La inducción de raíces se obtuvo con el medio MS complementado con 2% (p/v) de sacarosa y 0.5 mg/L de IBA (Fig. 5). Nuestros resultados fueron similares a los reportados por Prieti *et al.*, (2011), cuando adicionaban 0.5 mg/L de IBA al medio MS observaron la mayor inducción de raíces. También, Razak *et al.*, (2014); Tadhani *et al.*, (2006); Sivaran y Mukunda, (2003), obtuvieron la mayor inducción de raíces con la adición de 1.0 mg/L de IBA. Por otro lado, Laribi *et al.*, (2012), observaron que con la adición de 0.5 mg/L de IAA inducían el mayor número de raíces.



Fig. 5 Inducción de raíces en brotes de *Stevia rebaudiana*.

6. 2 Cinéticas de elicitación con MeJa a plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*

6.2.1 Crecimiento y contenido total de clorofila

Los Jasmonatos, además de inducir el metabolismo secundario en las plantas, también están relacionados en los procesos fisiológicos como la senescencia, la apoptosis o muerte celular programada (Cheong y Choi, 2003; Wasternack, 2014). Esta respuesta fisiológica está directamente relacionada con la concentración y el tiempo de exposición al elicitor.

Las plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* después 24 h de exposición a las tres concentraciones de MeJa no presentaron daños físicos visibles (marchitamiento, amarillamiento y necrosis de hojas) (Fig. 6b, c y d), mientras que a las 72 y 120 h de exposición, con 25 μM de MeJa se presentó el menor daño físico (Fig. 6f y j) a diferencia de lo observado con 50 y 100 μM de MeJa (Fig. 6g, h, k y l), que presentaron daño físico visible (amarillamiento, marchitamiento y necrosis en hojas). Los tratamientos evaluados y los tiempos de exposición de las plántulas elicidadas no presentaron diferencia significativa en la acumulación de biomasa (crecimiento) (Fig. 7).

Se evaluó el contenido total de clorofila con la adición de 25, 50 y 100 μM de MeJa a los tres tiempos de exposición antes mencionados. Con la concentración de 25 μM de MeJa, durante los diferentes tiempos de exposición no se presentó diferencia en la acumulación de clorofila total (Fig. 8). A concentraciones de 50 y 100 μM después del tercer día de exposición el contenido total de clorofila disminuyó entre un 15 y 20%; al quinto día después de la elicitación se observó que el contenido disminuyó un 48.63 y 58.90% respectivamente, en comparación con los cultivos sin la adición de MeJa. Jung, (2004), observó que al asperjar 100 de μM de MeJa en plantas de *Arabidopsis thaliana*, el contenido total de clorofila a y b disminuyó hasta un 22% con respecto al control después de 7 días de exposición. Piotrowska *et al.*, (2009), reportaron que el contenido de clorofila a decrecía hasta un 70% en plantas acuáticas de *Wolffia arrhiza* al ser expuestas durante 14 días a 100 μM de MeJa. Por otro lado, Weidhase *et al.*, (1987), reportaron que la adición de 50 μM de AJ induce la senescencia en cultivo de células vegetales y hojas cortadas como respuesta hay disminución del contenido de clorofila, degradación de proteínas del cloroplasto y acumulación de nuevas proteínas.

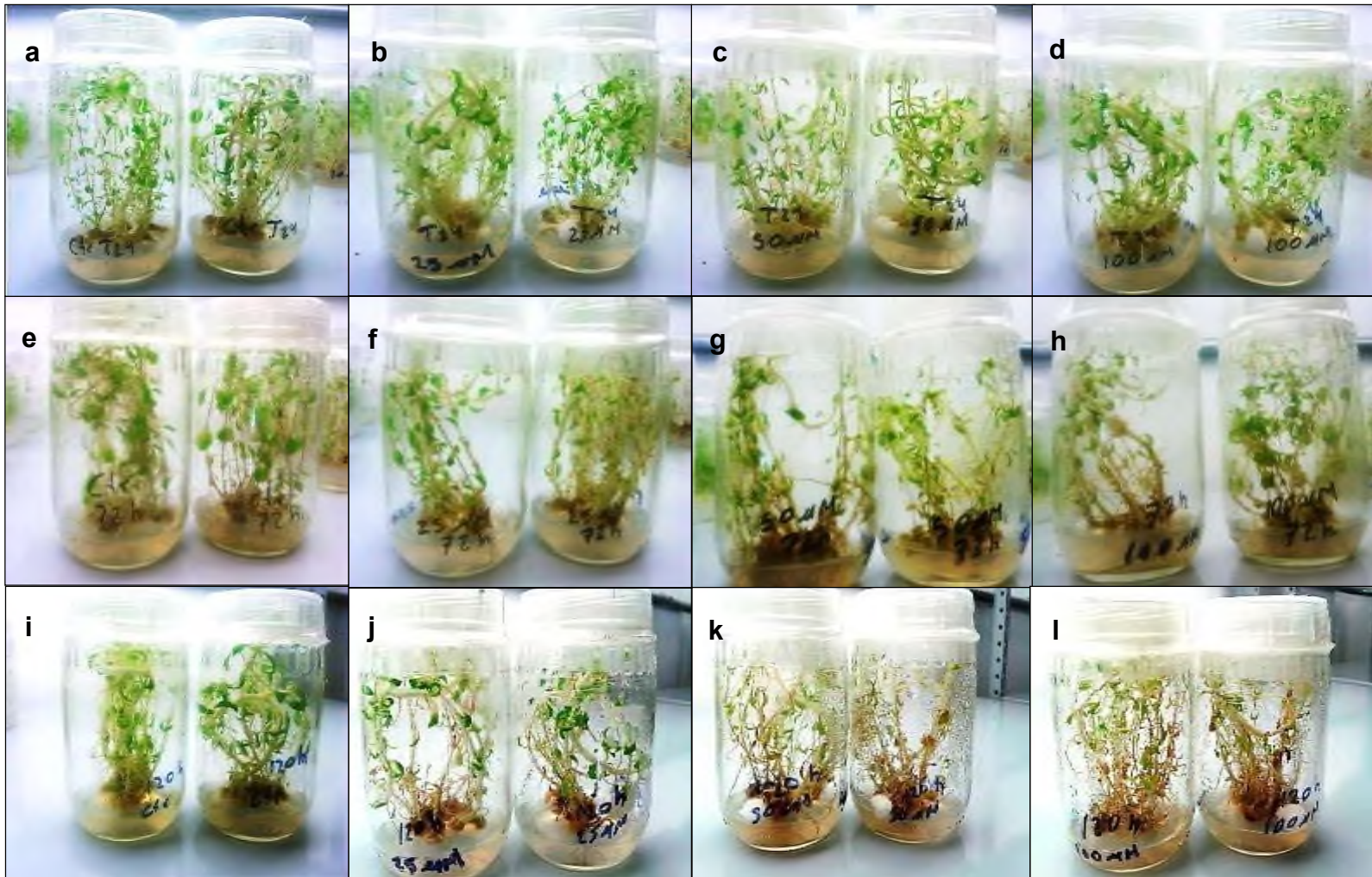


Fig. 6 Respuesta fisiológica en plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* elicidas con MeJa. Primer día: a) 0 b) 25 μ M c) 50 μ M y d) 100 μ M. Tercer día: e) 0 f) 25 μ M g) 50 μ M y h) 100 μ M. Quinto día: i) 0 j) 25 μ M k) 50 μ M y l) 100 μ M.

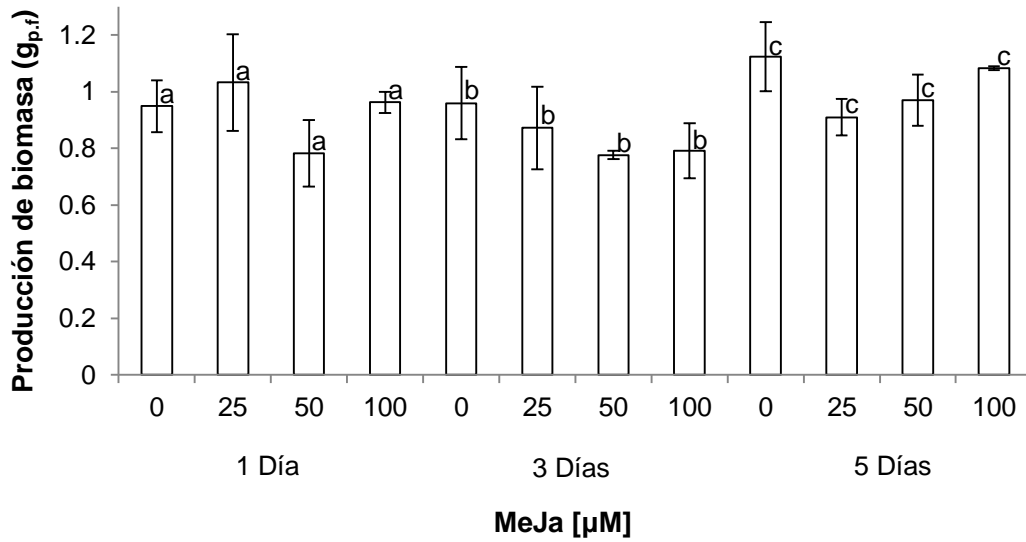


Fig. 7 Producción de biomasa en plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* elicidas con MeJa. Las letras iguales simbolizan que no hay diferencia significativa empleando una prueba de Tukey $P \leq 0.05$.

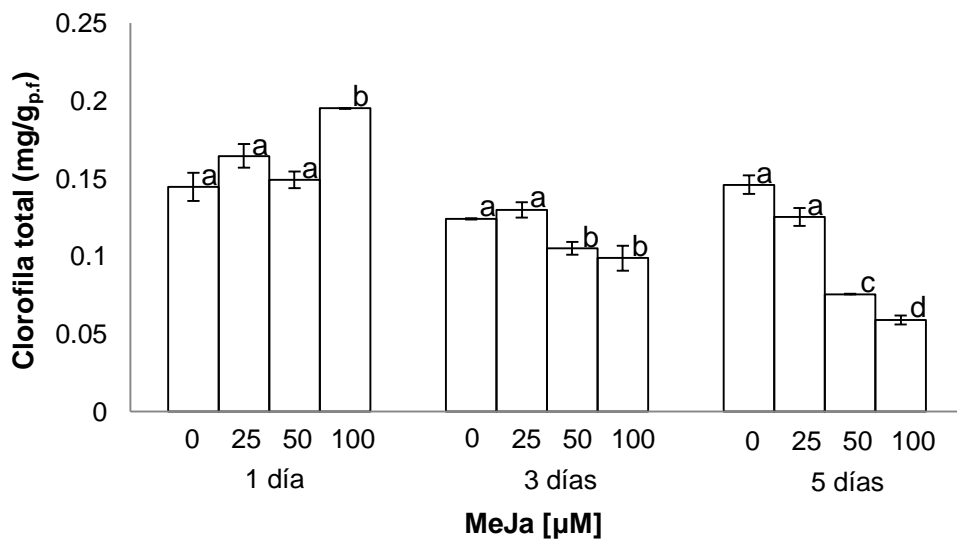


Fig. 8 Contenido total de clorofila en plantas micropropagadas de *S. rebaudiana* expuesta a MeJa. Letras iguales simbolizan que no hay diferencia significativa empleando una prueba de Tukey $P \leq 0.05$.

6.2.2 Acumulación de MetS

6.2.2.1 Glucósidos de esteviol

La adición de 25, 50 y 100 μM de MeJa después de 24 h de exposición incrementó la producción de Reb A en 1.72 (3.68 mg/g_{p.s}), 1.85 (3.95 mg/g_{p.s}), y 1.51 (3.28 mg/g_{p.s}) veces respectivamente, comparadas con las plántulas sin elicitar (2.14 mg/g_{p.s}). Se observó que a las 120 h de exposición al elicitor, la concentración de 25 μM incrementó 2.17 (3.73 mg/g_{p.s}), veces la producción de Reb A, con respecto a las plántulas no tratadas con MeJa (1.72 mg/g_{p.s}), mientras que la adición de 50 y 100 μM de MeJa estadísticamente no fueron diferentes (Fig. 9a). Se observó el mismo comportamiento en la producción de Est. (Fig. 9b). La concentración de 25 μM de MeJa incrementó el metabolismo secundario causando el menor daño físico a las plántulas.

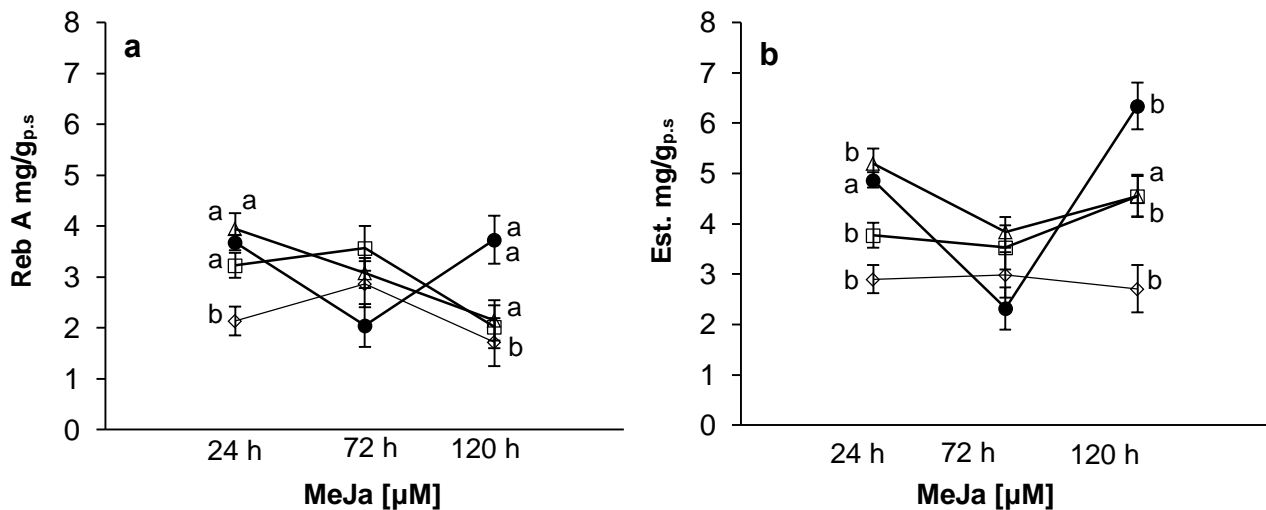


Fig. 9 Producción de GE. **a)** Reb A y **b)** Est. en plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* después de la adición de MeJa. 0 MeJa (\diamond), 25 μM MeJa (\bullet), 50 μM MeJa (Δ) y 100 μM MeJa (\square). La adición del elicitor se realizó a los 45 días del cultivo. Letras iguales significa que no hay diferencia significativa empleando una prueba de Tukey $P \leq 0.05$.

7.2.3 Cinética de elicitación con 25 μM de MeJa a plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*

7.2.3.1 Producción de GE

Las plántulas elicidadas con 25 μM de MeJa, en las primeras 6 h después de la adición, indujeron una rápida acumulación de GE. Durante las primeras 24 h se observó un incremento en la producción de GE de 1.31 a 1.75 veces, comparadas con las plántulas sin elicitar (Fig. 10). A las 96 y 120 h de exposición al elicitor la acumulación de GE se vio incrementada de 3.38 (8.86 mg/g_{p.s}), a 2 (7.87 mg/g_{p.s}), veces respectivamente, con respecto a las plántulas sin tratar (2.62 y 3.93 mg/g_{p.s}) (Fig. 10).

Una vez seleccionada la concentración y el tiempo de exposición, las plántulas se elicitaron con 25 μM de MeJa durante 24 h de exposición. Se observó un incremento en la producción de Reb A y Est. de 1.46 a 2.11 y 1.63 a 2.88 veces comparadas con sus controles, respectivamente (2.08 y 2.14 mg/g_{p.s}) y (2.37 y 2.90 mg/g_{p.s}) (Fig. 11).

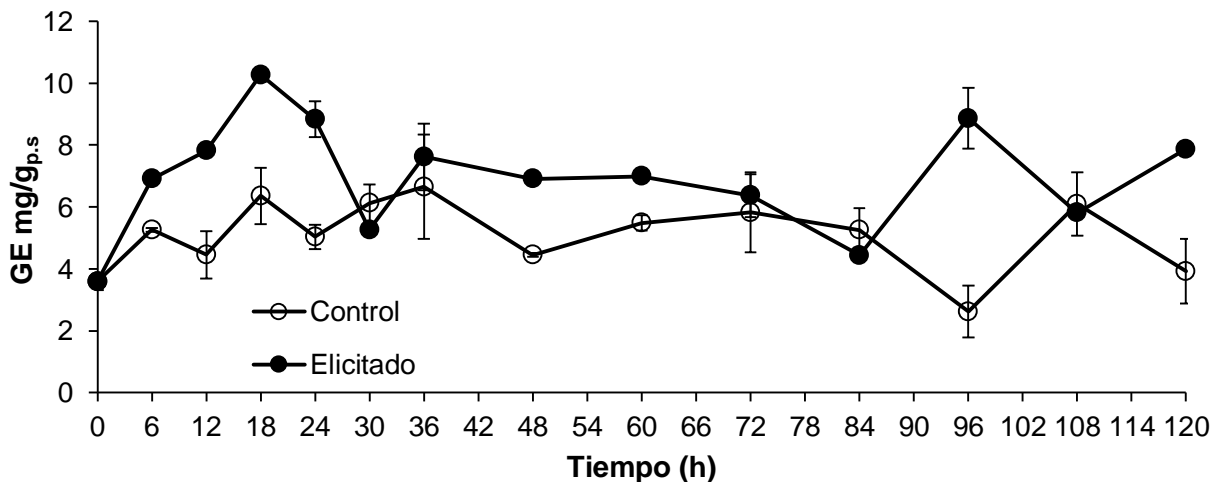


Fig. 10 Producción de GE en plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* expuestas a 25 μM de MeJa durante 120 h. En el gráfico cultivos sin tratamiento (\circ) y 25 μM de MeJa (\bullet). La elicitación se realizó a los 45 días de cultivo.

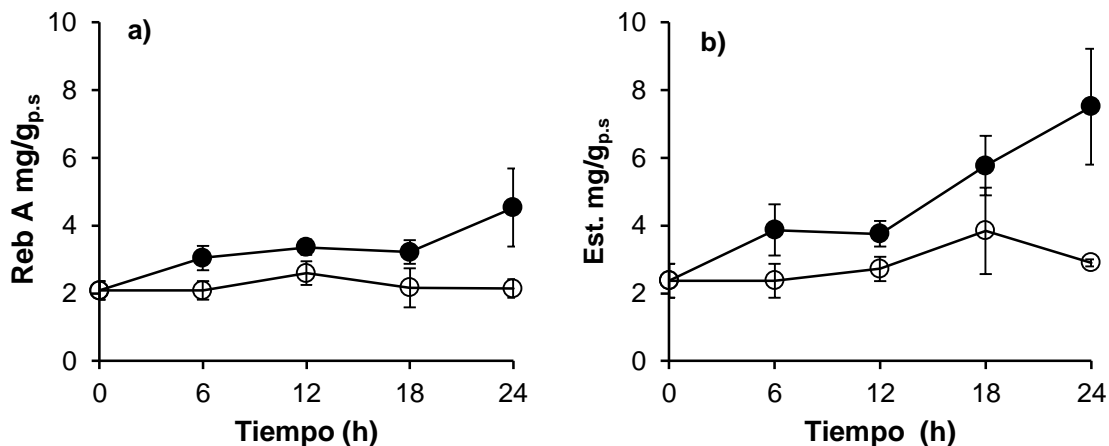


Fig. 11 Cinética de producción de GE a) Reb A, b) Est. en plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* elicidas con 25 μ M de MeJa durante 24 h. En el gráfico cultivos sin tratamiento (○) y 25 μ M de MeJa (●). La elicitación se realizó a los 45 días de cultivo, toma de muestra a las 6, 12, 18 y 24 h post-elicitación.

6.2.3.2 Fenoles totales

La acumulación de fenoles totales (FT) también se incrementó a partir de las 6 h después de la adición de 25 μ M de MeJa. Durante las primeras 36 h de exposición se aprecia una tendencia en el incremento de FT en 1.54 veces (6 h) y 1.82 veces (36 h), comparadas con el control (14.97 y 16.15 μ g EC/mg_{Ext}) respectivamente (Fig. 12), mientras que hasta las 120 h se observó un aumento de 2.44 veces (32.67 μ g EC/mg_{Ext}), con respecto al control (13.39 μ g EC/mg_{Ext}). Esta respuesta quizá se deba a que la planta ha activado toda su maquinaria biológica para regular el estrés oxidativo (Popova, 2013), siendo un indicador de que el MeJa está actuando como una molécula de señalización que activa la ruta de biosíntesis del metabolismo secundario para la homeostasis y supervivencia de la planta ante condiciones adversas (Pauwels *et al.*, 2009). Estos compuestos actúan como agentes antioxidantes, debido a que son los responsables de la eliminación de los radicales libres y las actividades antioxidantes en las plantas (Dey *et al.*, 2013).

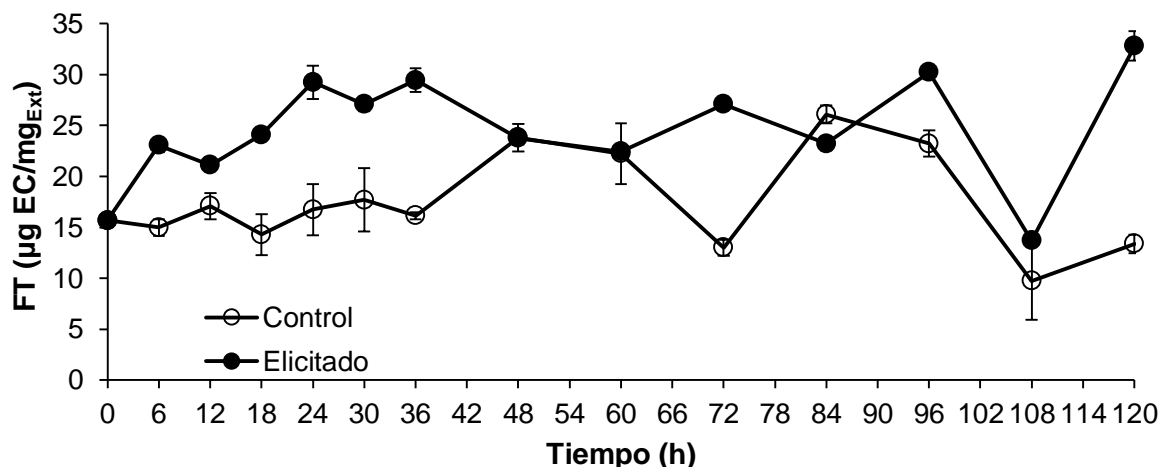


Fig. 12 Producción de FT en plántulas de *Stevia rebaudiana* durante 120 h de exposición a MeJa. En el gráfico cultivos sin tratamiento (○) y 25 µM de MeJa (●).

El MeJa es un elicitor universal utilizado para incrementar la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas (Zhao *et al.*, 2005). Algunos estudios de inducción del metabolismo secundario en plantas consideran dos factores principales, concentración y tiempo de exposición al elicitor. Grzegorkczyk y Wisokinska, (2009), evaluaron tres concentraciones de MeJa (20, 50 y 100 µM) y 4 tiempos de exposición (1, 3, 5 y 7 días) en brotes de *Salvia officinalis L* de 14 días de edad, obtuvieron la máxima producción de diterpenos (Carnosol y Ácido carnósico) a los tres días de exposición a 20 µM de MeJa, también observaron que la adición de 50 y 100 µM de MeJa disminuyó significativamente la concentración de diterpenos después de 5 días de exposición. Por otro lado, Kang *et al.*, (2004), obtuvieron resultados similares en cultivos de raíces de *Scopolia perviflora* de dos semanas, donde observaron la máxima producción de escopolamina con 1 mM de MeJa a las 12 h de exposición, mientras que 0.01 y 1 mM incrementaron la producción de Hiosciamina después de 24 h de exposición al elicitor. Por otro lado, en estudios previos realizados con plantas de *Stevia rebaudiana* de 6 meses de edad, Kumar *et al.*, en 2011, evaluaron la concentración de 100 µM de MeJa a un tiempo de exposición de 2, 4, 6 h en hojas del meristemo apical. En dicho trabajo se observó que no hubo sobreexpresión de genes relacionados con la biosíntesis de GE y concluyen que no debería incrementar la producción de GE, sin embargo, no hay datos sobre la cuantificación de dichos metabolitos.

6.3 Perfil proteómico de plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* elicitadas con MeJa.

Las plantas contienen diversos compuestos secundarios que interfieren en la extracción de proteínas y el análisis proteómico (Wu *et al.*, 2014). Por lo anterior, es esencial seleccionar el método más eficiente en la extracción de proteína total soluble (PTS). Antes de realizar el IEF se evaluaron diferentes metodologías de extracción de proteína, variando la biomasa utilizada y la cantidad de proteína recuperada (Tabla. 5). La metodología de TRI Reagent fue la más eficiente ya que se obtuvo la mayor cantidad de PTS en menor cantidad de tejido fresco con 2.87 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Además, mediante electroforesis (SDS-PAGE) se observaron bandas proteicas más definidas. Mientras que en las metodologías restantes se determinó mayor cantidad de proteína, pero al momento de realizar la electroforesis en una dimensión para corroborar cantidad las bandas proteicas no se definieron (Fig. 13). Esto puede ser debido a sobre estimación de la cantidad de proteína por el método utilizado ya que se utilizó Bradford (DC™ Protein Assay Kit II 5000112-Bio Rad) el cual utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu, mismo que se utiliza para cuantificar compuestos fenólicos. Posterior a eso, la metodología fue cambiada a Peterson.

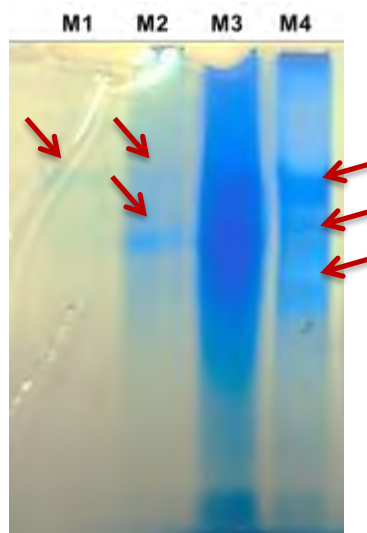


Fig. 13 Gel SDS PAGE al 12% con proteína total soluble utilizando diferentes metodologías de extracción. **M1)** TCA/Acetona/ β -Mercaptoetanol (0.07%); **M2)** Acetona/ β -Mercaptoetanol (0.07%); **M3)** Buffer de extracción y **M4)** TRI Reagent. Las flechas indican la presencia de bandas proteicas.

Tabla. 5 Metodología probada para la extracción de proteína total soluble de plántulas micro-propagadas de *Stevia rebaudiana*.

Metodología	Buffer de rehidratación	Concentración PTS
TCA/Acetona/β-Mercaptoetanol (0.07%) (1 g p.s)	BH	2.98 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Acetona/β-Mercaptoetanol (0.07%) (500 mg p.s)	BH + 2M Urea	2.03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
TCA/Acetona/β-Mercaptoetanol (0.07%) (500 mg p.s)	BH + 2M Urea	2.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Buffer de extracción (500 mg p.s) Tris-HCl 200 mM Sacarosa 200 mM EDTA 200 mM PMSF 1 mM Triton x 100 1% β-Mercaptoetanol 2%	BH + 2M Urea	6.13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
TRI Reagent (100 mg p.s)	BH+ 2M Thiourea	2.87 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Se evaluaron tiras con dos gradientes de pH inmovilizado (IPG) de 4-7 y de 3-10 de 7 cm de longitud. Los geles en dos dimensiones (2-D SDS PAGE) revelaron que las tiras de pH de 4-7 presentaban una mejor separación de las proteínas comparado con las de pH 3-10, ya que se observó mejor distribución de las proteínas en el gel (Fig. 14), por lo que se decidió realizar el isoelectroenfoque de las tiras de IPG (pH 4-7) con las muestras de proteínas provenientes del experimento a 25 μM de MeJa después de 6 h de exposición, esto debido a que la producción de MetS incrementó desde ese momento.

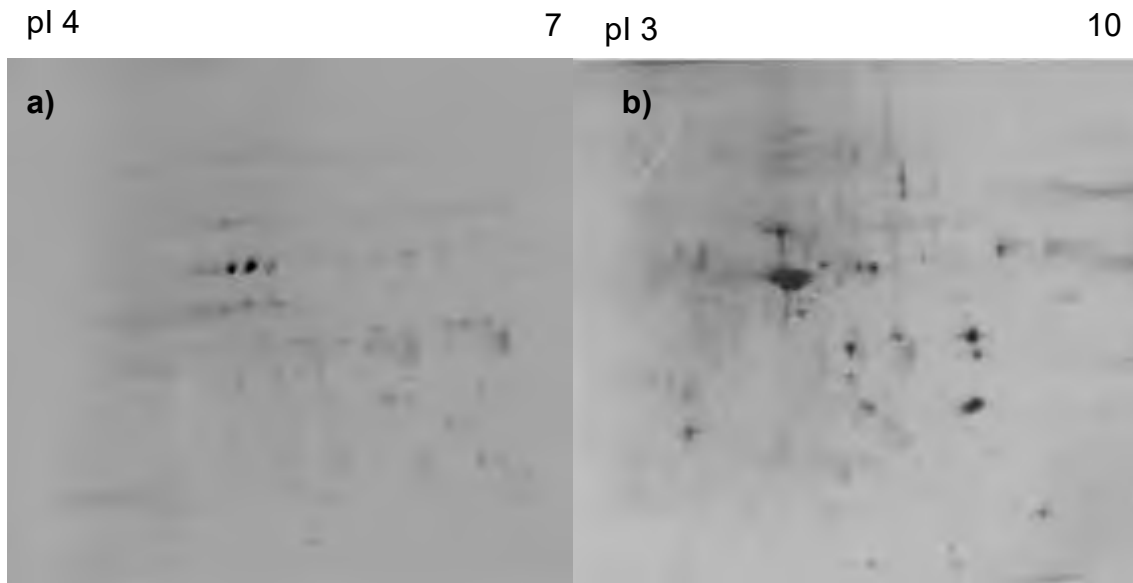


Fig. 14 Geles 2D (SDS-PAGE) de PTS de plántulas de *Stevia rebaudiana*. Las proteínas fueron separadas en tiras IPG de 7cm con gradiente de **a)** pH 4 a 7 y **b)** pH 3 a 10. Los geles se tiñeron con SYPRO® Ruby.

Para realizar el análisis diferencial de proteínas, las imágenes fueron digitalizadas y convertidas a formato TIFF. Los geles fueron analizados con el Software Melanie 7, el cual permite la visualización y análisis de los geles. Para comparar la abundancia proteica en diferentes condiciones, los geles fueron traslapados (match). Este proceso representa uno de los puntos cruciales del análisis diferencial en cualquier proyecto de proteómica comparativa, ya que los geles no son idénticos. Los spots individuales en el patrón 2D fueron reconocidas por el software, al identificarlas le adicionó un número único llamado ID. Algunos spots no fueron identificados correctamente por el programa, por lo que fue necesaria su edición manual donde se eliminaron todas aquellas que no cumplían con una distribución de curva de Gauss al analizarse por 3D (Fig. 15).

Se eliminaron todos los spots que se adicionaron automáticamente y se localizaban en las esquinas de los geles debido a que en estas áreas la escala de grises era muy alta dando falsos positivos. Algunos spots fueron editados debido a que cuando se comparaban entre los geles no se definían correctamente como un spot o como un grupo. La edición fue mínima sólo en los spots falsos obvios detectados (Fig. 16).

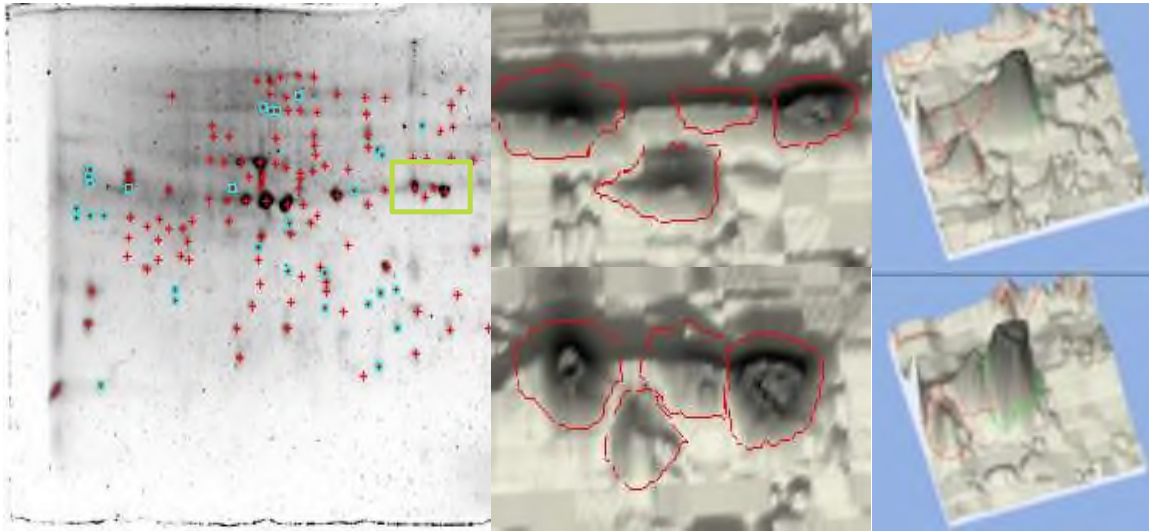


Fig.15 Identificación de manchas proteicas (spots) de un gel SDS-PAGE de proteínas de *S. rebaudiana*, analizadas con el software Melanie 7.

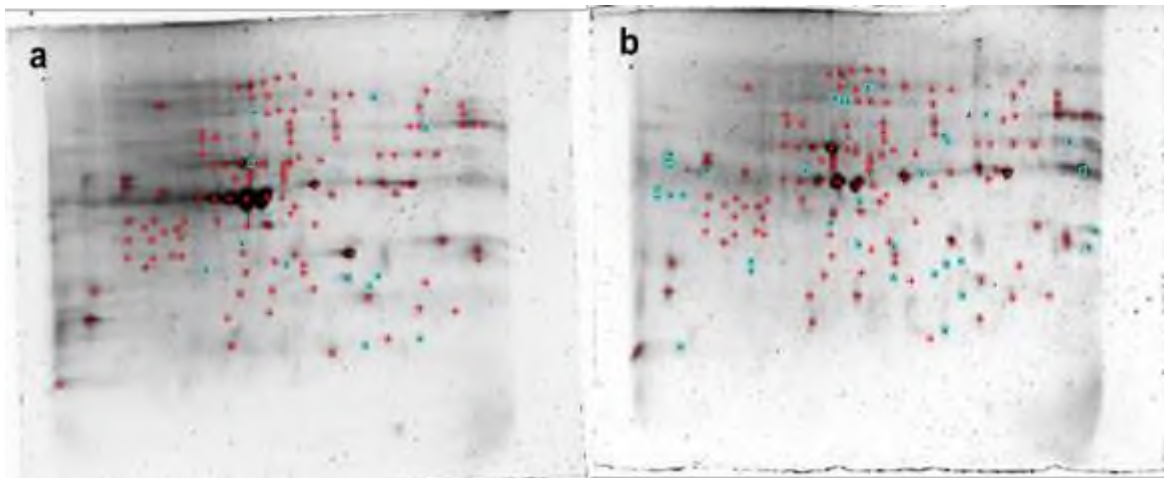


Fig. 16 Comparación de Geles 2D (SDS-PAGE) de plántulas de *S. rebaudiana* expuestas a MeJa. **a)** Control y **b)** elicidadas.

Los geles elicitados mostraron mayor cantidad (148) de proteínas que los geles control (Fig. 17) de las cuales 34 se expresaron diferencialmente con respecto de control. Chen *et al.*, (2011), en plantas de *A. thaliana* expuestas a MeJa, se encontraron 194 proteínas expresadas diferencialmente.

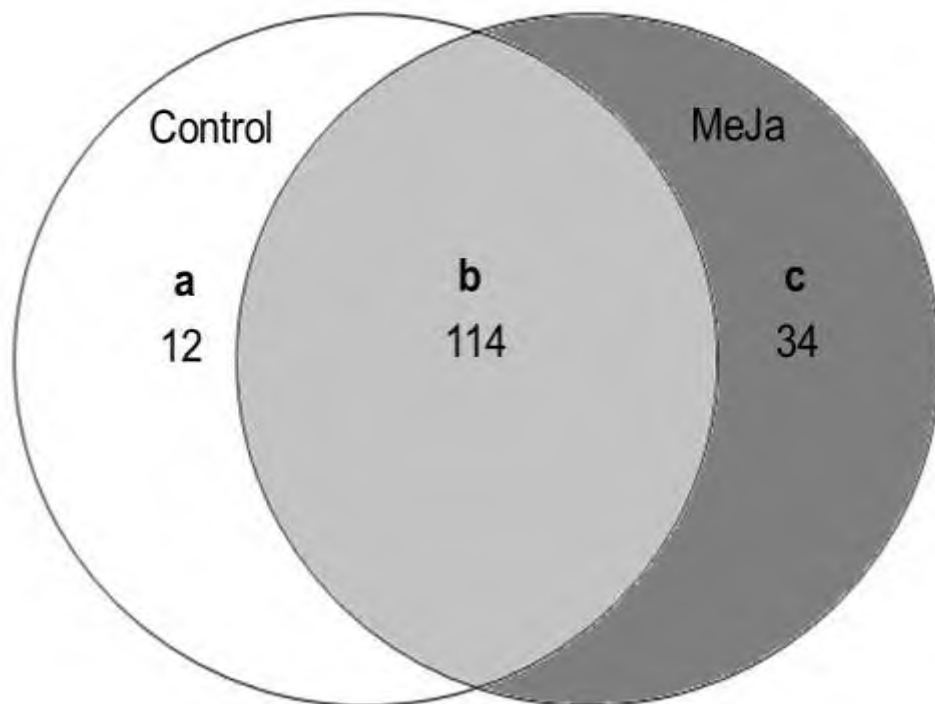


Fig. 17 Diagrama de Venn. Número de manchas proteicas detectadas en el gel 2-D de plántulas de *S. rebaudiana*. **a)** proteínas diferentes expresadas en el control, **b)** proteínas expresadas en ambos geles y **c)** proteínas diferentes expresadas después de la adición de MeJa.

6.3.1 Identificación de proteínas mediante bioinformática

La identificación de las proteínas presentes en el gel de 2-D se realizó por el punto isoeléctrico (pI) y peso molecular (PM) experimental de cada spot (Fig. 18), el valor asignado para cada mancha es la intersección entre el pI y el marcador de PM. Los spots presentes en el gel 2D-SDS PAGE fueron comparadas con las proteínas reportadas del proteoma de *Arabidopsis thaliana* (Chen *et al.*, 2011), *Oryza sativa* (arroz) (Li *et al.*, 2014), hojas de cítricos (Miserti *et al.*, 2011) y *Catharanthus roseus* (Ruiz *et al.*, 2011), expuesta a metil jasmonato. Se identificaron 69 proteínas involucradas en diferentes funciones bioquímicas en la planta (Tabla. 6).

Además, se realizó el multialineamiento (BLAST) de las proteínas involucradas en la ruta de biosíntesis del metabolismo secundario (MEP) con las reportadas en *A. thaliana*, dado que fue la especie con la que se encontró mayor similitud de proteínas en base al pI y PM experimental reportado por Chen *et al.*, 2011, y los generados en este trabajo de *S. rebaudiana*. Para considerar un buen alineamiento de secuencias se toma en cuenta el valor de expectativa (próximo o cercano a cero), número de gaps (menor número de huecos) y la identidad. En este estudio se consideró el valor de expectativa y la identidad mínima del 80%, puesto que se comparó con una especie diferente (Tabla. 7).

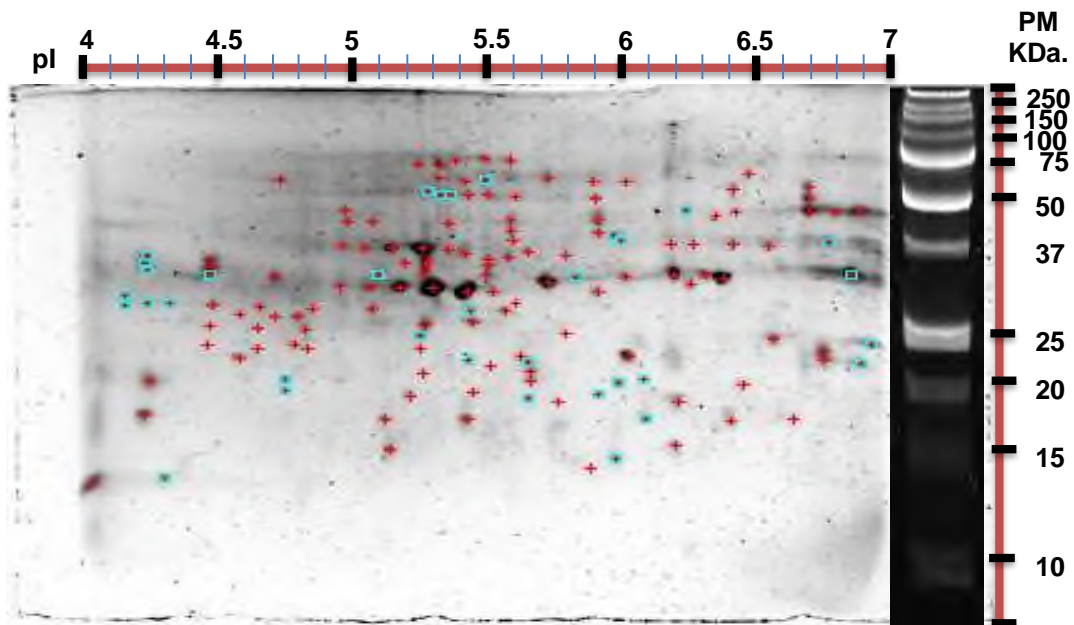


Fig. 18 Imagen 2-D para calcular el pI y PM experimental de extractos proteicos de plántulas micropropagadas de *S. rebaudiana*. Manchas rojas, proteínas expresadas en ambos geles y las manchas azules, proteínas presentes en el gel elicitado.

Tabla. 6 Posibles proteínas identificadas utilizando el pI y PM experimental del proteoma de 4 plantas (*A. thaliana*, arroz hoja de cítricos y *Catharanthus roseus*).

No. spot	Nombre de la proteína	Código de acceso Planta/ <i>Stevia</i>	pI/PM/ (Exp) En este trabajo	pI/PM (Exp) Publicado	Organismo identificado
Fotosíntesis					
6	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2, citosólica	Q7FAH2.1/ AGM31795.1	6.76/37	6.8/36	<i>O. sativa</i> / <i>A. thaliana</i>
50	Centro de reacción de Photosystem II Proteína de la familia PsbP	NP_565131.1	4.96/46	4.97/46.4	<i>A. thaliana</i>
53	Clorofila A / B proteína de unión 1	gi16374	4.96/37	4.95/36.1	<i>A. thaliana</i>
54	Clorofila A / B proteína de unión 1	gi16374	5.06/37	5.13/37.1	<i>A. thaliana</i>
56	Rubisco activasa	AAK96483.1	5.1/33	5.04/34.9	<i>A. thaliana</i>
57	Fotosistema II complejo envuelto con el oxígeno proteína 1 OEC 33 kDa	P23322	5.06/31	5.1/32	<i>Lycopersicon esculentum</i>
78	Rubisco precursor de la cadena larga	Q2QW49	5.13/17	5.2/18	<i>O. sativa</i>
80	Proteína Os07g0435300	Q0D6V8	5.43/18	5.4/18	<i>O. sativa</i>
81	Rubisco subunidad larga	gi1054917	5.45/19	5.37/19.1	<i>A. thaliana</i>
94	Fructosa-bisfosfato aldolasa, putativo	gi14334740	5.43/50	5.46/50.9	<i>A. thaliana</i>
96	Fructosa-bisfosfato aldolasa, putativo	gi18420348	5.6/50	5.56/51.5	<i>A. thaliana</i>
100	Rubisco activasa	gi15450379	5.9/50	5.95/51.2	<i>A. thaliana</i>
101	Fosfoglicerato kinasa 1	gi1022805	5.9/44.4	5.76/42.9	<i>A. thaliana</i>
103	Rubisco subunidad pequeña 2B	gi16194	6.0/37	6.05/36.6	<i>A. thaliana</i>

114	NADH deshidrogenasa I subunidad 1 (cloroplasto)	NP_051113.1 /AAN61797.1	5.66/19	5.69/19.46	<i>S. rebaudiana</i>
	Ribulosa-1,5-bisfosfato				
115	carboxilasa/oxigenasa subunidad 1	Q95633	5.8/18.5	5.8/18	<i>Brucea mollis</i>
	Ribulosa-1,5-bisfosfato				
120	carboxilasa/oxigenasa subunidad larga	Q95633	5.8/19	5.8/19	<i>Brucea mollis</i>
	Ribulosa-1,5-bisfosfato				
122	carboxilasa/oxigenasa subunidad corta	Q84LN2	6.1/20	6.0/21	<i>Citrus limón</i>
	Ferredoxina-NADP(H) Oxidoreductasa	Q6ZFJ3	6.26/31	6.3/31	<i>O. sativa</i>
142	Clorina 42	gi15233888	6.23/46.3	6.29/49.3	<i>A. thaliana</i>
146	Transketolasa, putativa	gi7329685	6.4/55	6.36/55.7	<i>A. thaliana</i>
147	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP)	gi66026	6.7/55	6.92/54.7	<i>A. thaliana</i>
Metabolismo de amino ácidos					
33	Metionina sintasa independiente de co- balamina	gi15238686	4.3/14	4.36/13.9	<i>A. thaliana</i>
58	Subunidad del proteasoma 20S α 6	AAN07899	5.06/29	5.07/29.85	<i>Nicotiana Benthiana</i>

61	Nitrito reductasa	gi15226573	5.4/72	5.35/69.4	<i>A. thaliana</i>
92	S-Adenosilmetionina sintetasa 2	Q96552	5.6/41.8	5.51/42.97	<i>Catharanthus roseus</i>
93	3 – isopropilmalato deshidratase subunidad grande IPMD	Q6Z702	5.6/46.7	5.5/48	<i>O. sativa</i>
97	Nitrito reductasa	gi15226573	5.5/72	5.77/72.6	<i>A. thaliana</i>
98	Ketol-ácido reductoisomerasa	gi288063	5.6/71	5.76/70.4	<i>A. thaliana</i>
106	Arginasa putativa	gi15236635	5.53/31	5.53/29.9	<i>A. thaliana</i>
Metabolismo de carbohidratos					
75	Alcohol deshidrogenasa 2	ABC56182	5.26/23	5.29/22.73	<i>Paeonia anomala</i>
99	Fructosa-bisfosfato aldolasa, putativa	gi15236768	5.73/52.5	5.78/54.7	<i>A. thaliana</i>
102	Beta anhidrasa carbónica 2	gi30685030	5.9/40.7	5.57/40.6	<i>A. thaliana</i>
135	Anhidrasa carbónica 1	gi30678347	6.3/33	6.35/35.3	<i>A. thaliana</i>
139	Malato deshidrogenasa	Q6F361	6.56/37	6.6/35	<i>Paeonia anomala</i>
Metabolismo de hormonas					
85	Allen óxido ciclasa 2	gi18404656	5.43/28	5.39/28.5	<i>A. thaliana</i>
110	Allen óxido ciclasa 2	gi18404656	5.63/23	5.64/24.6	<i>A. thaliana</i>
125	Allen óxido ciclasa 1	gi15227863	6.4/17	6.45/17.5	<i>A. thaliana</i>

Relacionados con la traducción

77	Factor de elongación P	Q2RBC6	5.2/19	5.1/19	<i>O. sativa</i>
137	Proteína fosfatasa 2C, putativa	gi18399423	6.26/37	6.02/40.4	<i>A. thaliana</i>

Proteínas de destino

91	Proteasoma 20S subunidad pab1	gi15219257	5.6/38	5.65/36.4	<i>A. thaliana</i>
-----------	-------------------------------	------------	--------	-----------	--------------------

Defensa y estrés

47	Proteína de choque térmico 26 K (HSP)	B9T1D5	4.83/23	4.8/23	<i>Ricinus communis</i>
64	Proteína hipotética	gi7485430	5.36/44.3	5.33/42.0	<i>A. thaliana</i>
82	Glutación peroxidasa EC 1.11.1.12 PHGPX	Q06652	5.43/22	5.4/23	<i>Citrus sinensis</i>
87	Ascorbato peroxidasa EC 1.11.1.11	Q6JRB8	5.5/32	5.5/31	<i>Ipomoea batatas</i>
90	Deshidroascorbato reductasa	gi15223576	5.6/35	5.64/32.3	<i>A. thaliana</i>
104	Ascorbato peroxidasa 1	NP_172267.1/	5.8/35	5.94/36.3	<i>A. thaliana</i>
107	NADPH- dependiente de la tiorredoxina reductasa B	/CAA43270.1 /Q6ZFU6	5.6/29	5.6/30	<i>O. sativa</i>
109	Superoxido dismutasa EC 1.15.1.1	Q38PL3	5.8/25	5.8/24	<i>Citrus limón</i>
123	Proteína tipo germin 4	gi1755154	6.03/23	6.14/23.2	<i>A. thaliana</i>

136	Cinamil alcohol deshidrogenasa EC 1.1.1.195	Q337Y2	6.2/37	6.2/38	<i>O. sativa</i>
141	Proteína de estrés inducida por la sequía cloroplástica de 32 kDa	gi15222954	6.36/44.4	6.04/42.2	<i>A. thaliana</i>
143	Fenilalanina (PAL)	P14717	6.0/59.3	6.1/ 57	<i>O. sativa</i>
Metabolismo secundario					
2	1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa		5.83/32	5.70/51.02	<i>S. rebaudiana</i>
3	1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa 2	ALJ30087.1	6.2/33	6.20/77.94	<i>S. rebaudiana</i>
4	1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa 1	ALJ30086.1	6.36/32	6.32/77.25	<i>S. rebaudiana</i>
5	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa	AAF61714.1 /ABB88837.2	6.8/35	6.62/34.95	<i>S. rebaudiana</i>
7	Geranilgeranil pirofosfato sintasa 2	NP_179960.1 /ALJ30094.1 AAG01340.1	6.7/46.3	6.56/40.33	<i>S. rebaudiana</i>
8	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol kinasa	/ABB88838.3	6.9/46.3	7.06/44.25	<i>S. rebaudiana</i>
9	UDP-glucosiltransferasa 85C2 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa	AAR06916.1 AAF65154.1/ NP_201085.1/ CAD22156.1	6.7/50	5.90/54.46 6.1/51.13	<i>S. rebaudiana</i> <i>Catharanthus</i> <i>roseus/arabi-</i> <i>dopsis</i>

10	Isopentenilpirofosfato/dimetilallil pirofosfato isomerasa 2	NP_186927.1/ ALJ30093.1	5.26/36	5.34/36.6	<i>S. rebaudiana</i>
11	UDP-glucosiltransferasa	AAN40684.1	5.16/36	5.17/53.21	<i>S. rebaudiana</i>
12	UDP-glucosiltransferasa 76G1	ACT33422.1	5.3/53	5.399/52.35	<i>S. rebaudiana</i>
13	UDP-glucosiltransferasa 74G1	AAR06920.1	5.33/50	5.37/51.4	<i>S. rebaudiana</i>
14	De-etiolado 3	NP_563916.1	5.5/59.4	5.48/61.1	<i>A. thaliana</i>
15	IPP/DMAPP sintasa	ABB88836.2	5.4/51	5.41/51.51/5.42/51.85	<i>S. rebaudiana</i>
19	Uridina ribohidrolasa 1 (URH1)	Q6ZJ05	4.7/33	4.7/33	<i>O. sativa</i>
86	Lactoilglutación liasa (Gly I)	Q948T6	5.43/31	5.3/31	<i>O. sativa</i>

Tabla. 7 Resultados del multialineamiento de secuencias de proteínas de *A. thaliana* y *S. rebaudiana*.

No. spot	Nombre de la proteína	Código de acceso	pI/PM	pI/PM	V. expectativa/% identidad
5	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa	AAF61714.1 /ABB88837.2	6.8/ 35	6.62/34. 95	2e-141/73
7	Geranilgeranil pirofosfato sintasa 2	NP_179960.1/ ALJ30094.1	6.7/46.3	6.56/40. 33	9e-127/65
8	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol kinasa	AAG01340.1 /ABB88838.3	6.9/ 46.3	7.06/ 44.25	0.0/76
9	1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa	AAF65154.1/ NP_201085.1/ CAD22156.1	6.7/ 50	6.1/ 51.13	0.0/83
10	Isopentenilpirofosfato/dimetil-llallil pirofosfato isomerasa 2	NP_186927.1/ ALJ30093.1	5.26/36	5.34/ 36.6	5e-150/83

La figura 19, se resume la posible función de las proteínas identificadas, donde se observa que existe un 18% de proteínas relacionadas con estrés y mecanismo de defensa y un 23% relacionado con el metabolismo secundario, en plántulas expuestas a MeJa.



Fig. 19 Clasificación de las proteínas expresadas diferencialmente en plántulas micropropagadas de *S. rebaudiana* expuestas a MeJa. Considerando las 69 proteínas identificadas como el 100%.

En la figura 20, se muestran las proteínas que se identificaron en base al multialineamiento de secuencias, las cuales están involucradas en la ruta de biosíntesis de GE.

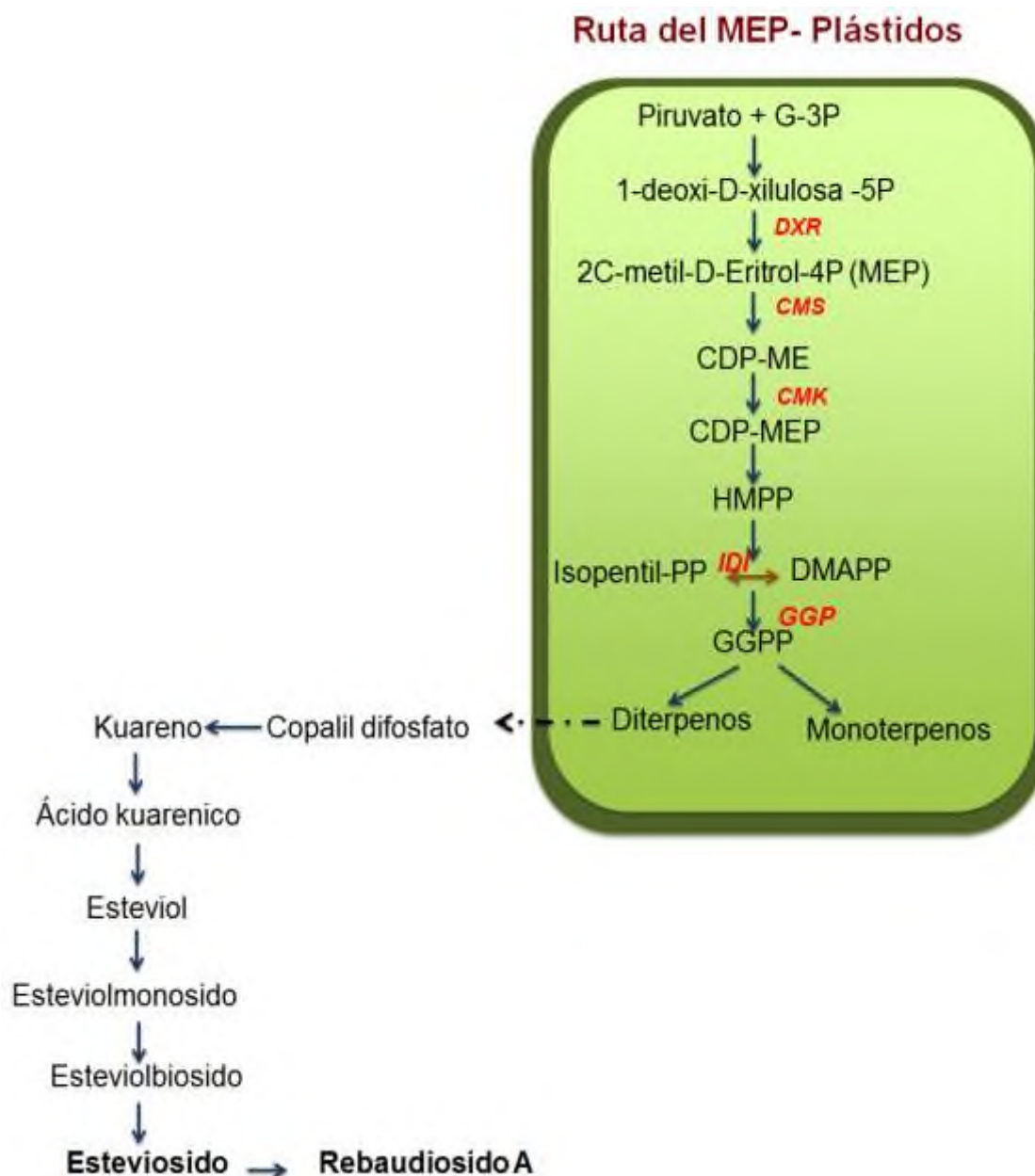


Fig. 20 Proteínas identificadas en el gel 2-D elicitado, que están involucradas en la ruta de biosíntesis de GE. **DXR** (1 deoxi-D-xilulosafosfocitidil reductoisomerasa), **CMS** (4-difosfocitidil-2-C- metil-D-eritritol sintasa), **CMK** (-4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol cinasa), **IDI** (isopentilpirofosfato/dimetilalilpirofosfato isomerasa), **GGP** (Geranil geranil pirofosfato sintasa).

7. Conclusiones

La activación del mecanismo de defensa por MeJa incrementó la acumulación de fenoles totales, los GE incrementaron independientemente de la concentración y tiempo de exposición al elicitor. El análisis proteómico, realizado por bioinformática pone en evidencia la sobreexpresión de proteínas involucradas con la ruta de biosíntesis de GE.

8. Recomendaciones

- Evaluar diferentes elicitores bióticos/abióticos y su efecto en la biosíntesis y producción de GE.
- Relacionar la producción de los GE con la actividad enzimática de enzimas relacionadas con su biosíntesis.

9. Referencias bibliográficas

Aghaei, K., & Komatsu, S. (2013). Crop and medicinal plants proteomics in response to salt stress. *Front Plant Sci*, 4(8), 1-9.

Álvarez-Robles, M. J., López-Orenes, A., Ferrer, M. A., & Calderón, A. A. (2016). Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* shoot cultures. *Industrial Crops and Products*, 87, 273-279.

Anbazhagan, M., Kalpana, M., Rajendran, R., Natarajan, V., & Dhanavel, D. (2010). *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 22(3), 216-222.

Aranda-González, I., Segura-Campos, M., Moguel-Ordoñez, Y., & Betancur-Ancona, D. (2014). *Stevia rebaudiana* Bertoni. Un potencial adyuvante en el tratamiento de la diabetes mellitus. *CyTA-Journal of Food*, 12(3), 218-226.

Baldi, A., Bisaria V. S., & Srivastava. (2007). Biotechnological approaches for the production of some promising plant-based chemotherapeutics. En: Kayser O, Quax W (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 117-156.

Bondarev, N., Nosov, A., & Reshetnyak, O. (2001). Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Science*, 161, 155-163.

Brandle, J. E., & Telmer, P. G. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68(14), 1855-1863.

Ceunen, S., & Geuns, J. M. (2013). Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function. *Journal of natural products*, 76(6), 1201-1228.

Ceunen, S., Compennolle, F., Mai, A. H., & Geuns, J. M. (2013). Diterpene glycosides from *Stevia phlebophylla* A. Gray. *Carbohydrate research*, 379, 1-6.

- Chatsudthipong, V., & Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & therapeutics*, 121(1), 41-54.
- Chen, Y., Pang, Q., Dai, S., Wang, Y., Chen, S., & Yan, X. (2011). Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Arabidopsis* in response to methyl jasmonate. *Journal of plant physiology*, 168(10), 995-1008.
- Cheong, J. J., & Do Choi, Y. (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*, 19(7), 409-413.
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual review of plant biology*, 48(1), 355-381.
- Creelman, R. A., Tierney, M. L., & Mullet, J. E. (1992). Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(11), 4938-4941.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23(4), 283-333.
- Dey, A., Kundu, S., Bandyopadhyay, A., & Bhattacharjee, A. (2013). Efficient micropropagation and chlorocholine chloride induced stevioside production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *C R Biol*, 336, 17-28.
- Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085-1097.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., & Turner, J. G. (2002). Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(10), 1025-1030.

- Gardana, C., Simonetti, P., Canzy, E., Zanchi, R., & Pietta, P. (2003). Metabolism of Stevioside and Rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *J. Agric. Food Chem*, 51, 6618-6622.
- Gaweł-Bęben, K., Bujak, T., Nizioł-Łukaszewska, Z., Antosiewicz, B., Jakubczyk, A., Karaś, M., & Rybczyńska, K. (2015). *Stevia rebaudiana* Bert. leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. *Molecules*, 20(4), 5468-5486.
- George, E. F., & Sherrington, P. D. (1984). Plant propagation by tissue culture. *Exegetics Ltd*, 1-709.
- Geuns, (2003). Cloning and heterologous expression of early genes in gibberellins and steviol biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Can. J. Bot*, 81(5), 517-522.
- Grzegorzczak, I., & wysokińska, H. (2009). The effect of methyl jasmonate on production of antioxidant compounds in shoot cultures of *Salvia officinalis* L. *Herba Pol*, 55, 238-243.
- Gupta, E., Purwar, S., Sundaram, S., & Rai, G. K. (2013). Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(46), 3343-3353.
- Gupta, P., Sharma, S., & Saxena, S. (2014). Effect of salts (NaCl and Na₂CO₃) on Callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* for Steviol glycoside production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(6), 2894-2906.
- Hadacek, F. (2002) Secondary metabolites as plant traits: Current assessments and future perspectives. *CRC Crit Rev Plant Sci*, 27, 273-322.
- Huerta-Heredia, A. A., Marín-López, R., Ponce-Noyola, T., Cerda-García-Rojas, C. M., Trejo-Tapia, G., & Ramos-Valdivia, A. C. (2009). Oxidative stress induces alkaloid production in *Uncaria tomentosa* root and cell cultures in bioreactors. *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 211-218.

Jacobs, D. I., Gaspari, M., van der Greef, J., van der Heijden, R., & Verpoorte, R. (2005). Proteome analysis of the medicinal plant *Catharanthus roseus*. *Planta*, 221(5), 690-704.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), "Steviol Glycosides," *Compendium of Food Additive Specifications, Monograph*, 10, 2010.

Jung, S. (2004). Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(3), 225-231.

Kempema, L. A., Cui, X., Holzer, F. M., & Walling, L. L. (2007). *Arabidopsis* transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology*, 143(2), 849-865.

Kreis, W. (2007). *In vitro* culturing techniques of medicinal plants. *Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications*, 157-185.

Kumar, H., & Kumar, S. (2013). A functional (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase exhibits diurnal regulation of expression in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene*, 527(1), 332-338.

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.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

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.

Lee, J. I., Kang, K. K., & Lee, E. U., (1979). Studies on new sweetening resource plant *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bert.) in Korea. I. Effects of transplanting date shifting by cutting and seeding dates on agronomic characteristics and dry leaf yields of *Stevia*. *Res. Rep. ORD*, 21, 171-179.

- Li, L., Li, C., Lee, G. I., & Howe, G. A. (2002). Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6416-6421.
- Lim, P. O., Kim, H. J., & Gil Nam, H. (2007). Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol*, 58, 115-136.
- Londhe, S. V., & Nanaware, S. M. (2013). HPTLC method for simultaneous analysis of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana*. *Journal of AOAC International*, 96(1), 24-26.
- Madan, S., Ahmad, S., Singh, G. N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R., & Garg, M. (2010). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni-a review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(3), 267-286.
- Mandal, S., Upadhyay, S., Singh, V. P., & Kapoor, R. (2015). Enhanced production of steviol glycosides in mycorrhizal plants: a concerted effect of arbuscular mycorrhizal symbiosis on transcription of biosynthetic genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 89, 100-106.
- Martin, D., Tholl, D., Gershenzon, J., & Bohlmann, J. (2002). Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant physiology*, 129(3), 1003-1018.
- Maserti, B. E., Del Carratore, R., Della Croce, C. M., Podda, A., Migheli, Q., Froelicher, Y. & Rossignol, M. (2011). Comparative analysis of proteome changes induced by the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* and methyl jasmonate in citrus leaves. *Journal of plant physiology*, 168(4), 392-402.
- Mathew, R., & Sankar, P. D. (2014). Comparison of major secondary metabolites quantified in elicited cell cultures, non-elicited cell cultures, callus cultures and field grown plants of *Ocimum*. *Int J Pharmacy and Pharmaceu Sci*, 6, 102-106.
- Modi, A. R., Raj, S., Kanani, P., Patel, A., & Narayanan, S. (2014). Analysis of differentially expressed genes involved in stevioside biosynthesis in cultures of *Stevia*

rebaudiana Bertoni treated with steviol as an immediate precursor. *Journal of plant growth regulation*, 33(3), 481-488.

Molina-Calle, M., Priego-Capote, F., & de Castro, M. L. (2017). Characterization of *Stevia* leaves by LC–QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts. *Food Chemistry*, 219, 329-338.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.

Namdari, N., Shooshtari, L., & Qaderi, A. (2015). *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *In Biological Forum*, 7(1), 1750-1754.

Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 69-79.

O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250, 4007-4021.

Ohta, M., Sasa, S., Inoue, A., Tamai, T., Fujita, I., Morita, K., & Matsuura, F. (2010). Characterization of novel steviol glycosides from leaves of *Stevia rebaudiana* Morita. *Journal of Applied Glycoscience* (Japan).

Pande, S. S., & Gupta, P. (2013). Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. *J Pharmacogn Phytother*, 5(1), 26-33.

Paul, S., Sengupta, S., Bandyopadhyay, T. K., & Bhattacharyya, A. (2012). Steviol-induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Nutrition and cancer*, 64(7), 1087-1094.

Pauwels, L., Inzé, D., & Goossens, A. (2009). Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in plant science*, 14(2), 87-91.

Piotrowska, A., Bajguz, A., Godlewska-Żyłkiewicz, B., Czerpak, R., & Kamińska, M. (2009). Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). *Environmental and experimental botany*, 66(3), 507-513.

Pól, J., Ostra, E. V., Karasek, P., Roth, M., Karolinka, *et al.*, (2007). Comparison of two different solvents employed for pressurized fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: Methanol versus water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 1847-1857.

Popova, L. P. (2013). Role of jasmonates in plant adaptation to stress. In *ecophysiology and responses of plants under salt stress*. Springer New York, 381-412.

Preethi, D., Sridhar, T. M., & Naidu, C. V. (2011). Efficient protocol for indirect shoot regeneration from leaf explants of *Stevia rebaudiana* (Bert.). An important calorie free biosweetener. *Journal of Phytology*, 3(5), 56-60.

Qureshi, M. I., Qadir, S., & Zolla, L. (2007). Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of plant physiology*, 164(10), 1239-1260.

Radman, R., Saez, T., Bucke, C., & Keshavarz, T. (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol Appl Biochem*, 37, 91-102.

Razak, U., Ong, C. B., Yu, T. S., & Lau, L. K. (2014). *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(1), 23-28.

Reis, R. V., Borges, A. P. P. L., Chierrito, T. P. C., de Souto, E. R., de Souza, L. M., Iacomini, M., & Gonçalves, R. A. C. (2011). Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(2), 329-335.

Rout, G. R., Samantaray, S., & Das, P. (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology advances*, 18(2), 91-120.

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

- Sepúlveda, J., G., Rocha, S., M., & Porta, D., H., (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 355-363.
- Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F., & Kaul, V. K. (2013). Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Complications*, 27(2), 103-113.
- Singh, S., Narender, S., & Sharuti, R. (2014). Influence of NaCl on biochemical parameters of two cultivars of *Stevia rebaudiana* regenerated *in vitro*. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10(2), 287-296.
- Sivaram, L., & Mukundan, U. (2003). *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(5), 520-523.
- Solecka, D. (1997). Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19(3), 257-268.
- Totté, N., Charon, L., Rohmer, M., Compennolle, F., Baboeuf, I., & Geuns, J. M. (2000). Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. *Tetrahedron Letters*, 41(33), 6407-6410.
- Ukiya, M., Sawada, S., Kikuchi, T., Kushi, Y., Fukatsu, M., & Akihisa, T. (2013). Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of steviol and isosteviol derivatives against human cancer cell lines. *Chemistry & biodiversity*, 10(2), 177-188.
- Van der Fits, L., & Memelink, J. (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*, 289(5477), 295-297.
- Vera-Reyes, I., Huerta-Heredia, A. A., Ponce-Noyola, T., Cerda-García-Rojas, C. M., Trejo-Tapia, G., & Ramos-Valdivia, A. C. (2015). Monoterpenoid indole alkaloids and phenols are required antioxidants in glutathione depleted *Uncaria tomentosa* root cultures. *Frontiers in Environmental Science*, 3(27), 118-128.

Verpoorte, R. (2000). Plant secondary metabolism, In metabolic engineering of plant secondary metabolism, R Verpoorte and A.W. Alfermann (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, *The Netherlands*, 1-29.

Wasternack, C. (2014). Jasmonates in plant growth and stress responses. in phytohormones: A window to metabolism, signaling and biotechnological applications. *Springer New York*, 221-263.

Wasternack, C., & Parthier, B. (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in plant Science*, 2(8), 302-307.

Weidhase, R. A., Lehmann, J., Kramell, H., Sembdner, G., & Parthier, B. (1987). Degradation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methylester, and counteraction by cytokinin. *Physiologia Plantarum*, 69(1), 161-166.

Wölwer-Rieck, U., May, B., Lankes, C., & Wüst, M. (2014). Methylerythritol and mevalonate pathway contributions to biosynthesis of mono-, sesqui-, and diterpenes in glandular trichomes and leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(11), 2428-2435.

Wu, X., Xiong, E., Wang, W., Scali, M., & Cresti, M. (2014). Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. *Nature protocols*, 9(2), 362-374.

Yang, Y., Huang, S., Han, Y., Yuan, H., Gu, C., & Wang, Z. (2015). Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 86, 174-180.

Zerbe, P., Hamberger, B., Yuen, M. M., Chiang, A., Sandhu, H. K., Madilao, L. L., & Bohlmann, J. (2013). Gene discovery of modular diterpene metabolism in nonmodel systems. *Plant physiology*, 162(2), 1073-1091.

Zhang, L., Zhu, W., Zhang, Y., Yang, B., Fu, Z., Li, X., & Tian, J. (2014). Proteomics analysis of *Mahonia bealei* leaves with induction of alkaloids via combinatorial peptide ligand libraries. *Journal of proteomics*, 110, 59-71.

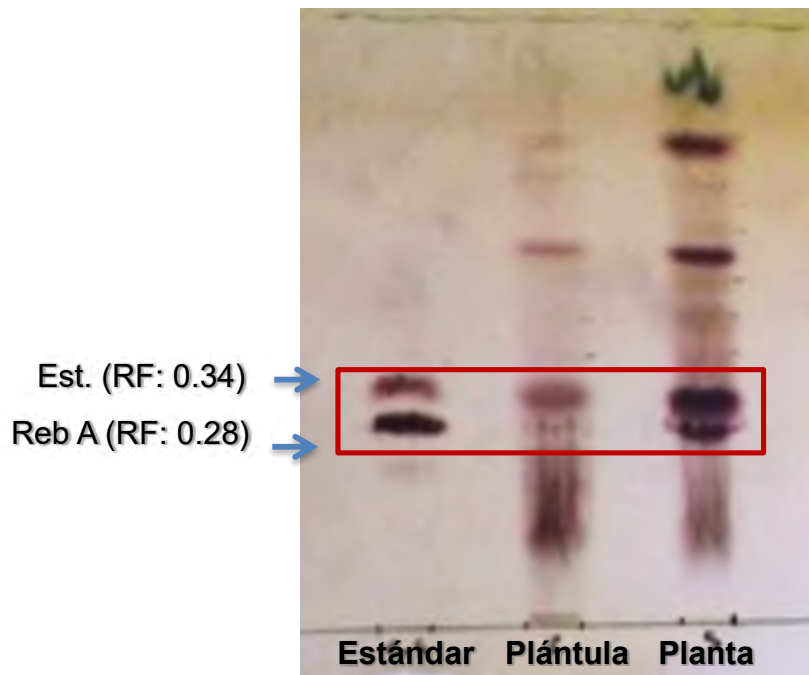
Zhao, J., L. Davis, R. Verpoorte. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.

10. Anexos

Materiales y métodos

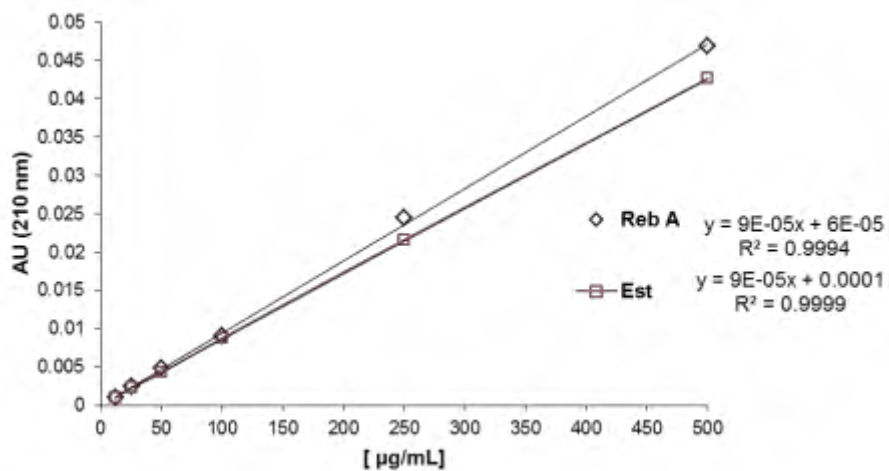
Sección 5.3.1

Identificación de glucósidos de esteviol en extractos de plántulas de *S. rebaudiana*.



Sección 5.3.2

Curva calibración de estándares de Reb A y Est.



Sección 5.4

Curva de calibración de catequina.

