



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Establecimiento de cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* con el plásmido binario pCAMBIA1105.1 y diseño de una estrategia de ingeniería metabólica para la modificación de la ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol

TESIS

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

**PRESENTA
Oscar Gregorio Ramírez**

**Director de Tesis
Dr. Edgar García López**

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



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/093
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 16 de mayo de 2018

C. OSCAR GREGORIO RAMÍREZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

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

Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	Presidente
Dr. Edgar García López	Cátedras CONACyT-UNPA	Vocal
Dr. Miguel Ángel Peña Rico	UNPA	Secretario
Dr. Julian Mario Peña Castro	UNPA	1er Suplente
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	Cátedras CONACyT-UNPA	2º Suplente

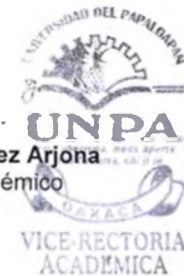
Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

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

Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado
DIVISION DE
ESTUDIOS DE
POSGRADO

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



C.c.p. Dr. Edgar García López – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

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

www.unpa.edu.mx

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



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/063
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 9 de julio de 2018

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

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro(a) en Biotecnología de **C. Oscar Gregorio Ramirez**, matrícula 15140005, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **"Establecimiento de cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* con el plásmido binario pAMBIA1105.1 y diseño de una estrategia de ingeniería metabólica para la modificación de la ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol"** para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

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

Atentamente

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

Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Oscar Gregorio Ramirez
C.c.p. Archivo

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

www.unpa.edu.mx

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

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Cultivo de Células Vegetales y de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la dirección del Dr. Edgar García López y con el apoyo del programa del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

DEDICATORIA

A Dios, mis padres y mis hermanos quienes han sido el pilar y el camino para poder resistir y llegar a este punto de mi carrera que con sus palabras de aliento y dedicación son ejemplos a que no bajara los brazos aún cuando todo se complicaba.

Para mi, tiene mucho valor el hecho de vivir ahora, en esta época. Aunque sea duro, aunque hayas tormentos, la felicidad para mi es vivir en el mismo tiempo junto a esas grandiosas personas con quienes comparto la alegría. En el pasado había enfado por la desgracia de mi vida, pero ahora agradezco a Dios por haberme dado la oportunidad de vivir en el momento preciso y ser partícipe de sus logros.

“Un poco más de persistencia, un poco más de esfuerzo y lo que parecía irremediamente un fracaso puede convertirse en un éxito glorioso”

Elbert Hunbbard

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edgar García López, por haberme aceptado en su equipo de investigación, y darme la confianza para desarrollar el trabajo de tesis, además por la orientación y la ayuda que me brindó para la realización de este proyecto.

Al Dr. Julián Mario Peña Castro, por haberme dado la oportunidad de trabajar nuevamente en el laboratorio de Biología molecular, y también por proporcionarme algunos equipos y reactivos para el proyecto.

A la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, por apoyarme en situaciones de dudas en el trabajo experimental y teórico, y por darme ánimo, asimismo por brindarme material para la elaboración del proyecto.

A la Dra. Sandra del Moral Ventura, Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Dr. José Abad Zavaleta, Dr. Víctor Meza Villalvazo y Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia, por compartir reactivos y equipos usados en el desarrollo del trabajo experimental.

A mis amigos Benjamín, Arturo, Teresa, Sara, Javier, Raque, Armando y David que estuvieron a un lado para ayudarme, aconsejarme, y por su amistad incondicional.

PRODUCTOS DE ESTE TRABAJO

Gregorio-Ramírez O, Huerta-Heredia A.A, García-López E. Modificación *in silico* de la enzima Isopentenil pirofosfato isomerasa 1 de *Stevia rebaudiana* útil para el estudio de regulación metabólica. III Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATx. Oral. Tlaxcala, Tlaxcala, México, 4-7 de diciembre de 2016.

Gregorio-Ramírez O, Huerta-Heredia A.A, García-López E. (2017) *In silico* modification of the isopentenyl pyrophosphate isomerase 1 enzyme from *Stevia rebaudiana* useful for metabolic regulation study. Mexican Journal of Biotechnology 2(2):161-168. ISSN:2448-6590.

RESUMEN

Stevia rebaudiana es una planta herbácea de importancia terapéutica, comúnmente empleada como fuente de edulcorantes y principalmente con propiedades anticancerígenas y antihipertensivas. Los Glucósidos de Esteviol (GEs) son producidos en *S. rebaudiana* a partir de la ruta 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) usando bloques de isoprenoides como precursores. La vía MEP se lleva a cabo en el cloroplasto y actualmente se desconoce gran parte de su regulación y los mecanismos que dirigen los flujos metabólicos en puntos convergentes de rutas biosintéticas; uno de los puntos esenciales de regulación es el catalizado por la enzima Isopentenil pirofostafó isomerasa 1 (IPI1). El objetivo del presente trabajo fue el establecimiento de cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* con el plásmido binario pCAMBIA1105.1 y diseño de una estrategia de ingeniería metabólica para la modificación de la ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol. Para ello, se realizó la inserción del vector pCAMBIA1105.1, en tres cepas de *A. rhizogenes* (AR4, K599 y LBA9402), las cuales se movilizaron en plántulas de *S. rebaudiana* para obtener cultivos de raíces. Paralelamente, se realizó un diseño *in silico* y la modificación del gen que codifica la IPI1, para posteriormente realizar análisis de modelado por homología de la secuencia modificada en el servidor I-TASSER. Se logró establecer cultivos de raíces transformadas control a partir de plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana* con las cepas LBA9402, K599 y AR4 de *A. rhizogenes*, mostrando rasgos fenotípicos distintos a los cultivos no transformados. Sin embargo, se observó que la cepa LBA9402 mostró la mayor virulencia. El diseño *in silico* del gen IPI1 mostró seis cambios puntuales codónicos de la secuencia, la cual fue sintetizada y modelada en el servidor I-TASSER generando una estructura tridimensional hipotética. Con los resultados obtenidos en este trabajo se establecen las bases metodológicas para continuar hacia la transformación de *S. rebaudiana* con el gen IPI1 modificado, como propuesta para explorar el aumento de la síntesis de glucósidos de esteviol mediante ingeniería metabólica.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana is an herbaceous plant with therapeutic importance that is commonly used as a sweetener and mainly for its anticancer and antihypertensive properties. The steviol glucosides (SGs) are produced in *S. rebaudiana* through the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) using isoprenoid molecules as precursors. The MEP pathway occurs in the chloroplast and currently its regulation and mechanisms that direct the metabolic fluxes in crosstalk pathways remain largely unknown. One of its essential points of regulation is catalyzed by the Isopentenyl pyrophosphate isomerase 1 (IPI1). The goal of this work was the establishment of transformed roots cultures of *S. rebaudiana* with the pCAMBIA1105.1 plasmid, and designing a metabolic engineering strategy for modification of the SGs biosynthetic pathway. For that, it was performed the insertion of pCAMBIA1105.1 in three *A. rhizogenes* lines (AR4, K599 and LBA9402), which were then transformed into *S. rebaudiana* plantelets to obtain root cultures. In parallel, *in silico* designing and modification of the IPI1 codifying gene was performed. Finally, an analysis for modeling based on sequence homology of the modified sequence was done in the I-TASSER SERVER. With this, it was possible the establishment of control transformed roots from *in vitro* plantelets of *S. rebaudiana* with the *A. rhizogenes* lines LBA9402, K599 and AR4, showing phenotypic characteristics that differed from non-transformed lines. However, it was observed that LBA9402 rendered the highest virulence. The *in silico* design of IPI1 gen showed three puntual codonic changes. This sequence was synthetized and modeled using the I-TASSER server, generating a hypothetic tridimensional structure. With the results of this work there are established the methodological basis in order to continue to transformation of *S. rebaudiana* with a modified version of IPI1 and as a proposal to explore the improvement of EGs synthesis through metabolic engineering.

Contenido

RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES.....	3
2.1 STEVIA REBAUDIANA BERTONI Y LOS GLUCÓSIDOS DE ESTEVIOL	3
2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS HOJAS DE STEVIA	5
2.3 RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LOS GES	6
2.4 LA RELEVANCIA DE LA ENZIMA IPI1	9
2.5 INGENIERÍA METABÓLICA EN PLANTAS.....	11
2.6 BIOTECNOLOGÍA VEGETAL Y CULTIVO <i>IN VITRO</i>	14
2.7 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS	16
2.8 EL PROCESO DE AGROTRANSFORMACIÓN Y LA FORMACIÓN DE RAÍCES PILOSAS.....	17
2.9 RAÍCES TRANSFORMADAS	19
2.10 ESTUDIOS DE TRANSFORMACIÓN EN <i>S. REBAUDIANA</i> MEDIADA POR <i>A. RHIZOGENES</i>	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVO GENERAL.....	25
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
8.1 MATERIAL BIOLÓGICO	27
8.1.1 Material bacteriano	27
8.1.2 Material vegetal	27
8.2 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS	28
8.2.1 Medios de cultivo	28
8.2.2 Antibióticos	28
8.2.3 Transformación de células competentes	29
8.2.4 Transformación de tejido vegetal mediada por <i>A. rhizogenes</i>	29
8.3 ESTABLECIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE LOS CULTIVOS DE RAÍCES	30
8.3.1 Extracción de ADN genómico de raíces pilosas.....	30
8.3.2 Confirmación de la transformación de los cultivos de raíces por PCR.....	31
8.3.3 Electroforesis de productos de PCR.....	32
8.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.....	33
8.4.1 Plásmido base de expresión vegetal: pCAMBIA1105.1	33
8.4.2 Secuencia de nucleótidos de la Isopentenil pirofosfato isomerasa 1	34
8.4.3 Alineamientos múltiples y análisis filogenético de las IPI1	35
8.4.4 Análisis de uso codónico	35
8.4.5 Modelado de la estructura tridimensional	36
8.5 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN VEGETAL PCAMPIM	37

8.5.1	Obtención del vector pCAMBIA1105.1 linearizado.....	37
8.5.2	Ligación molecular.....	37
8.5.3	Transformación por choque térmico.....	38
8.5.4	Transformación por electroporación.....	38
8.5.5	Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina.....	39
8.5.6	Confirmación de la ligación y construcción del vector pCAMPIM por PCR y análisis de restricción.....	40
8.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	42
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
9.1	INDUCCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO PC1105.1.....	43
9.1.1	Transformación de <i>A. rhizogenes</i> K599, LBA9402 y AR4 con el vector pC1105.1.....	43
9.1.2	Propagación <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	45
9.1.3	Inducción de raíces presuntamente transformadas en <i>S. rebaudiana</i>	47
9.1.4	Confirmación de la transformación de los cultivos control.....	52
9.1.5	Establecimiento del cultivo de raíces transformadas en medio líquido.....	55
9.2	ANÁLISIS Y MODIFICACIÓN <i>IN SILICO</i> DE LA SECUENCIA DE LA ENZIMA IPI1.....	58
9.2.1	Análisis de homología de la secuencia de la enzima IPI1.....	58
9.2.2	Análisis y optimización de uso codónico de la secuencia de IPI1.....	61
9.2.3	Modelado tridimensional por homología de la IPI1 modificada.....	68
9.3	CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR QUIMÉRICO PCAMPIM.....	72
9.3.1	Ensamblaje <i>in silico</i> de los elementos de la construcción pCAMPIM.....	73
9.3.2	Clonación molecular de los elementos de la construcción pCAMPIM.....	76
9.3.2.1	Recuperación del vector de clonación pUC57-IDI1.....	76
9.3.2.2	Obtención del vector pC1105.1 linealizado.....	78
9.3.2.3	Electroporación de <i>E. coli</i> DH5 α con los productos de ligación.....	81
9.3.2.4	Transformación por choque térmico de células <i>Escherichia coli</i> One Shot con productos de ligación.....	82
9.4	ARTICULACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE LA ESTRATEGIA DE INGENIERÍA METABÓLICA PROPUESTA.....	88
10.	CONCLUSIONES.....	89
11.	PERSPECTIVAS.....	90
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la biosíntesis de glucósidos de esteviol que opera en diferentes compartimentos celulares de <i>Stevia rebaudiana</i> .	8
Figura 2. Esquema de las rutas metabólicas de 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato y kaureno.	8
Figura 3. Representación esquemática de la reacción química de la enzima IPI1.	10
Figura 4. Mecanismo de modulación en las vías metabólicas.	13
Figura 5. Representación de la transferencia del material genético para la transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> .	17
Figura 6. Estrategia experimental del proyecto para la transformación de <i>S. rebaudiana</i> y el planteamiento de la construcción del vector quimérico.	26
Figura 7. Representación esquemática del vector binario pCAMBIA1105.1.	34
Figura 8. Secuencia completa de gen IPI1 correspondiente a la ecuación de la enzima de las isomerasas. ID: A0MLT2-STERE.	34
Figura 9. Tabla de uso codónico de <i>S. rebaudiana</i> .	36
Figura 10. Plásmido pCAMPIM y posiciones de hibridación de los oligonucleótidos diseñados.	41
Figura 11. Muestras provenientes de la extracción del plásmido pC1105.1 de <i>E. coli</i> DH5 α .	43
Figura 12. Placas con medio LB-agar adicionadas con estreptomycinina como presión selectiva.	44
Figura 13. Extracciones de ADN plasmídico.	45
Figura 14. Etapas de la micropropagación de <i>S. rebaudiana</i> .	46
Figura 15. Plántulas infectadas con cepas de <i>A. rhizogenes</i> después de dos días.	48
Figura 16. Raíces putativas en medio MS después de 15 días de cultivo.	49
Figura 17. Propagación de raíces presuntamente transformadas de <i>Stevia rebaudiana</i> en medio semisólido.	51
Figura 18. Raíces presuntamente transformadas y visualización de su ADNg por electroforesis.	52
Figura 19. Amplificación de los fragmentos de los genes <i>rolB</i> y <i>rolD</i> en raíces transformadas de <i>S. rebaudiana</i> .	54
Figura 20. Cultivo en medio líquido de las raíces transformadas de <i>S. rebaudiana</i> .	56
Figura 21. Esquema general de la diferenciación de plastidios.	57
Figura 22. Alineamientos múltiples de la secuencia predicha de IPI1 con las secuencias de otras familias de plantas.	60
Figura 23. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de IPI1 original con la secuencia de tercera iteración de optimización.	63
Figura 24. Alineamiento de las secuencias proteicas de IPI1 original con la secuencia de tercera iteración de optimización.	64
Figura 25. Secuencia de IPI1 optimizada.	68
Figura 26. Principales estructuras 3D de referencia usadas en el modelado de IPI1 nativa y modificada.	69
Figura 27: Modelos estructurales de IPI1 nativa y modificada.	70
Figura 28. Disposición espacial de regiones conservadas involucradas en la unión de Mg $^{2+}$ en los modelos 3D predichos.	71
Figura 29. Gráficos <i>Ramachandran</i> de los modelos tridimensionales predichos.	72
Figura 30. Casete de expresión de IPI1 modificada.	74

Figura 31. Ensamblaje <i>in silico</i> del plásmido binario pC1105.1 con la secuencia modificada de IPI1 (pCAMPIM).....	75
Figura 32. Simulación del corrimiento electroforético de la digestión del vector pCAMPIM.	76
Figura 33. Análisis de restricción del vector pUC57-IPI1	78
Figura 34: Digestión del vector pCamSrDXS con <i>Nco</i> I y <i>Bgl</i> II.....	79
Figura 35. Geles de agarosa (1%) preparativos para la purificación de los fragmentos IPI1M y el vector binario pCAMBIA1105.1..	80
Figura 36. Placas con medio LB-agar adicionado con estreptomicina	82
Figura 37. Placas con medio LB-agar adicionado con estreptomicina	83
Figura 38: Caracterización de los plásmidos extraídos de colonias resultantes del proceso de transformación por choque térmico con el vector pCAMPIM..	84
Figura 39: Segunda ronda de análisis sobre los plásmidos extraídos de colonias resultantes del proceso de transformación por choque térmico con el vector pCAMPIM. .	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nombres químicos completos y fórmulas simplificadas de los principales GEs presentes en las hojas de <i>Stevia</i>	4
Tabla 2. Porcentaje de los principales constituyentes bioquímicos de las hojas de <i>Stevia</i> . 5	
Tabla 3. Enzimas que participan en la biosíntesis de glucósidos de esteviol en <i>Stevia rebaudiana</i> acompañadas del número de acceso a su registro en la base de datos Uniprot	9
Tabla 4. Metabolitos secundarios producidos a partir de cultivos de raíces transformadas.	20
Tabla 5. Soluciones base para la extracción por el método alcalino de plásmidos.	39
Tabla 6. Soluciones de aislamiento de plásmidos.	39
Tabla 7. Oligonucleótidos diseñados para la confirmación de ligación del vector pCAMPIM.	41
Tabla 8. Comparación del número de raíces emergidas después de 16 días, en la infección con las cepas K599.1, LBA9402.1 y AR4.1.	50
Tabla 9. Valores de CAI y %GC en la secuencia tras sucesivas iteraciones de optimización.	63
Tabla 10. Cuantificación espectrofotométrica de los productos purificados de gel.	81

ABREVIATURAS

CoA: Acetil Coenzima A

IPP: Isopentenil difosfato

GPP: geranil pirofosfato

FPP: farnesil pirofosfato

GGPP: geranil geranil pirofosfato

DXP: 1 deoxi-d-xilulosa-5-fosfato

MEP: 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato

IPI1: Isopentenil pirofosfato isomerasa 1

DXS: Deoxixilulosa 5-fosfato sintasa

ISAP: Isopentenil pirofosfato farnesil

GEs: Glucósidos de esteviol

HPS: 1-hidro-2-metil-2(E)-butenil 4-difosfato sintasa

HMBPP: hidroximetilbutenil pirofosfato

DXS: Deoxixilulosa 5-fosfato sintasa

DXR: Deoxixilulosa 5-fosfato reductoisomerasa

HDR: 1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenilo 4-difosfato reductasa

CDPS: Copalil difosfato sintasa

KS: kaureno sintasa

KO: kaureno oxidasa

KAH: Ácido kaurenico 13-hidroxilasa

KAH: kaurenoico 13-hidrolasa

GGDP: kaurenoico de geranilgenilo difosfato

1. INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta herbácea dicotiledónea perteneciente a la familia de las *Asteráceas*. Su sabor es dulce debido a que produce glucósidos de esteviol (GEs) que son edulcorantes naturales (Yadav *et al.*, 2012) cuya capacidad de dulzor en estado puro y cristalino puede ser de 300 a 450 veces mayor que el azúcar de caña (Goyal *et al.*, 2010; Wölwer-Rieck, 2012). Los GEs se sintetizan en el plastidio por la vía 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), a partir del ácido pirúvico y del gliceraldehído 3 fosfato (Kumar *et al.*, 2014). La ruta MEP es una de las vías fundamentales en las plantas que producen gran variedad de isoprenos esenciales (Jarma *et al.*, 2010). En dicha ruta, la enzima Isopentenil pirofosfato isomerasa 1 (IPI1), es fundamental en la regulación de la ruta, ya que actúa como modulador de la velocidad de reacción que cataliza a los isómeros electrofílicos Isopentenil difosfato (IPP) y Dimetil alil difosfato (DMAPP) (Durbecq *et al.*, 2001; Berthelot *et al.*, 2012) para la síntesis de nuevas moléculas naturales. De acuerdo a lo reportado por Phillips *et al.*, (2008), se menciona que la relación molar 3:1 (IPP:DMAPP) favorece la biosíntesis de geranil geranil fosfato, que conduce a la formación de los GEs.

De forma convencional, la ingeniería metabólica es el mejoramiento de las propiedades celulares de manera racional a través de cambios en las reacciones bioquímicas en la introducción de segmentos de ADN recombinante que constituyen el metabolismo celular (Mitchell *et al.*, 2012). Esta disciplina se ha encargado de facilitar la modificación de flujos metabólicos y regulación enzimática en la modulación de la expresión o en la inactivación de genes para redirigir el flujo de carbono y energía en la producción de compuestos naturales de interés (Zorrilla-López *et al.*, 2013), la mayoría de las veces para aumentar su producción, como por ejemplo los GEs de *S. rebaudiana*. Actualmente existen reportes donde se describe la aplicación de la ingeniería metabólica en plantas con el objetivo de generar nuevos compuestos (kyung *et al.*, 2015). Sin embargo, el modelado

metabólico puede predecir la capacidad biosintéticas y la regulación en plantas, permitiendo ajustar la eficiencia de producción de metabolitos secundarios.

2. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

2.1 *Stevia rebaudiana* Bertoni y los glucósidos de esteviol

Stevia es un pequeño arbusto subtropical que es miembro de la familia Asteráceas, tiene una altura aproximadamente de 1 metro, de hojas perennes, cuyo nombre científico es *Stevia rebaudiana* Bertoni (Jarma-Orozco *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2012). Es originario de Paraguay y Brasil, donde crece de manera silvestre y ha sido consumida por los nativos guaraníes desde antes del descubrimiento de América. Los ancestros de esa región lo llamaban ka´aHe´e, que significa yerba dulce u hojas de miel (Yadav *et al.*, 2012; Arpan *et al.*, 2013).

Este arbusto fue descubierto por los guaraníes, nativos de la zona de Amambay del nordeste de Paraguay. En el año 1887 fue estudiada por el botánico suizo Moisés Santiago Bertoni, detallando su sabor dulce, y posteriormente fue nombrada científicamente como *Stevia rebaudiana* en el año de 1905 por el químico Ovidio Rebaudi (Jarma-Orozco *et al.*, 2010). Con el transcurso del tiempo surgió un mayor interés e impacto en la explotación y en las investigaciones científicas con distintos fines biotecnológicos, debido a la composición química y los compuestos dulces (esteviósidos) de la planta (Goyal *et al.*, 2010).

Las hojas de *Stevia* se caracterizan por ser la parte más dulce de la planta debido a que es ahí donde se sintetizan principalmente los compuestos llamados GEs que le confieren esta característica; además posee distintas propiedades terapéuticas principalmente, como son mejoramiento de la hipertensión, tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 (Jarma-Orozco *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2012).

Los principales compuestos GEs de interés comercial son cuatro: esteviósido, rebaudiósido A, dulcósido A y rebaudiósido C (Tabla 1). Los primeros dos se

producen en mayor cantidad. El esteviósido posee la capacidad de dulzor que va de 250 a 300 veces más dulce que el azúcar de caña, mientras que el rebaudiósido A tiene mayor poder de dulzor de 350 a 450 veces, con bajo aporte de calorías, sin daños y sin efectos negativos en el ser humano (Goyal *et al.*, 2010; Wölwer-Rieck, 2012). Por otro lado, en menor cantidad se encuentran el rebaudiósido C y dulcósido A junto con estevolbiósido, rubusósido, rebaudiósido B, D, E y F (Jackson *et al.*, 2009).

Tabla 1. Nombres químicos completos y fórmulas simplificadas de los principales GEs presentes en las hojas de *Stevia* (Ministerio de Salud Secretaría de Políticas, Regulación e instituciones, 2009).

Nombre	Estructura química	Fórmula química	Peso Molecular (g/mol)
Esteviósido	13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil) oxi] ácido kaur-16-en-18-oico, β-D-glucopiranosil éster.	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	804.88
Rebaudiósido A	13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-3-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil) oxi] ácido kaur-6-en-8-oico, β-D-glucopiranosil éster.	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	967.03
Dulcósido A	13-[2-O-α-L-ramnopiranosil-β-D-glucopiranosil) oxi] ácido kaur-16-en-18-oico, β-D- glucopiranosil éster.	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	788.87
Rebaudiósido C	13-[(2-O-α-L-ramnopiranosil-3-O-β-D-glucopiranosil) oxi] ácido kaur-16-en-18-oico, β-D-glucopiranosil éster.	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	951.01

Los edulcorantes producidos por *Stevia* se encuentran en mayor concentración en las hojas, que en otros órganos, y son sintetizados en la ruta del ácido giberélico a partir de la ruta de ácido mevalónico, y también en la ruta MEP (Jarma-Orozco *et al.*, 2010). Los GEs en general son polvo blanco cristalino y está constituido por residuos de glucosa y genina que puede ser un ácido o alcohol (Brandle *et al.*, 2007). Además poseen un gran valor edulcorante, con distintas actividades como antiácida, cardiotónica, anticaries, propiedades antirotavirus, y efectos antihiper glucémicos e insulino trópicos que ayudan al tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 (Jarma-Orozco *et al.*, 2010). De acuerdo a lo reportado se

han definido diversas aplicaciones terapéuticas que poseen gran impacto en la sociedad actual.

2.2 Composición química de las hojas de *Stevia*

Las hojas de *Stevia* han sido evaluadas por su composición química y contenido de minerales, en base a peso seco, proteína, grasa, carbohidratos y contenido de ceniza (Tabla 2). Además mediante análisis cuantitativos y cualitativos, se ha determinado que el potasio, calcio, magnesio, fósforo, sodio y azufre son nutrientes que suministran la mayor parte de la energía metabólica, mientras que el cobre, cobalto, manganeso, zinc, selenio y molibdeno se necesitan en pequeñas dosis para llevar diferentes procesos bioquímicos y metabólicos del organismos (Jarma-Orozco *et al.*, 2010; Wölwer-Rieck, 2012).

Por otro lado, los análisis fitoquímicos de las hojas han demostrado que los compuestos polifenólicos presentes se encuentran en las concentraciones más elevadas, seguido de alcaloides, glucósidos, saponinas, esteroides, triterpenos y entre otros compuestos reductores (Tabla 2) (Tadhani *et al.*, 2007).

Tabla 2. Porcentaje de los principales constituyentes bioquímicos de las hojas de *Stevia* (Tadhani *et al.*, 2007).

Componentes	Valor (g/100g) Peso seco de la hoja
Carbohidratos	35.2
Proteínas	12.0 - 24.42
Lípidos	2.7 - 4.34
Ceniza	13.12
Esteviósido	4 -14
Rebaudiósido A	2 - 4
Rebaudiósido C	1 -2
Dulcósido A	0.4 – 0.7
Rebaudiósido D, E, F; esteviósido; rubusósido.	>0.4

Adicionalmente a la composición de GEs, se encuentran otros tipos de diterpenoides como manoil óxido, y esclareol labdano, ambos con propiedades terapéuticas (Kaushik *et al.*, 2010). Debido al contenido de proteínas que posee

esta planta, éstos permiten aumentar la capacidad de retención y atrapamiento de aceites, además éstas características le confieren ciertas particularidades para el uso como ingrediente en productos alimenticios (Savita *et al.*, 2004).

Con respecto a los esteviósidos, estos se caracterizan por ser edulcorantes naturales no nitrogenados, compuestos solamente de carbono, hidrogeno y oxígeno, siendo su fórmula química $C_{38}H_{60}O_{11}$ a diferencia de sacarosa cuya composición química es $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Vázquez, 2012).

2.3 Ruta de biosíntesis de los GEs

La ruta de biosíntesis de los glucósidos de esteviol opera principalmente en las hojas, tallos y de ahí son transportados a diversas partes de la planta (Kryvenki *et al.*, 2008). La biosíntesis se da por la misma ruta del ácido giberélico, en la que el ácido shiquímico da origen a muchos compuestos aromáticos, donde el acetato es precursor de los terpenos o isoprenoides por la ruta del acetato-mevalonato, y donde se encuentran los esteviósidos (Jarma-Orozco *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2014).

Otra ruta alternativa, llamada MEP, incluye el primer compuesto intermediario, la 1 deoxi-d-xilulosa-5-fosfato (DXP), que es formada a partir de los productos del catabolismo de la glucosa, piruvato y D-gliceraldehído-3-fosfato, por una tiamina sintasa difosfato-dependiente, en el espacio intermembranal del cloroplasto (Brandle *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2014) (Fig. 1).

La ruta de MEP se lleva a cabo en los plastidios, particularmente en los cloroplastos, y da lugar a la formación de IPP y DMAPP, que a su vez da inicio a la síntesis de mono, di y tretaterpenos (Jarma *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2014). La vía MEP se inicia con la reacción de condensación a partir del ácido pirúvico y del gliceraldehído 3 fosfato por la acción de la enzima 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) sintasa (DXS), generando el primer producto DXP (Kumar *et al.*, 2014). El

siguiente paso es la reducción de DXP por la acción catalítica de la enzima DXP reductoisomerasa (DXR) dando origen al MEP, que es considerado como el precursor limitante para la síntesis de los compuestos isoprenoides. Posteriormente, el MEP se convierte en hidroximetilbutenil pirofosfato (HMBPP), mediante la acción enzimática de la hidroximetilbutenil pirofosfato sintasa y por último es convertido en una mezcla, de proporciones variables de IPP y DMAPP, debido a la enzima HMBPP reductasa (León *et al.*, 2015).

Mientras que en la superficie del retículo endoplásmico son sintetizadas las moléculas de kaureno y del ácido kaurénico, donde se afirma que la hidroxilación del ácido kaurénico en la posición C13, cuyo punto de divergencia para obtener el producto de esteviol y las giberelinas. La reacción de hidroxilación, se introduce un grupo de hidroxilo (OH) en un compuesto reemplazado un átomo de hidrógeno donde requiere de NADPH y oxígeno proveniente de estroma, y que es catalizada por la enzima ácido kaurenoico 13-hidrolasa, para la formación de esteviol (Brandle *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2014).

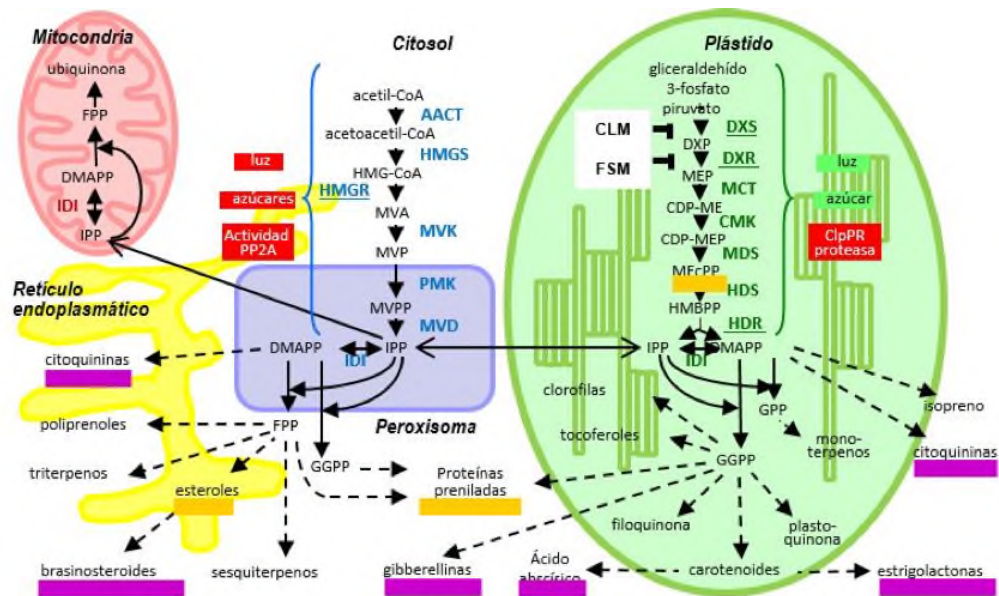


Figura 1. Esquema de la biosíntesis de glucósidos de esteviol que opera en diferentes compartimentos celulares de *Stevia rebaudiana* (Modificada por Brandle *et al.*, 2007).

La vía metabólica es catalizada por dieciséis enzimas específicas, las cuales intervienen en cada etapa de la ruta de glucósido de esteviol (Tabla 3).

Los primeros siete pasos sintetizan IPP y DMAPP conocidos por ser precursores para la biosíntesis de isoprenoides. Los siguientes cuatro pasos se involucran en la síntesis de ácido kaurenoico de geranilgeranil difosfato (GGDP). Los últimos cinco pasos restantes son específicos de la ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol, donde el ácido kaurenoico sufre una hidroxilación por el ácido kaurenoico 13-hidrolasa (KAH) para obtener el producto final de esteviol (Wanke *et al.*, 2001) (Fig.2).

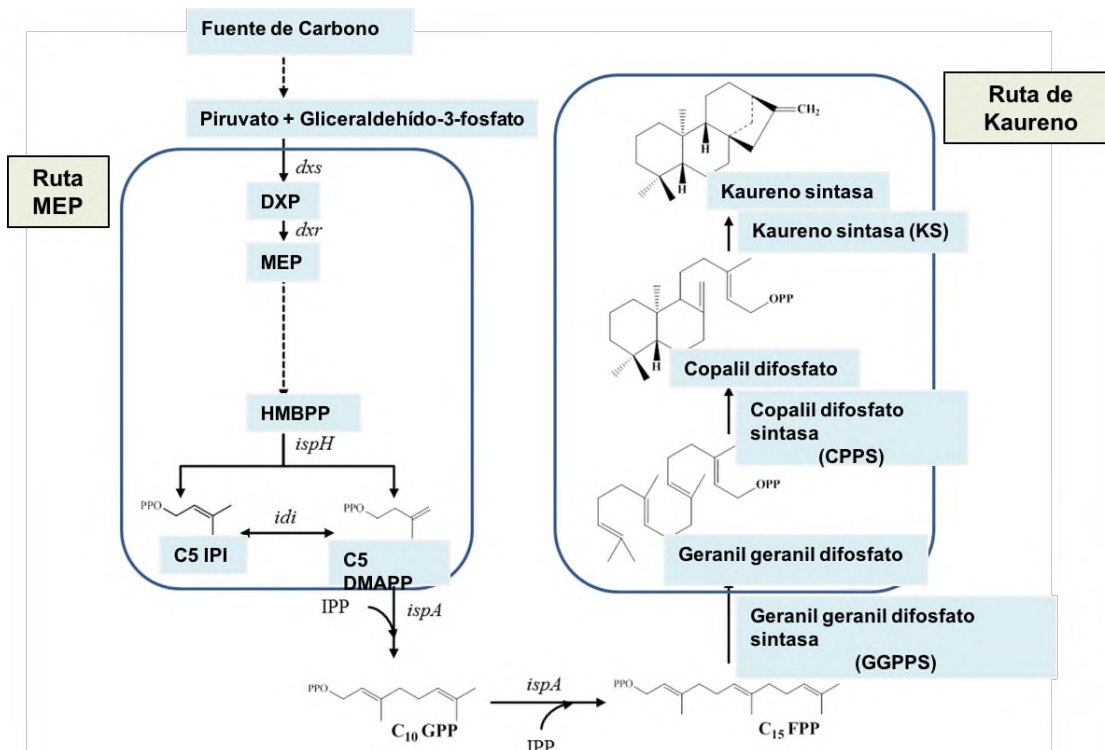


Figura 2. Esquema de las rutas metabólicas de 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato y kaureno (Modificada por Kyung Kong *et al.*, 2015).

Los cuatro pasos restantes de la biosíntesis de glucósidos son catalizados por UDP-glicosiltransferasas. De estas cuatro enzimas, solamente han sido identificadas tres de ellas UGT85C2, UGT74G1, y UGT76G (Brandle *et al.*, 2007 y Kumar *et al.*, 2014).

Tabla 3. Enzimas que participan en la biosíntesis de glucósidos de esteviol en *Stevia rebaudiana* acompañadas del número de acceso a su registro en la base de datos Uniprot (Modificada de Kumar *et al.*, 2014).

Nombre	Gen	No. de acceso
Deoxixilulosa 5-fosfato sintasa	DXS	AJ429232
Deoxixilulosa 5-fosfato reductoisomerasa	DXR	AJA29233
4-difosfocitidil 2-C-metil-D-eritritol sintasa	CMS	DQ269452
4-difosfocitidil 2-C-metil-D-eritritol kinasa	CMK	DQ631427
4-difosfocitidil 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa	MCS	DQ631427
1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenilo 4-difosfato sintasa	HDS	DQ768749
1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenilo 4-difosfato reductasa	HDR	DQ269451
Geranilgeranil difosfato sintasa	GGDPS	DQ432013
Copalil difosfato sintasa	CDPS	AF034545
Kaureno sintasa	KS	AF097310
Kaureno oxidasa	KO	AY364317
Ácido kaurenico 13-hidroxilasa*	KAH	-----
UDP Glicosiltransferasa	UGT85C2	AY345978
UDP Glicosiltransferasa	UGT74G1	AY345982
UDP Glicosiltransferasa	UGT76G1	AY345974

Nota: *La enzima ácido kaurenico 13-hidrolasa no se encuentra reportada hasta el momento en las bases de datos.

2.4 La relevancia de la enzima IPI1

La enzima IPI1 es clave en la regulación en la ruta metabólica y actúa como un modulador de la velocidad de la reacción que cataliza a los isómeros electrofílicos IPP y DMAPP (Durbecq *et al.*, 2001; Berthelot *et al.*, 2012) para la síntesis de nuevas moléculas naturales. Además, la IPI1 controla el equilibrio

molar entre IPP y DMAPP en una reacción reversible (Hunter, 2007) y da lugar a diversas moléculas como geranil pirofosfato (GPP), precursor de los monoterpenos; farnesil pirofosfato (FPP), precursor de los sesquiterpenos y este último, geranil geranil pirofosfato (GGPP), que conduce la formación de los diterpenos (Fig. 3). Además, en los diterpenos se localizan las giberelinas y fitol, moléculas de cadena abierta, que integran la estructura de las clorofilas (Durbecq *et al.*, 2001; Ávalos *et al.*, 2009; Berthelot *et al.*, 2012).

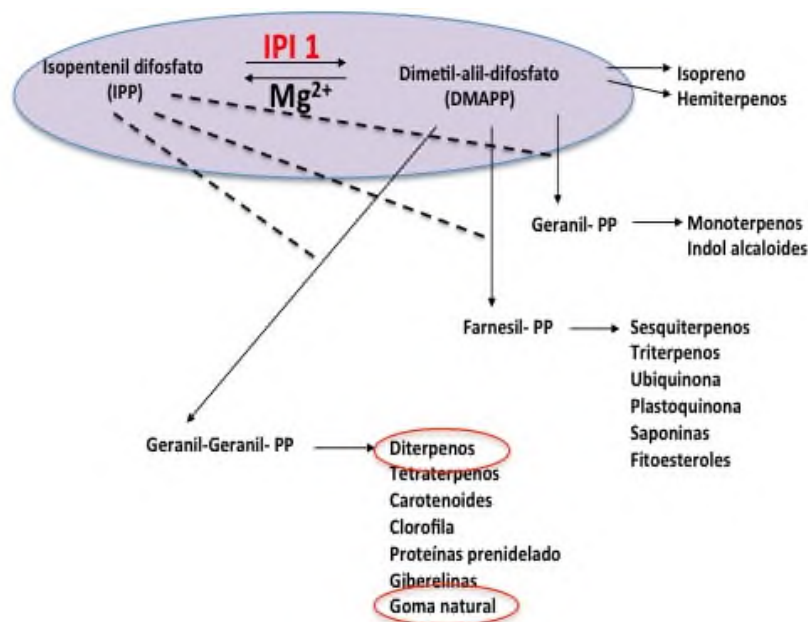


Figura 3. Representación esquemática de la reacción química de la enzima IPI1 (Modificada de Berthelot *et al.*, 2012).

La planta modelo *Arabidopsis thaliana* es una de las más estudiadas a nivel molecular y ha sido empleada en la ingeniería genética para la modificación parcial o total de algunos genes (Phillips *et al.*, 2008). En el 2008, se investigaron las capacidades que tienen las proteínas IPI1 e IPI2 en dicha planta, mostrando que ambas codifican proteínas con extensión N-terminal similar que tienen funciones de péptidos de tránsito y se expresan en todos los órganos. Además se demostró que la IPI1 está localizada principalmente en plastidios, mientras que IPI2 se encuentra principalmente en las mitocondrias (Phillips *et al.*, 2008). Con base a la investigaciones realizadas sobre las vías de biosíntesis de isoprenoides,

se sabe que la relación molar de IPP a DMAPP es fundamental y necesaria para la síntesis de varias clases de terpenoides; por ejemplo, la relación de 1:1 favorece la síntesis de monoterpenos, 1:2 sesquiterpenos y esteroides, 3:1 para diterpenos, carotenoides, mientras que proporciones mayores tienden a producir poliprenoides y politerpenos de cadena larga (Phillips *et al.*, 2008). Esta misma relación molar favorece la biosíntesis de geranil geranil fosfato, que conduce a la biosíntesis de los GEs (Phillips *et al.*, 2008; Garro-Monge *et al.*, 2014).

Por otro lado, en la planta *Eucommia ulmoides* Oliver (hule), el incremento del nivel de expresión de IPI inducido por sobre-expresión, incrementó el contenido total de transpoli-isoprenos, sugiriendo una importante regulación por parte de IPI. IPI cataliza la conversión de IPP y también al isómero electrofílico DMAPP, y es el primer paso para la biosíntesis de todos los isoprenoides y también los poli-isoprenos (Chen *et al.*, 2012).

Por otra parte, en la planta de *S. rebaudiana* se ha realizado estudios de la sobre-expresión de tres enzimas conocidas como 1-deoxyxylulosa-5-fosfato sintasa (DXS), difosfato sintasa (IspA) e Isopentenil difosfato sintasa, para aumentar el contenido de kaureno, el cual es responsable para la síntesis de edulcorantes naturales como es glucósidos de esteviol (Kyung *et al.*, 2015). En dicho trabajo, las enzimas se expresaron funcionalmente en la cepa MG1655 de *Escherichia coli*, obteniendo la producción más alta de kaureno (578 mg/L) con un rendimiento de 143.5 mg/g de peso de células secas (Kyung *et al.*, 2015).

2.5 Ingeniería metabólica en plantas

La ingeniería metabólica se define como el uso de la tecnología de ADN recombinante e ingeniería de proteínas para la modificación de flujos metabólicos y regulación enzimática, con la finalidad de mejorar o modificar las reacciones de alguna vía metabólica de organismos de interés, lo cual involucra la optimización del metabolismo y la introducción de nuevos componentes génicos, y por lo

general se lleva a cabo en bacterias, levaduras y plantas (Yang *et al.*, 1998; Cortés-Tolalpa *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2012).

La ingeniería metabólica utiliza diferentes técnicas experimentales y analíticas para determinar el flujo de rutas metabólicas. Una de las estrategias consiste en efectuar alteraciones en el metabolismo celular, haciendo uso de los conocimientos obtenidos de diversos campos multidisciplinarios, que han permitido la utilización de herramientas biotecnológicas para prolongar, ramificar y bloquear reacciones del metabolismo (Fig. 4), para mejorar, por ejemplo, el crecimiento celular, formación de producto y el control ejercido por enzimas específicas o grupos de enzimas sobre el flujo hacia determinadas rutas (Yang *et al.*, 1998).

Además, mediante la ingeniería metabólica es posible incrementar la velocidad del flujo metabólico debido a la expresión constitutiva, o sobreexpresión, de enzimas regulatorias claves o la neutralización de los mecanismos de retroalimentación por acumulación de producto (Mitchell *et al.*, 2012; Zorrila-López *et al.*, 2013).

Actualmente, los especialistas en ingeniería metabólica diseñan y modifican rutas metabólicas en plantas, mediante inserción de genes heterólogos, o edición genética mediante CRISPR-Cas9, con la perspectiva de generar principalmente aplicaciones a la producción de compuestos naturales con actividad biológica, biocombustibles, productos químicos, alimentarios, médicos (Zorrila-López *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017).

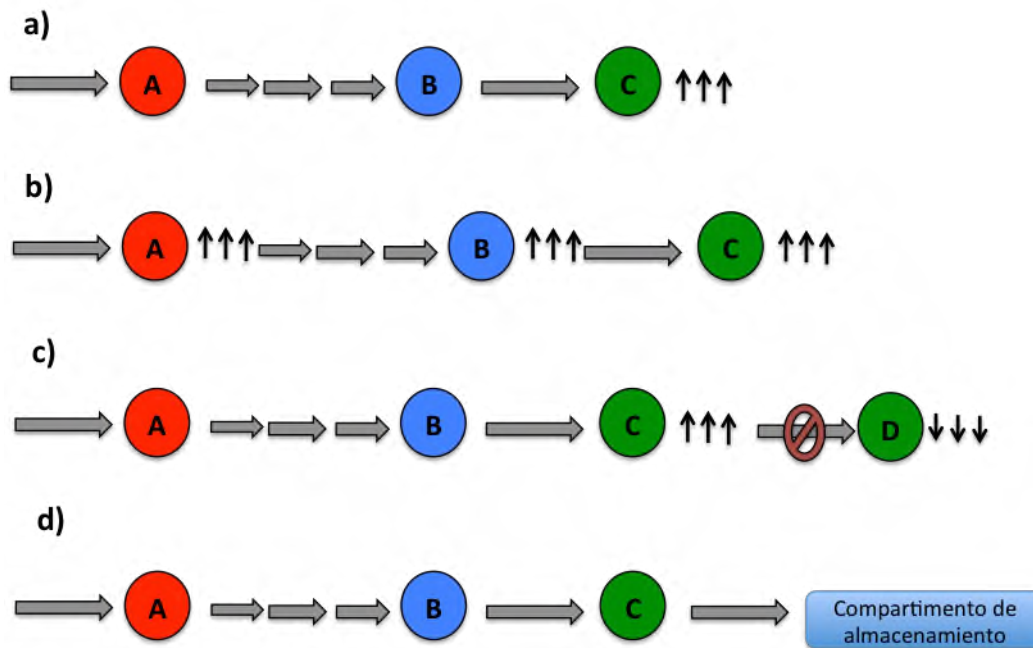


Figura 4. Mecanismo de modulación en las vías metabólicas. a) Incremento de la actividad enzimática para generar el producto. b) Sobre-expresión de los precursores en distintas enzimas control. c) Bloqueamiento por silenciamiento génico, donde participan los RNA de interferencia. d) Acumulación y generación de metabolitos mediante el aumento de compartimentos (Modificada de Zorrilla-López *et al.*, 2013).

Así, la posibilidad de modificar el metabolismo es el resultado del conocimiento actual sobre las reacciones bioquímicas que lo constituyen, como las enzimas que catalizan las reacciones y los genes que las codifican. De esta forma el metabolismo se puede ver como una red extensa y compleja de reacciones predecibles si se cuenta con la suficiente información sobre su funcionamiento (Mitchell *et al.*, 2012). En consecuencia, a menudo se necesitan herramientas moleculares específicas para llevar a cabo la modificación de manera precisa y elicitar el efecto deseado; una de estas herramientas es la transformación genética para movilizar los genes que dirigirán la modificación racional.

2.6 Biotecnología vegetal y cultivo *in vitro*

La biotecnología vegetal es una serie de técnicas y procesos que permiten el cultivo y modificación en el laboratorio de plantas o parte de ellas, como son células, tejidos u órganos, con el fin de multiplicarlas masivamente, mejorar su rendimiento y obtener productos útiles a partir de ellas (Levitus, 2010). Además, se tiene como importancia el mejoramiento y conservación de las plantas que sostienen la vida humana.

Los cultivos vegetales se cultivan asépticamente en medios artificiales de composición química definida, los cuales se incuban en condiciones controladas. La clasificación de las técnicas del cultivos de tejidos se lleva a cabo en dos grupos, el primero en medios de cultivo semisólidos y el segundo en medios de cultivo líquidos, los que pueden ser agitados o estacionarios (Vázquez, 2012). También es frecuente dividir al cultivo de tejidos en niveles de complejidad, como cultivos de órganos, cultivos celulares y cultivos de protoplastos.

El cultivo *in vitro* es una metodología de gran utilidad en la obtención de plantas transgénicas. De acuerdo a las técnicas empleadas se logra obtener plantas transgénicas con cierta capacidad de resistencia al ambiente o con elevada producción de metabolitos de interés científico. Las plantas pueden ser sometidas a diversas modificaciones; unas de ellas es la producción de raíces transformadas o raíces pilosas, con capacidad de obtener plantas completas genéticamente modificadas y viables, al igual que las raíces de las que derivan. Actualmente se cuenta con diferentes métodos y técnicas moleculares que permiten modificar a las plantas. Una de ellas es la utilización de *A. rhizogenes*, que posee una serie de ventajas importantes sobre *A. tumefaciens*, y que son los siguientes (Molphe-Balch *et al.*, 1999).

1. Los cultivos vegetales pueden regenerarse directamente de las raíces en cultivo o mediante su transferencia a un medio suplementado hormonalmente, evitando así la fase de callo.
2. La capacidad de la transformación y de la regeneración de las plantas transgénicas es altamente superior en el caso de *A. rhizogenes*.
3. Las plantas modificadas genéticamente se pueden lograr en ausencia de agentes selectivos, evitando así el uso de compuestos químicos en la selección, que suelen dar lugar a una inhibición de la regeneración de la parte aéreas.
4. Se obtienen elevadas tasas de cotransferencia de genes cuando se emplean vectores binarios en ausencia de selección.
5. A diferencia de lo que ocurre en la transformación con *A. tumefaciens*, donde se obtienen numerosos eventos de transformación falsos (falsos positivos), en el caso de *A. rhizogenes*, tras unos cuantos ciclos de cultivos de las raíces obtenidas, sólo se obtienen células transformadas.

La transformación mediante *A. rhizogenes* en plantas ha permitido acelerar la velocidad de transferencia de nuevos genes a especies vegetales, mientras que en el mejoramiento tradicional, el periodo de tiempo es más prolongado por la regeneración de tejidos u órganos vegetales (Levitus, 2010).

2.7 Transformación genética de plantas

En el caso particular de las plantas, existen muchos métodos de transformación genética, pero principalmente son tres los más utilizados para integrar genes foráneos (Smith, 2000). El primero es la electroporación, donde la entrada del ADN exógeno al protoplasto se consigue a través de una apertura transitoria de orificios en las membranas plasmáticas, permitiendo posteriormente la recombinación genética del ADN heterólogo en el genoma de la planta y en consecuencia su expresión.

El segundo método es la biobalística, cuya técnica consiste en la introducción directa de ADN desnudo en el interior de la célula. El ADN es previamente adherido por afinidad sobre microesferas de tungsteno o de oro que son proyectadas por un sistema propulsor que utiliza helio comprimido (Díaz *et al.*, 2012). Este método permite transformar tejidos procedentes de cualquier especie o variedad vegetal, aunque su especificidad de inserción y la eficiencia de transformación son poco reproducibles (Díaz *et al.*, 2012). Resulta particularmente útil si se cuenta con un protocolo adecuado de regeneración de los tejidos transformados.

El tercer método de transformación es mediado por el género *Agrobacterium*, y se caracteriza por la transferencia natural de ADN foráneo al genoma de las plantas infectadas, que además resulta en una transformación estable. El ADN transferido se expresa en el organismo blanco dando características genotípicas y fenotípicas particulares (Stanton, 2003; Tzfira *et al.*, 2006).

2.8 El proceso de agrotransformación y la formación de raíces pilosas

El proceso de transformación mediado por el género *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* y *rhizogenes*) es denominado agrotransformación. Dicho proceso de transformación, de manera general se divide en los siguiente pasos, de acuerdo a la figura 5: 1) reconocimiento químico del hospedero y activación de la expresión de los genes de virulencia, 2) reconocimiento físico en la interacción entre la bacteria y el hospedero, 3) producción de sustrato y transferencia de maquinaria, 4) transferencia de sustratos fuera de la bacteria hacia la célula hospedera, 5) movimiento de sustratos hacia el núcleo, 6) integración del ADN-T en el genoma de la célula hospedera, 7) expresión del ADN-T en el genoma de la célula vegetal figura 5 (Tzfira *et al.*, 2006; Espinosa *et al.*, 2012).

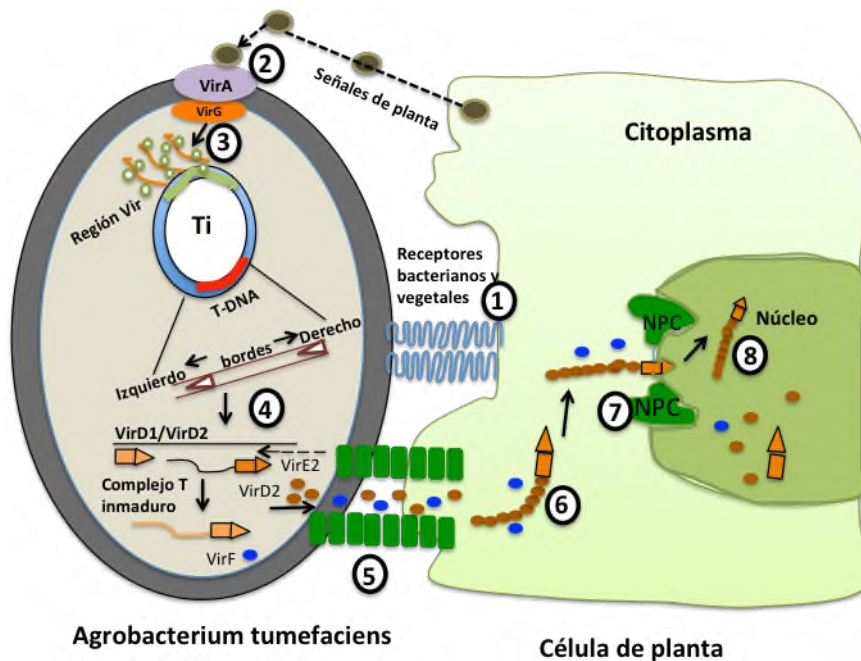


Figura 5. Representación de la transferencia del material genético para la transformación mediada por *Agrobacterium* (Modificada de Tzfira *et al.*, 2006).

Particularmente, *Agrobacterium rhizogenes* es una bacteria fitopatógena Gram negativa, habitante de la rizosfera y en los tallos, que afecta principalmente al grupo de las plantas dicotiledóneas y también a algunas monocotiledóneas o incluso gimnospermas, en las que desarrolla la enfermedad conocida como raíces pilosas cuando se encuentran en las condiciones propicias (Arya *et al.*, 2010). Esta enfermedad de raíces pilosas promueve la proliferación continua de crecimiento de raíces únicamente en el sitio infectado (Sheela *et al.*, 2011).

Las raíces pilosas, también conocidas como raíces transformadas o *hairy roots*, poseen abundantes pelos radicales y muestran una tasa de desarrollo muy superior a la de las raíces normales. Esto es debido a que *A. rhizogenes* posee un plásmido inductor de raíces (RI) (Molphe-Balch *et al.*, 1999; Sheela *et al.*, 2011).

Cuando las raíces transformadas son generadas en el laboratorio a través del cocultivo de *A. rhizogenes* con segmentos de tejido vegetal, son capaces de conservar esta alta capacidad de desarrollo cuando son cultivadas *in vitro*. Otra propiedad interesante desde el punto de vista biotecnológico, es que estas raíces pueden producir metabolitos secundarios en cantidades comparables a las plantas intactas (Sheela *et al.*, 2011).

De esta forma la ingeniería genética ha sido capaz de diseñar y generar cultivos *in vitro* y plantas transgénicas, usando el plásmido RI modificado y vectores desarmados ahora conocidos como plásmidos binarios, donde son integrados los genes con funciones especializadas. Es así como se obtienen nuevos modelos de plantas más sofisticadas con cierta capacidad y resistencia al entorno (Serna *et al.*, 2004).

El desarrollo de las plantas modificadas genéticamente por éstas nuevas tecnologías han dado lugar a la producción de grandes cantidades de proteínas heterólogas de importancia médica y alimentaria, con características similares a la proteína natural y de manera relativamente fácil y rápida (Shivanand *et al.*, 2010).

2.9 Raíces transformadas

La respuesta fisiológica de la expresión de los genes de virulencia movilizados por *A. rhizogenes* a especies vegetales es la formación de las raíces transformadas o también conocida como raíces pilosas, con abundante vellosidad, crecimiento ageotrópico y neoplásico de los sitios donde se llevó a cabo la infección. Actualmente, las raíces pilosas han sido de gran interés a nivel industrial, debido a su importancia en la aplicación de la biosíntesis de metabolitos secundarios y potenciar la producción de los mismos (Hu *et al.*, 2006; Srivastava y Srivastava, 2012).

El establecimiento de las raíces pilosas son relativamente fáciles de manipular, pueden ser escaladas a crecimientos en diferentes tipos de reactores desde un matraz hasta nivel industrial y además poseen la capacidad para sintetizar compuestos biológicamente activos que normalmente pueden sintetizar en órganos completos y no en células especializadas (Hu *et al.*, 2006).

En la siguiente Tabla 4, se presentan algunas especies vegetales que han sido exitosamente transformadas y estudiada para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios de interés farmacéuticos, cosméticos y aditivos alimentarios.

Tabla 4. Metabolitos secundarios producidos a partir de cultivos de raíces transformadas.

Especie	Metabolitos	Propiedades	Referencia
<i>Artemisia annua</i>	Artemisina	Antimalaria	Giri <i>et al.</i> , 2001
<i>Lithospermum canescens</i>	Naftoquinonas	Antitumorales	Syklowska <i>et al.</i> , 2011
<i>Nicotiana tabacum</i>	Alcaloides	Analgésicos	Zhao <i>et al.</i> , 2013
<i>Berberis aristata</i>	Berberina	Diabetes	Brijwal y Tamta, 2015
<i>Stevia rebaudiana</i>	Glucósidos	Edulcorantes	Zahar <i>et al.</i> , 2016
<i>Salvia runcinata</i>	Ácido octadecaenoico	Anti fúngico	Figlan <i>et al.</i> , 2017

2.10 Estudios de transformación en *S. rebaudiana* mediada por *A. rhizogenes*

S. rebaudiana ha sido estudiada ampliamente en la variedad silvestre, mientras que en la variedad modificada genéticamente actualmente existen pocos trabajos. A continuación se muestra algunas investigaciones relevantes: Fu *et al.*, (2014), utilizaron la cepa de C58C1 para estudiar la producción de ácido clorogénico y sus derivados de CADs en raíces transformadas de *S. rebaudiana*, debido a su gran importancia con efecto benéficos a la salud. Además en éstos raíces transformadas se encontraron tres metabolitos secundarios asociados al ácido clorogénico que fueron ácido 3-cafeoil-quínico (3-CQA), ácido 3-5-dicafeoil-quínico (3,5-CQA) y ácido 4-5 dicafeoil-quínico (4,5-CQA).

Abdy *et al.*, (2016), utilizaron cuatro cepas de *A. rhizogenes*, 15834, C58C1, GM y R1000, para transformación genética, empleando explantes de hojas de *S. rebaudiana*. Donde la mayor frecuencia de inducción de raíces se logró utilizando la cepa 15834 (aprox. 50%). La raíces aparecieron en los sitios de infección después de 18 días, posteriormente se trabajaron dos tratamientos, el primero se mantuvieron en oscuridad, y al analizarlas se observó que no se sintetizaban

esteviósido. En contraste con el segundo tratamiento, las raíces incubada en luz se tomaron color verde y acumularon esteviósido, 18.67 mg de peso seco g/L.

Pandey *et al.*, (2016), estudiaron cuatro rizoclonos estables de *S. rebaudiana* bajo condiciones de luz y oscuridad, que muestran mejor crecimiento en condiciones de oscuridad. Sin embargo, dos de ellos revelaron mayor acumulación de pigmento fotosintético en condiciones de luz. Mientras que unos de ellos nombrado como SRA4 en condiciones de luz mostró exclusividad en la biosíntesis de esteviósidos, mientras que los restos fallaron. Además, los dos rizoclonos fotosintéticamente activos se sometieron a un análisis cuantitativos de RT-PCR del gen UGT85C2, mostrando así una expresión positiva en el rizoclón productor de esteviósidos.

Ahmad *et al.*, (2018), investigaron los efectos potenciales de los niveles de pH diferencial en el desarrollo del cultivo y la producción de GEs y otros contenidos polifenólicos en cultivos de raíces de *S. rebaudiana*. Los cultivos de raíces adventicias favorecieron el pH de 6.0 para la acumulación de biomasa. No obstante, el pH de 5.1 mostró firmemente la producción de esteviósidos y rebaudiósido A, pero reducía el contenido de polifenólicos en cultivos adventicios. Sin embargo, a un pH de 5.8, se encontraron contenidos de dulcósido, compuestos fenólicos totales y también los flavonoides en cultivos de raíces adventicias, además el mismo pH también mejoró las actividades de eliminación de radicales DPPH. Esta investigación ofrecerá un enfoque para mejorar los cultivos *in vitro* de *S. rebaudiana*.

3. JUSTIFICACIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta de interés alimentario, terapéutico y que ha sido objeto de intensa investigación recientemente, con capacidad de producir glucósidos de esteviol que son usados como edulcorantes naturales bajos en calorías, son asimilados en el organismo humano, y utilizados como sustitutos del azúcar común y alternativas dietéticas. Debido a estas razones, se ha buscado aumentar la producción de estos metabolitos secundarios para su aprovechamiento con fines biotecnológicos.

Se han usado diferentes estrategias para mejorar la acumulación de GEs, entre ellas la selección de variedades hiperproductoras, cultivo in vitro de plántulas y órganos, modificación genética a través de mutágenos y transformación mediada por *A. rhizogenes*; que han tenido resultados mixtos. Dentro del grupo de trabajo, previamente, se han establecido cultivos de raíces transformados con cepas silvestres de *Agrobacterium rhizogenes* que han mostrado aumento en la producción de GEs a nivel matraz y biorreactor de inmersión temporal.

Por otro lado, la regulación metabólica sobre la ruta de biosíntesis de estos compuestos es relativamente poco conocida, solamente se conocen algunas enzimas que ejercen control sobre los flujos metabólicos de la ruta, por ejemplo, las enzimas DXS, IPI1 y KO pero no los mecanismos a través de los cuales lo ejercen. Dado lo anterior expuesto una estrategia para conocer los puntos y mecanismos de regulación de la ruta es la modificación de las secuencias de las enzimas claves, a través de procedimientos como la optimización codónica.

Así, en este trabajo se establecen cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* con el vector binario pCAMBIA1105.1 albergado en tres diferentes cepas de *A. rhizogenes*. Estos cultivos serán utilizados junto con los cultivos transformados con cepas silvestres ya establecidos por el grupo de trabajo, como

cultivos de referencia en la posterior evaluación del efecto de modificación de componentes de la ruta de biosíntesis. El vector pCAMBIA1105.1 será utilizado como la base de una construcción génica que incluirá una secuencia modificada de la enzima Isopentenil pirofosfato isomerasa 1 (IPI1).

La construcción génica antes mencionada forma parte de una estrategia biotecnológica propuesta en este trabajo para evaluar el efecto de su expresión en cultivos de raíces transformadas sobre la regulación de la biosíntesis GEs y la eventual mejora de la producción de estos compuestos en *Stevia rebaudiana*.

4. HIPÓTESIS

- ❖ *Stevia rebaudiana* tendrá igual susceptibilidad a la transformación con las cepas las LBA9402, AR4 y K599 que contengan el plásmido binario pCAMBIA1105.1.
- ❖ La secuencia de IDI1 será susceptible de optimizar aun siendo de naturaleza endógena.
- ❖ La estructura tridimensional modelada a partir de la secuencia de IDI1 modificada tendrá alta similitud con las estructuras reportadas.

5. OBJETIVO GENERAL

Establecer cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* con el plásmido binario pCAMBIA1105.1 y diseñar una estrategia de ingeniería metabólica para la modificación de la ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Inducir raíces transformadas utilizando cepas de *Agrobacterium rhizogenes* que contienen el vector binario pCAMBIA1105.1
- 2) Confirmar de la transformación de las raíces vía PCR
- 3) Analizar y modificar *in silico* la secuencia de la Isopentenil pirofosfato isomerasa 1 de *Stevia rebaudiana*
- 4) Diseñar *in silico* la construcción del vector quimérico pCAMPIM e implementar los experimentos de clonación molecular.

7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

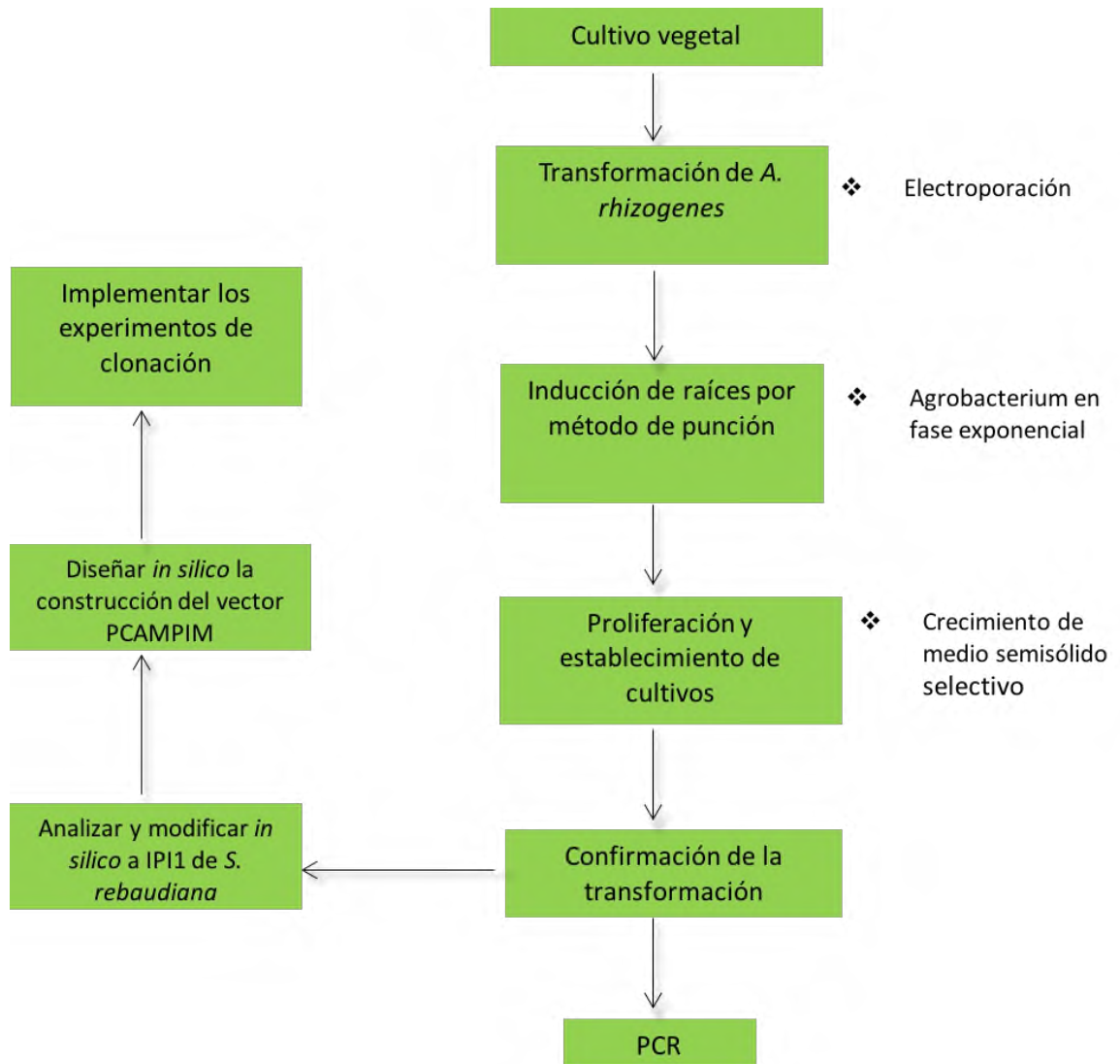


Figura 6. Estrategia experimental del proyecto para la transformación de *S. rebaudiana* y el planteamiento de la construcción del vector quimérico.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Material biológico

8.1.2 Material bacteriano

Las cepas de *A. rhizogenes* utilizadas fueron: K599, LBA9402 y AR4; pertenecientes al banco de cepas del laboratorio de células vegetales de la Universidad del Papaloapan. Dichas cepas fueron empleadas como vectores para inducir la formación de raíces pilosas en plántulas de *S. rebaudiana*.

La cepa silvestre de AR4 de *Agrobacterium rhizogenes*, es de tipo agropina; por otra parte la cepa K599 es conocida también como NCPPB2659. Por último la cepa LBA9402 es resistente a la rifampicina y derivada del tipo agropina, además es la más virulenta hacia *S. rebaudiana* que las cepas AR4 y K599 (Calderón-Gabriel *et al.*, 2016). Todas las cepas contienen el plásmido silvestre inductor de raíces (pRI) que confiere el fenotipo de raíces pilosas (Altamura, 2004).

8.1.3 Material vegetal

Los explantes utilizados para la generación de brotes adventicios provinieron de plantas *in vitro* de *S. rebaudiana*, en estado de desarrollo vegetativo generadas en el laboratorio de cultivos de células vegetales de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, siguiendo el protocolo descrito por Montes-Palmero (2016). Las plantas se crecieron en cuarto de crecimiento controlado con un fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad. Estas plántulas fueron utilizadas para los experimentos de inducción de raíces a la edad aproximada de 3 semanas.

8.2 Establecimiento de cultivos de raíces transformadas

8.2.1 Medios de cultivo

Las cepas bacterianas se hicieron crecer en medio líquido de Luria Bertani (LB), compuesto por triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L, pH de 7.5 y 15 g/L de agar, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, la cual fue monitoreada por densidad óptica a 540 nm.

Los cultivos de raíces y plántulas fueron crecidos en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con vitaminas y ácido indol 3 butírico (IBA) en concentración 0.5 mg/L para el caso particular de la regeneración de raíces en brotes.

El medio de cultivo empleado para la siembra de los explantes de *S. rebaudiana* fue medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con vitaminas y 0.2% de phytigel para los medios semisólidos. El pH fue ajustado a 5.7-5.8 utilizando soluciones concentradas de HCl y KOH. Se calentó el medio nutritivo en un horno de microondas para disolver el agente gelificante. Una vez homogenizados los componentes del medio, éste fue agregado frascos de cultivo para posteriormente ser esterilizados en autoclave por 15-20 minutos a una temperatura de 120°C y 15 PSI de presión.

8.2.2 Antibióticos

Los diferentes medios de cultivo anteriormente citados se suplementaron con antibióticos. Éstos se añadieron al medio estéril a partir de una solución concentrada conservada a -20°C. Los antibióticos utilizados durante el proyecto fueron cefotaxina 100 mg/mL y estreptomycinina 50 mg/mL, correspondientemente a su uso.

8.2.3 Transformación de células competentes

Las células competentes de *Agrobacterium rhizogenes* K599, LBA9402 y AR4 fueron generadas en el laboratorio a partir del protocolo de preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium*. Para esto primero se puso un cultivo de toda la noche (tubo con 5 mL de medio líquido), posteriormente se inoculó con un centésimo un matraz de 25 mL con medio LB, para ser monitoreada hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3-0.4 a 600 nm en un espectrofotómetro (García *et al.*, 2014). El inóculo a la densidad óptica adecuada se enfrió en el matraz en hielo por 30 minutos para ser centrifugado 10000 rpm por 10 minutos y desechar el sobrenadante. La pastilla bacteriana se resuspendió en el volumen inicial con agua miliQ estéril fría para ser nuevamente centrifugada el cultivo a 10000 rpm 10 minutos y desechar el sobrenadante. La pastilla nuevamente se resuspendió en la mitad del volumen inicial con agua miliQ, se centrifugó a 10000 rpm 10 minutos y se desechó el sobrenadante. La pastilla bacteriana se resuspendió en 1/10 del volumen inicial con glicerol 10% frío y por último se centrifugó el cultivo a 10000 rpm 10 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 1/100 del volumen inicial con glicerol 10% frío. Como paso final se realizaron alícuotas de 40 uL en tubos estériles para congelar en nitrógeno líquido y mantener a -80°C.

8.2.4 Transformación de tejido vegetal mediada por *A. rhizogenes*

La transformación de raíces fue inducida en el laboratorio de la Universidad del Papaloapan a través de cocultivo de *A. rhizogenes* con segmentos de tejido vegetal de *S. rebaudiana*. Se partió de cultivos *in vitro* de *S. rebaudiana*, además fueron infectados con las cepas de *A. rhizogenes*, cuando se encontraba con la densidad óptica de 0.3-0.4 a 600 nm en su fase exponencial la cual se añadieron 2 µL en plántulas de *Stevia*.

8.3 Establecimiento y propagación de los cultivos de raíces

En el laboratorio de tejidos vegetales se prepararon cajas de petri conteniendo el medio de cultivo MS, ajustado a pH 5.8, para el mantenimiento y propagación de raíces transformadas de *Stevia*. Los subcultivos de éstas se realizaron bajo campana de flujo laminar en las condiciones de asepsia estándar con subcultivos periódicos en medio fresco con antibiótico (cefotaxima) para eliminar la colonización de *Agrobacterium rhizogenes*.

8.3.1 Extracción de ADN genómico de raíces pilosas

Las muestras de las raíces pilosas de *S. rebaudiana* se trituraron en microtubos de 1.5 mL estéril previamente congelado en nitrógeno líquido. Para evitar el descongelamiento del tejido, se vertió nitrógeno líquido sobre la muestra cuando fue necesario.

Al polvo obtenido del material vegetal se le agregaron 500 μ L de buffer EB (EDTA 50 mM, NaCl 500 mM y Tris 100 mM), se homogenizó por vortex, se incubó por 30 min a 65°C, añadiendo al término 500 μ L de solución cloroformo y homogenizando en vortex por 30 segundos. Se centrifugó 10 min a máxima velocidad (21,100 g) y se recuperó el sobrenadante en un nuevo microtubo. Se añadieron 500 μ L de isopropanol (2-propanol), se agitó en vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se centrifugó 15 min a máxima velocidad y se decantó el isopropanol. Se añadieron 750 μ L de etanol al 70% (v/v), se decantó y la pastilla se disolvió en agua desionizada previamente esterilizada por autoclave, filtrada en una membrana de 0.45 μ M y tratada de luz UV por 10 min a máxima potencia. Por último, el ADN genómico de raíces en solución se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

Posteriormente se llevó a cabo la verificación de la calidad de ADN genómico de raíces mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

8.3.2 Confirmación de la transformación de los cultivos de raíces por PCR

La confirmación de la transformación se realizó mediante la amplificación de genes contenidos en el plásmido. Para esto se empleó un termociclador (Veriti, Applied Biosystems). Se utilizó el master mix Dream Green taq (ThermoScientific) que ya incluye dNTPs y sales amortiguadoras. La mezcla de reacción se preparó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las reacciones se prepararon en frío después de descongelar en hielo todos los componentes, homogenizarlos por inversión y centrifugarlos brevemente. El agua utilizada en las reacciones fue destilada, desionizada, esterilizada por autoclave y tratada con luz UV. Las muestras se distribuyeron en microtubos de 0.2 mL para PCR (19 μ L para cada una) y después se añadieron los templados de ADN genómico de raíces correspondientes para obtener un volumen final de 20 μ L.

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados previamente por el grupo de trabajo García-López, (2016) para la amplificación de los genes RoID (ODRoID5' GGGTACCTGGATCCAACAGA-3'; ORRoID5', ATAAGCTAAGGGCCCATCCA-3'), y RoI B (ODRoIB5'-AGAGCTTCAAGATGCCTTCG-3'; ORRoIB5', CGCGTAAGGATTTCTGCATT-3').

Las condiciones de la reacción en el termociclador se programaron de la siguiente forma: desnaturalización inicial 94°C por 30 segundos, 1 repetición, ciclado por 35 veces a 94°C por 10 s, 55°C por 30 s, 72°C por 60 s y un paso de extensión final de 72°C por 5 min. Las reacciones se mantuvieron en la función de enfriamiento del termociclador hasta que se almacenaron a -20°C o se procesaron de manera inmediata.

8.3.3 Electroforesis de productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 2% con el marcador de peso molecular (Gene Ruler 100 a 1000 pb, SM024, Thermo). Los fragmentos de ADN amplificados fueron desplazados mediante un campo eléctrico en la cámara electroforética con buffer TAE 1X. Una vez hecho el corrimiento, el gel se sumergió en la solución de bromuro de etidio con una concentración de 1 µg/mL durante 2 min y después se enjuagó en agua durante 10 min.

Al finalizar la electroforesis se visualizó la banda correspondiente del fragmento de ADN con la ayuda de un fotodocumentador para verificar la presencia del ADN correspondiente.

Para los escenarios de construcción del vector quimérico descrito más adelante, después de visualizar la banda correspondiente en un transiluminador UV, se extrajo la porción de gel que contenía la banda de ADN de interés con la ayuda de un bisturí. El gel escindido se almacenó en un microtubo de 1.5 mL. Se expuso el mínimo tiempo posible el ADN en la radiación UV para evitar la degradación de ADN. Las moléculas de interés se purificaron de forma convencional, empleando isopropanol y acetato de sodio para precipitar el ADN.

El ADN se cuantificó en un microespectrofotómetro de luz uv (Nanodrop, Thermo 2000) realizando un barrido de 220 nm a 350 nm. Se registraron la concentración, la relación de 260/280 (> 1.8 buen indicativo de baja contaminación por proteínas) y 260 /230 (> 1.8 buen indicativo de baja concentración de contaminantes orgánicos).

8.4 Análisis bioinformáticos

8.4.1 Plásmido base de expresión vegetal: pCAMBIA1105.1

El vector pCAMBIA1105.1 (Fig. 7) tiene un tamaño de 12,136 pares de bases, posee la secuencia del promotor constitutivo 35S del virus de mosaico de la coliflor (35SCaMV). Además cuenta con regiones flanqueadas por borde derecho e izquierdo, lo que le confiere a que sea un vector binario. Por otra parte, está constituido por regiones de clonación múltiple donde se encuentran agrupadas secuencias que reconocen a determinadas enzimas de restricción, permitiendo el posterior subclonado de segmentos de ADN de interés. De la misma forma, posee una región de secuencia que codifica para resistencia a estreptomicina y un origen de replicación para *Agrobacterium*.

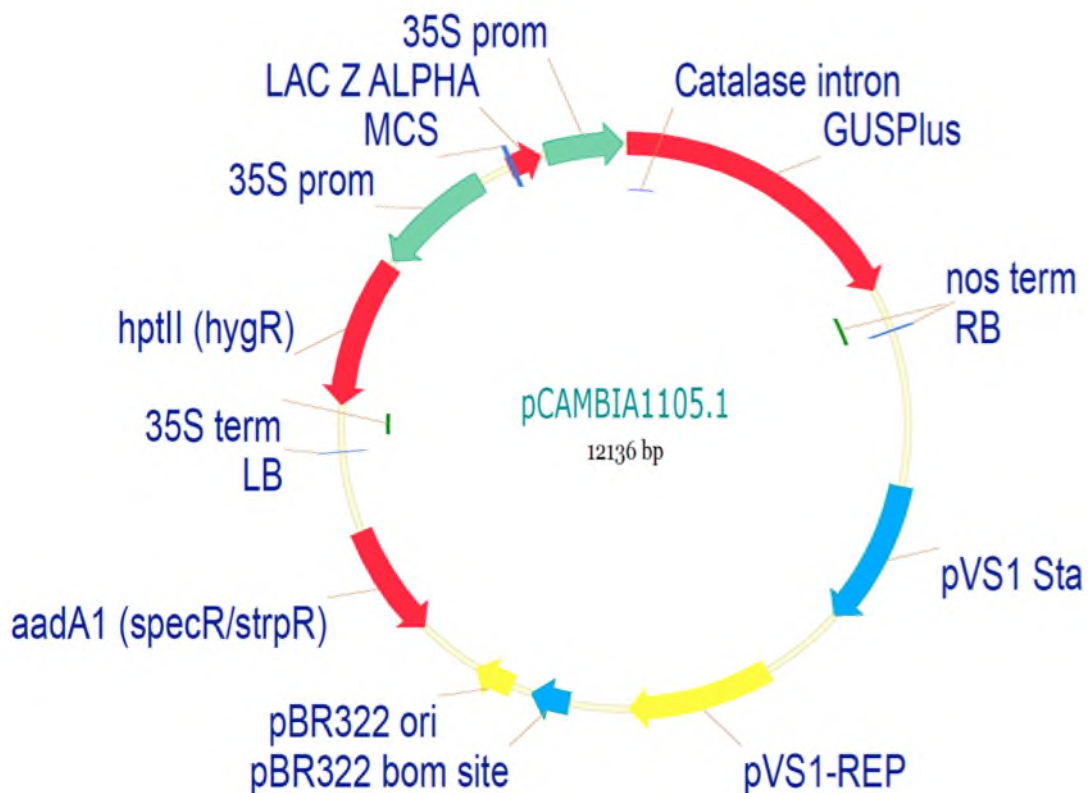


Figura 7. Representación esquemática del vector binario pCAMBIA1105.1 (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585>).

8.4.2 Secuencia de nucleótidos de la Isopentenil pirofosfato isomerasa 1

La secuencia de nucleótidos de IPI1 de *S. rebaudiana* Bertoni utilizada fue descargada de la base de datos Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Fig. 8), siendo la secuencia original que participa en la catálisis de los intermediarios de IPP y el DAMPP.

```
1 atttaataaa tatcaagtct caaagatgtc accttcacct aacaaaatgt taaaattttc
61 ctccataaaa accatcgcca acacactctc tttgcatcgc tcgtcaatcc aattaaaccg
121 cttcgcccct aaatctctac caaaaaagcc tcaaattctca ttctoctccg ctctcactgt
181 cccccgccgg tcttccgcca ccgtaactgc cggatgggt gacgattccg gcatggacgc
241 cgtccagaga cgcctcatgt ttgatgatga atgcattttg gtagatgaga atgacaatgt
301 ggttgacat gataccaaat acaactgcca cttgatggag aagattgaaa aatataatth
361 gctgcacagg gcattcagtg tatttctatt taattcaaaa tatgagttac tccttcagca
421 acggctctga accaaggtga cattccctat ggtatggacc aacacatggt gcagccatcc
481 gctctacaga gaatcggagc ttattcccga aaatgccctt ggtgtgagaa atgctgcca
541 gaggaagctg ttggatgaac ttggtatccc tgctgaagat gttccagttg atcagtttac
601 gcctttgggt cgcatgctct acaaggctcc ctctgatgga aagtggggag aacatgaact
661 tgactaccta ctcttcattg tgcgagacgt tgctgtgagc ccaaaccag atgaagtggc
721 agatatcaaa tacgtgaacc aagacgagtt aaaagagttg ctaaggaagg cggatgcagg
781 ggaggatggg ttgaagctgt ctccatggtt caggttagtg gttgacaact tcttgttcaa
841 atgggtggat catgttcaaa aggtacgct tcctgaagca atgacatga aaaccatcca
901 taagttgata taaaccacat atgcccctca actcattggt atggggctaa tagtgtttaa
961 tctgtcttag catgtggttc ttgtatgttg ggtttttggt tcatgagtgt aataacgagc
1021 cacgttggtt ctagtcaaaa cttgggaact tttttttta catgtatttc cttttctttc
1081 taagaagata acttgctgaa tttctattht tgctctaaac tttgatcgtg caatgggtga
1141 gaacgacaag ctaagctggt taactgaaag agcatcgaca gttttaacaa agtttcattt
1201 ttcaaaatgt tagcttgtgt ttttaaccga ttaatttgta aaactaaaat attttcttgt
1261 ggtgaatggt gttctctt
```

Figura 8. Secuencia completa de gen IPI1 correspondiente a la ecuación de la enzima de las isomerasas. ID: A0MLT2-STERE.

8.4.3 Alineamientos múltiples y análisis filogenético de las IPI1

El diseño *in silico* partió de la secuencia original de IPI1 para *S. rebaudiana* (Número de acceso NCBI KT276235). Con dicha secuencia se realizó una búsqueda por homología utilizando la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y se seleccionaron los resultados de IPI1 con la mayor identidad de diferentes plantas dicotiledóneas. Los alineamientos múltiples obtenidos se reanalizaron en el software MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net>) para la identificación de regiones altamente conservadas y divergentes.

8.4.4 Análisis de uso codónico

Por otro lado, el uso codónico de la secuencia original fue optimizado en el software Visual Gene Developer (<http://visualgenedeveloper.net>), utilizando la tabla de uso codónico de *S. rebaudiana* (Fig. 9), descargada de la Base de Datos de Uso Codónico (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) para reemplazar los codones originales con otros de mayor preferencia a través del algoritmo de optimización Monte Carlo (Jung *et al.*, 2011). Para la selección de la secuencia final se tuvieron en cuenta los parámetros de índice de adaptación codónica (CAI), número efectivo de codones (Nc) y el porcentaje de GC. La compilación de las modificaciones hechas a la secuencia se hicieron usando el software Snap gene (<http://www.snapgene.com>).

UUU F 0.57 24.0 (434)	UCU S 0.25 17.4 (314)	UAU Y 0.58 16.1 (290)	UGU C 0.63 9.0 (162)
UUC F 0.43 18.2 (329)	UCC S 0.11 8.1 (146)	UAC Y 0.42 11.7 (211)	UGC C 0.37 5.3 (96)
UUA L 0.19 18.1 (327)	UCA S 0.24 17.1 (308)	UAA * 0.49 1.1 (19)	UGA * 0.38 0.8 (15)
UUG L 0.26 25.9 (467)	UCG S 0.13 9.4 (170)	UAG * 0.13 0.3 (5)	UGG W 1.00 16.0 (289)
CUU L 0.24 23.3 (420)	CCU P 0.28 14.2 (256)	CAU H 0.59 14.9 (269)	CGU R 0.17 7.0 (126)
CUC L 0.13 12.7 (229)	CCC P 0.16 8.1 (146)	CAC H 0.41 10.4 (187)	CGC R 0.08 3.2 (57)
CUA L 0.10 9.5 (172)	CCA P 0.31 16.0 (289)	CAA Q 0.71 21.2 (382)	CGA R 0.15 6.3 (114)
CUG L 0.09 8.4 (151)	CCG P 0.25 12.7 (229)	CAG Q 0.29 8.8 (158)	CGG R 0.12 5.0 (90)
AUU I 0.43 26.8 (484)	ACU T 0.27 15.1 (273)	AAU N 0.55 22.8 (411)	AGU S 0.15 10.9 (196)
AUC I 0.34 21.2 (382)	ACC T 0.34 18.7 (337)	AAC N 0.45 18.6 (336)	AGC S 0.11 7.6 (137)
AUA I 0.23 14.5 (261)	ACA T 0.26 14.3 (258)	AAA K 0.54 35.9 (649)	AGA R 0.33 13.7 (248)
AUG M 1.00 27.5 (496)	ACG T 0.13 7.5 (135)	AAG K 0.46 30.1 (543)	AGG R 0.16 6.6 (119)
GUU V 0.41 30.4 (549)	GCU A 0.37 24.6 (444)	GAU D 0.67 38.0 (686)	GGU G 0.38 23.9 (431)
GUC V 0.17 12.3 (222)	GCC A 0.15 10.0 (180)	GAC D 0.33 18.7 (338)	GGC G 0.12 7.4 (133)
GUA V 0.15 11.1 (200)	GCA A 0.30 19.9 (360)	GAA E 0.62 43.0 (776)	GGA G 0.31 19.6 (353)
GUG V 0.27 19.6 (353)	GCG A 0.18 12.1 (218)	GAG E 0.38 26.3 (475)	GGG G 0.19 12.0 (216)

Figura 9. Tabla de uso codónico de *S. rebaudiana* (<http://www.kazusa.or.jp>).

8.4.5 Modelado de la estructura tridimensional

El modelado tridimensional por homología de la secuencia modificada se obtuvo a través del servidor I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>). El servidor I-Tasser genera una serie de modelos estructurales basados en búsquedas de homología con modelos tridimensionales determinados experimentalmente depositados en bases de datos como el Protein Data Bank, los mejores resultados determinan al modelo putativo.

8.5 Construcción del vector de expresión vegetal pCAMPIM

8.5.1 Obtención del vector pCAMBIA1105.1 linearizado

El vector pCambia 1105.1 fue obtenido a partir del vector pCamSrDXS, que incluye adicionalmente al gen srDXS, previamente utilizado en el grupo de trabajo Jiménez-Brigada, (2016), cuya liberación completa se logró al realizar una doble restricción con las enzimas *NcoI* y *BglII* simultáneamente, de acuerdo al protocolo del fabricante. La inactivación de las enzimas se realizó a 65°C por 20 min. Posteriormente, a la digestión enzimática del vector pCamSrDXS, el vector sin inserto fue separado por electroforesis para finalmente purificar al vector linearizado pCambia1105.1.

Seguidamente, se utilizó el microespectrofotómetro Nanodrop para medir la concentración de ADN y la pureza de las muestras y posteriormente se realizaron los cálculos de molaridad del vector pCambia1105.1 que permitieran determinar las proporciones inserto/vector a utilizar. Este es uno de los pasos más importantes en la ligación porque permite calcular las cantidades necesarias de los componentes (buffer, ATP, H₂O dd, ligasa, inserto, vector).

8.5.2 Ligación molecular

Para el procedimiento de clonación molecular se utilizó el vector pCambia1105.1 (pC1105.1) previamente purificado de gel, que se incorporó a una mezcla de reacción que contenía T4 ADN ligasa y el fragmento correspondiente a la secuencia de IPI1 previamente purificado del plásmido comercial en el que estaba insertado; y la mezcla se incubó a 4°C de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los cálculos de proporción inserto/vector para las reacciones de ligación se realizaron utilizando un algoritmo de New England Biolabs (<https://www.neb.com/faqs/2012/02/15/how-to-calculate-the-molarity-of-ends>).

Seguidamente, la incorporación de los productos de ligación se llevó a cabo mediante las técnicas de electroporación o choque térmico.

8.5.3 Transformación por choque térmico

La cepa bacteriana utilizada fue *E. coli* One Shot Top 10 químicamente competentes (Invitrogen) con una alta eficiencia de transformación (1×10^9 cfu/ μ g de ADN).

Para la transformación de las células competentes se mezclaron 5 μ L de ligación en el vial de 50 μ L de células competentes de *E. coli*. Se incubaron en un tiempo de 30 min en hielo, luego a 42°C durante 30 segundos en un termobloque y de inmediato se incubaron en hielo por 2 min. A continuación se les añadieron 250 μ L de medio SOC líquido y se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación de 180 rpm, y finalmente se añadieron alícuotas en cajas petri con medio LB preparada previamente con el antibiótico correspondiente para la selección de transformantes.

8.5.4 Transformación por electroporación

La electroporación se llevó a cabo utilizando células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes preparadas de acuerdo a la metodología descrita en secciones anteriores. En alícuotas de un volumen de 40 μ L de células electrocompetentes de las cepas K599, LBA9402 y AR4, se adicionaron 1.5 μ L de las mezclas de ligación. Esta suspensión se introdujo en una celda de electroporación y se aplicó un pulso eléctrico mediante electroporador (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones de electroporación: 5 milisegundos, 1.8 KV y posteriormente se dejaron reposar 1 min en hielo y se transfirió a 1 mL de medio LB fresco. El cultivo se incubó por 3 h a 28°C agitando a 250 rpm y fue finalmente sembrado en medio sólido selectivo LB con antibiótico estreptomina. Las colonias resultantes se analizaron al día siguiente por el método de extracción de plásmidos por lisis alcalina.

8.5.5 Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

Para el aislamiento de ADN plasmídico se centrifugaron las bacterias crecidas en 3 mL de cultivo de 24 h de *E. coli* en presencia del antibiótico de selección en microtubos de 1.5 mL durante 1 min a 9,600 g. El método de extracción fue por lisis alcalina (Sambrook and Russell, 2001). En la Tabla 5 se detallan las soluciones utilizadas y en la Tabla 6 la preparación de los tres buffers para procesar 20 muestras.

Concentración final	Compuesto	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)
0.5 M	EDTA (pH:8.0)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	292.24
2.5 M	NaCl	NaCl	58.44
1.0 M	TRIS (pH:8.0)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	121.14
5 %	SDS	C ₁₂ H ₅ NaO ₄ S	288.38

Buffer I (Mantenerlo en frío)	Buffer II (Temperatura ambiente)	Buffer III (Mantenerlo en frío)
1935 µL de H ₂ O	3120 µL de H ₂ O	852 µL de H ₂ O
40 µL de EDTA(0.5 M) pH:8.0	800 µL de SDS	344 µL de ácido acético glacial
25 µL de TRIS (25mM) pH:8.0	80 µL de NAOH	1,800 µL de acetato de potasio

Para extraer al plásmido, las bacterias empaquetadas se resuspendieron en 100 µL de buffer I, agitando en vórtex vigorosamente. Posteriormente se adicionaron 200 µL de buffer II y se mezclaron por inversión, y en seguida se adicionaron 150 µL de buffer III, se mezclaron por inversión y después por vórtex y se incubaron durante 5 min en hielo. Posteriormente, se centrifugaron durante 5

min a 16,200 g a 4°C. El sobrenadante se añadió un microtubo nuevo, donde se agregó 500 µL de fenol/cloroformo 24:1 (V/V), se agitó vigorosamente y después se centrifugó a 4°C durante 2 min. Posteriormente se pasó el sobrenadante a un nuevo microtubo y se añadió 750 µL de etanol y posteriormente se agitó vigorosamente, se dejó reposar 2 min a temperatura y se centrifugó a 4°C durante 5 min, y se decantó el etanol. Se lavaron con 1 mL de etanol al 70%, y se agitó por vórtex vigorosamente y se centrifugó a durante 2 min. Finalmente se retiró el etanol, y se dejó a reposar para evaporar el resto de etanol contenido por evaporación. Por último se agregó 20 µL de H₂O con RNAsa (2 µL de solución 10 mg/mL) y se incubó a 37°C durante 1 h, a continuación se utilizó inmediatamente.

8.5.6 Confirmación de la ligación y construcción del vector pCAMPIM por PCR y análisis de restricción

Para la confirmación de la integración de la secuencia IPI1 modificada al vector pC1105.1, que generaría el vector pCAMPIM, se diseñaron oligonucleótidos para PCR sobre regiones flanqueantes en el extremo 5' y 3' (pCambseqF y pCambseqR) de la posición de IPI1 modificada en vector pCAMPIM (Tabla 7), esperando una fragmento de 1,508 pb (Fig. 10). Otro par de oligos fueron diseñados (pldidseqF y pldiseqR) para hibridar en la secuencia de IPI1 modificada y fueron utilizados en combinación con los anteriores oligos para garantizar la orientación correcta. Además, la confirmación de la ligación se ensayó a través de patrones de digestión con las enzimas *EcoRI*, *SpeI* y *PstI*, todas ellas unicorte, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Jena Bioscience).

Tabla 7. Oligonucleótidos diseñados para la confirmación de ligación del vector pCAMPIM.

Oligonucleótidos	Secuencia (5' a 3')
pCambseqF	TAAGGGATGACGCACAATCCCCTA
pIdidseqF	TTAACTGAAAGAGCATCGACAGTTT
pIdiseqR	CGAAGCGGTTTAATTGGATTGACGA
pCambseqR	ATTTACACCATAACCAATCAATTAA

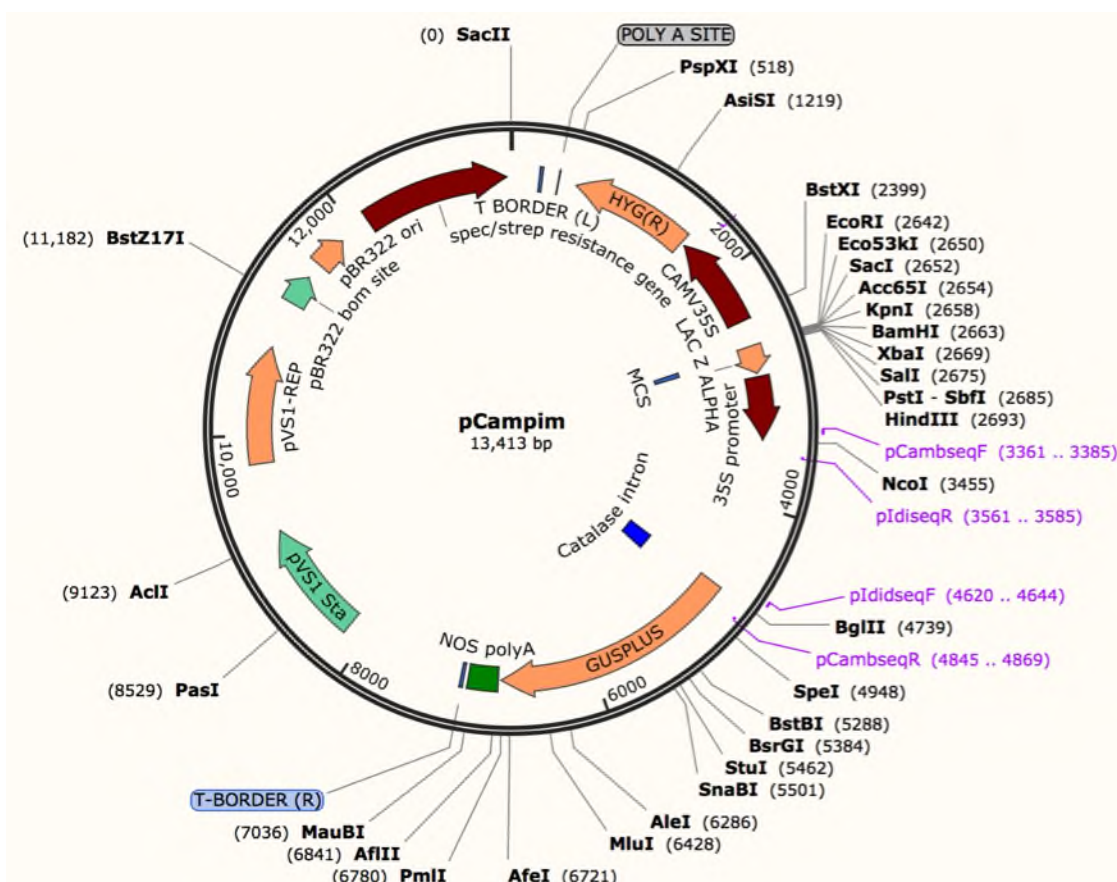


Figura 10. Plásmido pCAMPIM y posiciones de hibridación de los oligonucleótidos diseñados.

8.6 Análisis estadísticos

Los efectos de las cepas en la inducción de raíces transformadas fueron evaluados usando un diseño factorial simple y fueron analizados utilizando el modelo lineal general con un 95% de confianza ($p < 0.05$). Los análisis postANOVA de comparación múltiple de media se realizaron con la prueba de Tukey con 95% de confianza ($p < 0.05$). Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico Minitab versión 16.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Inducción y establecimiento de cultivos de raíces transformadas con el plásmido pC1105.1

9.1.1 Transformación de *A. rhizogenes* K599, LBA9402 y AR4 con el vector pC1105.1

El vector pCAMBIA1105.1 (Fig. 11) fue extraído de una cepa de mantenimiento *E coli* DH5 α del cepario del laboratorio de cultivos de células vegetales. Los resultados de extracción del plásmido se muestran en la figura 11, haciéndose notar la banda de 12,136 pb. Dichas extracciones plasmídicas produjeron muestras con relaciones de pureza con respecto a proteínas (A260/A280) y respecto a compuestos fenólicos (A260/A230) superiores a 1.8 por lo que fueron adecuadas para experimentos moleculares y de transformación bacteriana.

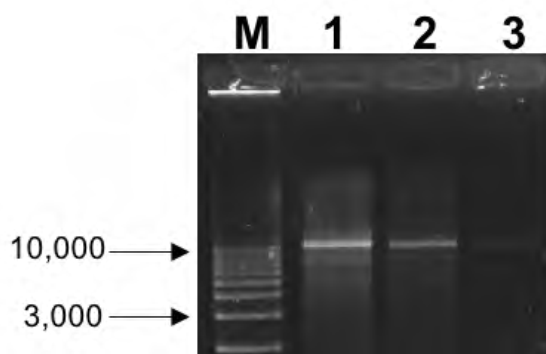


Figura 11. Muestras provenientes de la extracción del plásmido pC1105.1 de *E. coli* DH5 α . M: Marcador de peso molecular. 1, 2 y 3: Plásmidos del vector binario pCAMBIA1105.1.

Previamente se prepararon células electrocompetentes de cada una de las cepas de *A. rhizogenes* (LBA9402, K599 y AR4) de acuerdo a lo mostrado en la sección de materiales y métodos, fueron utilizadas en esta fase para su transformación al integrar el plásmido pC1105.1 extraído.

Las células transformadas por electroporación fueron crecidas en medio selectivo (50 µg/ml) y después de 24 horas de incubación, se lograron observar colonias (Fig. 12) para cada cepa de *A. rhizogenes* transformada. Se observaron 152 colonias presuntamente transformadas de la cepa k599 (Fig. 12B), 64 colonias de la cepa LBA9402 (Fig.12C) y 68 colonias correspondientes a la cepa AR4 (Fig. 12D).

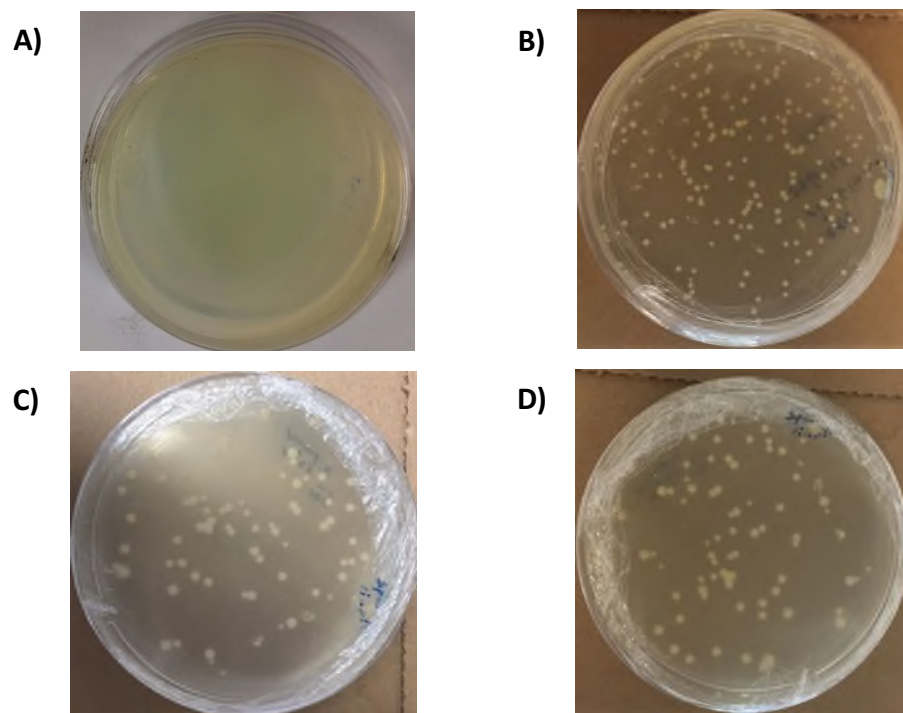


Figura 12. Placas con medio LB-agar adicionadas con estreptomina como presión selectiva. A) Control positivo B) Ejemplo de colonias candidatas obtenidas con K599. C) colonias candidatas obtenidas con LBA9402. D) Colonias candidatas con AR4.

Las colonias presuntamente transformadas fueron muestreadas y analizadas por extracción plasmídica para corroborar la integración del plásmido. Resultados de las extracciones de ADN plasmídico de estas colonias seleccionadas se visualizaron por electroforesis (Fig. 13) en la cual se pueden observar la presencia

de una banda cercana al tamaño del vector (12,136 pb). Una vez corroborada la presencia del vector pC1105.1 en todos los casos de las cepas bacterias, estas se crioproservaron como adiciones al cepario bacteriano del laboratorio. Estas cepas fueron denominadas K599.1, LBA9402.1 y AR4.1 y fueron utilizadas para la inducción de raíces transformadas.

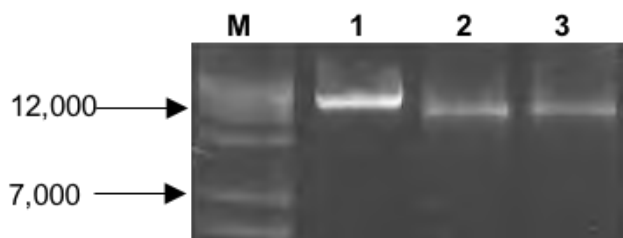


Figura 13. Extracciones de ADN plasmídico. Gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular. 1: ADN plasmídico de la cepa K599.1. 2: ADN plasmídico de la cepa LBA9402.1. 3: ADN plasmídico de la cepa AR4.1.

Dentro del grupo de trabajo, Jiménez-Brigada (2016) utilizó la técnica de electroporación para transferir el vector pCamSrDXS, que comparte la base del vector pC1105.1 usado en este trabajo, a *E. coli* y *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402 con resultados de integración muy similares a lo observado en este trabajo. Cabe mencionar que el plásmido utilizado por Jiménez (2017) fue utilizado también en este trabajo y será mencionado en secciones siguientes.

9.1.2 Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni

El material inicial para la inducción de raíces transformadas fueron plántulas de *S. rebaudiana* que se generaron a partir de la regeneración de brotes adventicios sobre explantes provenientes de una línea de plántulas *in vitro* previamente establecidas en el laboratorio de Células y Cultivos de Tejidos Vegetales por Montes-Palmeros (2016) (Fig. 14). Se observó que los explantes obtenidos de plántulas de 15-20 días de edad colocados en medio de cultivo generaron brotes adventicios en su totalidad, entre 8 y 16 brotes viables por cada uno de ellos, de manera similar a lo reportado por Montes-Palmeros (2016). Estos últimos resultados de micropropagación concuerdan con la investigación de Razak *et al.*, (2014) y Sheikh *et al.*, (2016), donde se concluye que los explantes de

segmentos nodales son el mejor material de partida para la regeneración *in vitro* de *S. rebaudiana*, además de que la utilización de regulador de crecimiento vegetal BAP también es la que induce el mayor número de brotes. Los brotes de *S. rebaudiana* han sido inducidos anteriormente por Sreedhar *et al.*, (2008) de manera directa utilizando las combinaciones de BAP y cinetina (9 μM y 7 μM respectivamente), encontrando resultados congruentes de regeneración a los encontrados en este trabajo.

Después de la etapa de la multiplicación, se llevó a cabo el enraizamiento de los brotes al transferirlos a medio de cultivo MS complementado con 2% (p/v) de sacarosa y 0.5 mg/L de IBA (Ácido indol butírico), lo que resultó en 100% de brotes con enraizamiento adecuado (Fig. 14C). Los resultados obtenidos fueron similares a lo reportado por Gupta *et al.*, (2010) y Razak *et al.*, (2014), donde se observó mayor inducción de raíces con la adición de 0.5 mg/L y 1.0 mg/L de IBA.

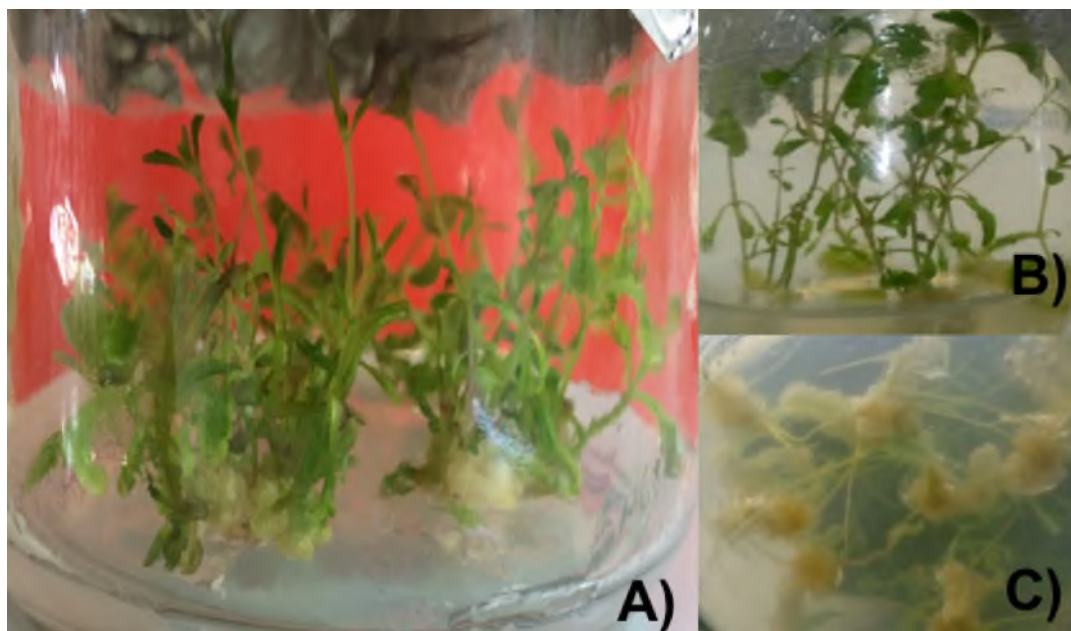


Figura 14. Etapas de la micropropagación de *S. rebaudiana*. A) Generación de brotes adventicios en explantes de *Stevia rebaudiana* en medio MS con BAP 1 mg/L e IAA 0.5 mg/L. B) Brotes escindidos y subcultivados en medio MS con 0.5 mg/L de IBA para enraizamiento. C) Proliferación de raíces en medio de enraizamiento.

El protocolo de micropropagación utilizado permitió generar entre 36 y 40 plántulas por cada plántula original, mismas que fueron sincronizadas en su crecimiento y utilizadas para los experimentos posteriores de inducción de raíces transformadas mediada por *A. rhizogenes*.

9.1.3 Inducción de raíces presuntamente transformadas en *S. rebaudiana*

Para la inducción de raíces transformadas se utilizaron las tres cepas de *A. rhizogenes* generadas anteriormente todas albergando el vector pC1105.1 y las plántulas micropropagadas de 15 días de edad. La infección de las plántulas con las cepas bacteriana se realizó mediante el método de punción (García *et al.*, 2014), el cual requirió hacer mecánicamente una herida en los tallos de las plántulas con la finalidad de generar un punto de entrada para las cepas bacterianas utilizadas y llevar a cabo el proceso de transformación. Las plántulas recientemente infectadas (2 días) se muestran en la figura 15, cabe resaltar que no se observaron efectos negativos inmediatos debido a su exposición a las cepas bacterianas diferentes, ni colonización del medio de cultivo que pudiera afectar el desarrollo de las plántulas.

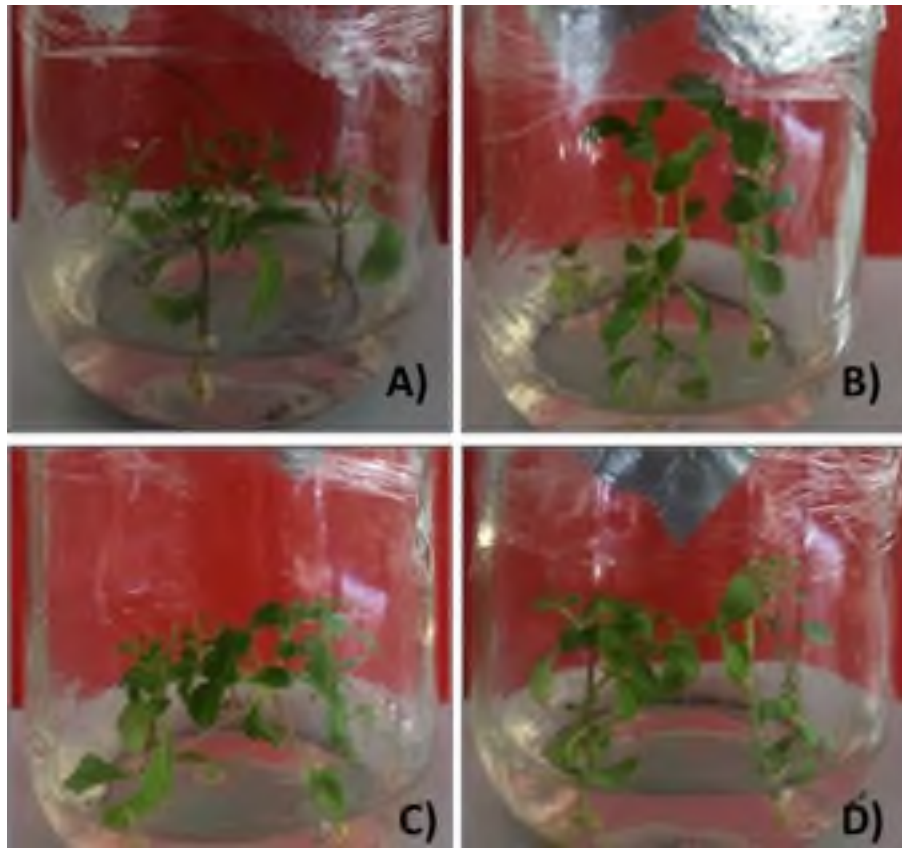


Figura 15. Plántulas infectadas con cepas de *A. rhizogenes* después de dos días. A) Plántulas control (no infectadas). B) Plántulas infectadas con K599.1. C) Plántulas infectadas con LBA9402.1. D) Plántulas infectadas con AR4.1.

Las primeras raíces presuntamente transformadas empezaron a emerger en los puntos de infección a los 9 días después de la infección con las cepas LBA9402.1 y AR4.1, mientras que la K599.1 indujo raíces después de los 15 días. Estas raíces mostraron características fenotípicas normalmente asociadas a las raíces transformadas (Fig. 16), como: crecimiento ageotrópico, vellosoidad abundante y alta ramificación (Abdy *et al.*, 2016).

Comparando el tiempo de emergencia de raíces presuntamente transformadas obtenidas en este estudio fue menor que lo reportado por Razak *et al.*, (2014) y Abdy *et al.*, (2016). Este efecto es probablemente debido a que existen diferentes y numerosos factores que influyen en la transformación, tales como las cepas

bacterianas usadas, los vectores que alberguen y la variedad vegetal usada para la infección (Garro *et al.*, 2012).

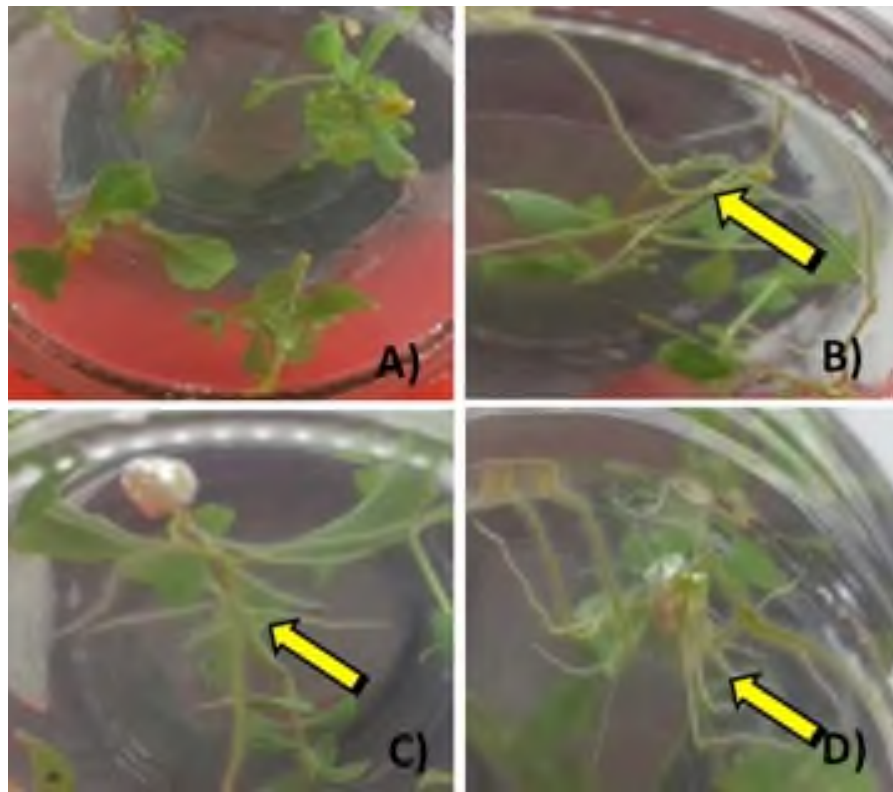


Figura 16. Raíces putativas en medio MS después de 15 días de cultivo. A) Plántulas control sin raíces. B) Raíces infectadas con K599.1. C) Raíces infectadas con LBA9402.1. D) Raíces infectadas con AR4.1.

Derivado de la inducción, se llevó a cabo el conteo de raíces emergidas después de 16 días después de la infección para evaluar la susceptibilidad de las plantas a desarrollar raíces resultantes de la infección de cada cepa, tales conteos se muestran en la Tabla 8. Cada una de esas raíces fue considerada un evento de transformación independiente y, por lo tanto fueron propagadas por separado.

Así, se observó que la cepa LBA9402.1, indujo el mayor número de raíces presuntamente transformadas y fue significativamente diferente a las otras cepas ($p < 0.05$). La cepa que menos indujo raíces fue la AR4.1, todas las cepas indujeron raíces de manera diferente entre si ubicándose todas en diferentes familias de significancia. De esta forma se sugiere que la mayor virulencia hacia

Stevia la tiene la cepa LBA9402.1.

Tabla 8. Comparación del número de raíces emergidas después de 16 días, en la infección con las cepas K599.1, LBA9402.1 y AR4.1.

	Cepas de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>		
	K599.1	LBA9402.1	AR4.1
Tiempo promedio de aparición de raíces	14.5±1.5	7±1	7±1
Nº total promedio de raíces emergidas por tratamiento	35±2 ^b	40±3 ^a	30±2 ^c

Las letras indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

La virulencia en la agrotransformación es la condición en la cual la infección genera mayor cantidad de raíces en el menor tiempo posible, lo cual puede variar en las diferentes cepas transformadas de *A. rhizogenes* y ser dependiente también del tipo de explante, convirtiéndose en uno de los factores más importantes que afectan adicionalmente a la frecuencia de transformación (Valimehr *et al.*, 2014). Investigaciones anteriores han demostrado que existen varios factores, como son el genotípico, el entorno físico y químico; y el tipo de explantes, que afectan la transformación genética mediada por *Agrobacterium* (Sarker *et al.*, 2002; Lengliz *et al.*, 2009). Con respecto a la virulencia observada en el actual trabajo, se reportaron resultados similares por Michalec-Warzecha *et al.*, (2016), donde se mostró que la eficiencia de la transformación es directamente influenciada por el tipo de cepa bacteriana. La virulencia de LBA9402 ha sido reportada más allá de *S. rebaudiana*, tal es el caso de lo reportado por Giri *et al.*, (2001), que obtuvieron datos favorables en la inducción de raíces transformadas sobre plantas de *Artemisia annua* (ajenjo dulce) con la cepa silvestre LBA9402.

Dentro del grupo de trabajo, Calderón (2016) utilizando las formas silvestres de las cepas de *A. rhizogenes* utilizadas en este trabajo para transformar plántulas de

S. rebaudiana, reportó que la cepa más virulenta fue también la cepa LBA9402. Así, puede sugerirse que la virulencia de estas cepas hacia *Stevia rebaudiana* se ve principalmente influenciada por los plásmidos silvestres más que por los plásmidos binarios que alberguen, siendo los primeros los que contienen los genes que codifican la maquinaria proteica que dirige la inserción del ADN-T al genoma de la planta y con ello la expresión del fenotipo clásico de raíces transformadas (Tzfira, 2006).

Derivado del procedimiento de propagación de las raíces presuntamente transformadas, se lograron separar individualmente numerosos eventos de transformación para cada cepa probada. Muchos de esos cultivos no fueron capaces de mantener el crecimiento durante los subcultivos en medio semisólido libre de hormonas. Pocas líneas mantuvieron las características de crecimiento típicas de raíces transformadas después del periodo de propagación (Fig. 17).

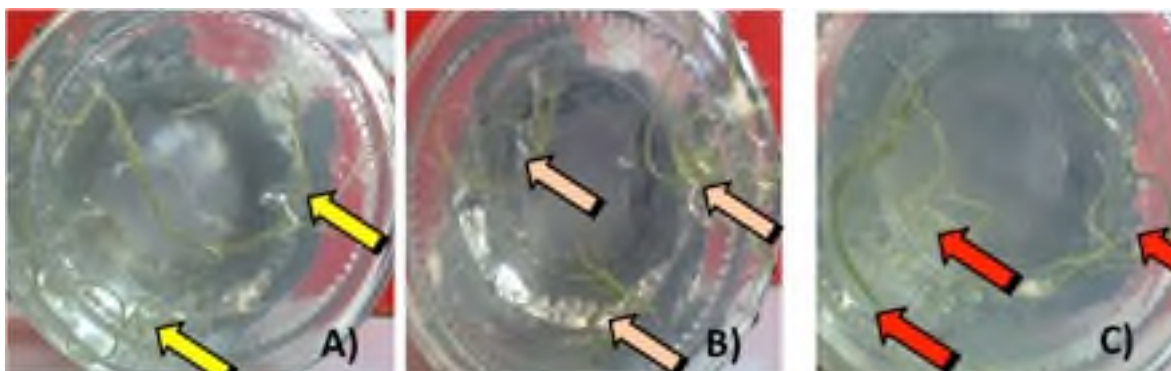


Figura 17. Propagación de raíces presuntamente transformadas de *Stevia rebaudiana* en medio semisólido. A) Raíces provenientes de infección con K599.1. B) con LBA9402.1. C) con AR4.1.

Las raíces que fueron capaces de sobreponerse al estrés inducido por los subcultivos de propagación y a la remoción de la colonización bacteriana crecieron a velocidades variables y se les utilizó para extraer ADN genómico para confirmar su transformación, resultados que son descritos a continuación.

9.1.4 Confirmación de la transformación de los cultivos control

Para confirmar la transformación de las líneas de raíces inducidas con cada cepa (Fig. 18A), se extrajo ADN genómico (ADNg). Las relaciones de absorbancia del ADNg de las diferentes líneas fueron para K599.1 fue $A_{260}/A_{280}=2.04$, para LBA9402.1 $A_{260}/A_{280}=1.72$ y finalmente para AR4.1 $A_{260}/A_{280}=2.06$, dichas relaciones indican una buena calidad, con mínima cantidad de proteínas, de las muestras para ser utilizadas en ensayos moleculares como PCR.

En la figura 18B, se muestra el corrimiento electroforético del ADNg que evidencia una banda de alto peso molecular predominante característica de ADNg integro sin muestras significativas de degradación.

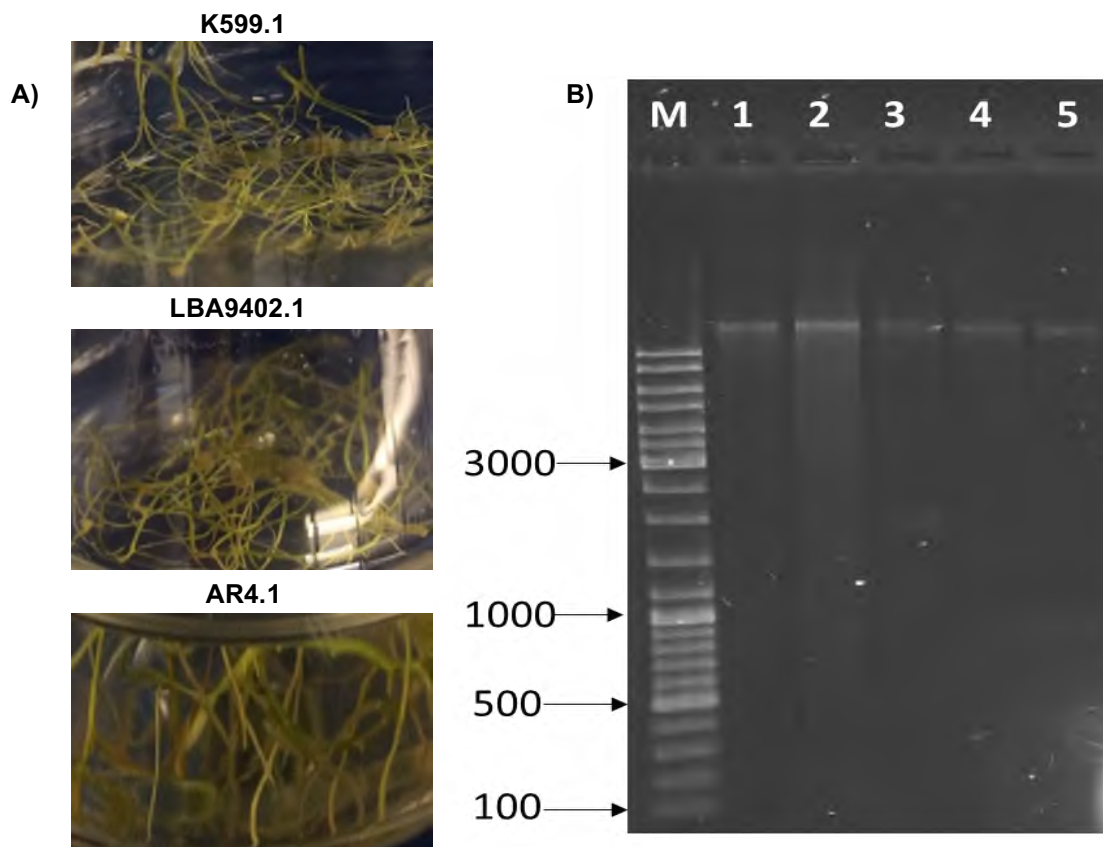


Figura 18. Raíces presuntamente transformadas y visualización de su ADNg por electroforesis. A) Raíces infectadas con la cepa K599.1, con LBA9402.1 y AR4.1 de *A. rhizogenes*. B) Corrimiento electroforético de ADN genómico de raíces. M:

Marcador de peso molecular. 1, 2 y 3: ADNg de raíces infectadas AR4.1 4: ADNg de raíces infectadas con K599.1 y 5: ADNg de raíces infectadas con LB49402.1.

Una vez verificada la integridad del ADNg extraído de las diferentes líneas, se utilizaron estas muestras para la confirmación de la transformación mediante la búsqueda de los genes *ro/B*, y *ro/D*. Estos genes están presentes en el ADN-T del plásmido silvestre (pRi) de las cepas de *A. rhizogenes* el cual se traslada durante el proceso de agrotransformación (Altamura, 2004), lo que permite que sean un indicador confirmatorio de la transformación del tejido radicular. La amplificación se realizó usando los oligonucleótidos diseñados en el grupo de trabajo y que fueron descritos previamente en materiales y métodos.

Tres líneas de raíces, una inducida con cada cepa transformada, fueron capaces de mantener el crecimiento hasta generar biomasa suficiente para el análisis de PCR y mostraron características de típicas de la agrotransformación como la alta ramificación, crecimiento acelerado y gran pilosidad.

Así, la amplificación por PCR permitió confirmar la transformación de las tres líneas de raíces transformadas (Fig. 19). Se puede observar en la figura 19 que el producto esperado, de 150 pb, se observó exclusivamente en los carriles 1, 3 y 5 correspondientes a la línea inducida con la cepa AR4.1, K559.1 y LBA9402.1, exclusivamente para el caso del gen *ro/B*, mientras que en ninguna de las líneas se logró la amplificación del *ro/D*. La falta de amplificación del gen *ro/D* puede ser debida a diferentes causas, una de ellas, es considerar que el gradiente de temperaturas de alineamiento no abarcó el óptimo para el juego de oligonucleótidos o una posible discrepancia entre las secuencias reportadas para el gen *ro/D* para el caso particular de cada cepa y la secuencia de los oligonucleótidos.

No obstante, la amplificación del gen *ro/B* es suficiente evidencia para corroborar la transformación del tejido. La principal razón para esto es que estos

genes, junto con otros de la familia *rol*, son transferidos conjuntamente en el ADN-T durante el proceso de agrotransformación, por lo tanto la presencia de uno apunta a la presencia de los demás (Mehrotra *et al.*, 2015).

Posteriormente, el gel fue analizado en un transiluminador, donde se observaron las bandas correspondientes a *rolB* con el tamaño de 150 pb, en líneas de raíces transformadas (Fig. 19).

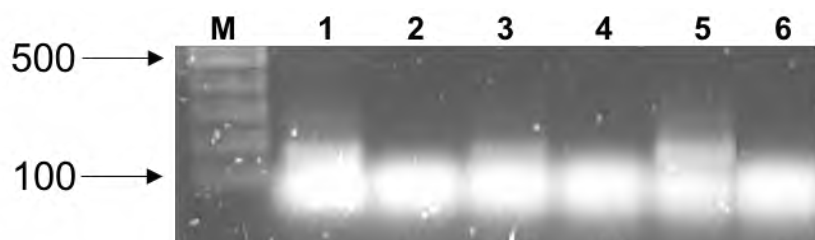


Figura 19. Amplificación de los fragmentos de los genes *rolB* y *rolD* en raíces transformadas de *S. rebaudiana*. M: Marcador de peso molecular. 1, 3 y 5: amplificación del gen *rolB* sobre ADNg de AR4.1, K599.1, LBA9402.1 respectivamente. 2, 4 y 6: amplificación del gen *rolD* sobre ADNg de AR4.1 y K599.1. Nótese el fragmento de 150 pb en los carriles 1, 3 y 5. Las señales en la parte baja del gel se debieron a exceso de oligonucleótidos.

Calderón-Gabriel (2017), en un antecedente directo a este trabajo utilizando cepas silvestres encontró resultados similares en las líneas de raíces transformadas que estableció y también amplificó solamente el gen *rolB* en los respectivos genomas. En dicho trabajo tampoco se logró la amplificación del gen *rolD* lo que sugiere un posible error de diseño de los oligonucleótidos para este gen o bien polimorfismos en cada cepa probada que afectan la correcta hibridación de los oligonucleótidos durante el paso de alineamiento.

La frecuencia de la transformación (FrT) encontrada, expresada como la relación entre raíces positivamente transformadas y el total de raíces inducidas, fue baja, entre 0.5 y 1%, estos resultados son comparables con los encontrados por Michalec-Warzecha *et al.*, (2016), al transformar a *S. rebaudiana*, quienes

alcanzaron 2% de transformación con la cepa 15834, sin embargo es significativamente más baja comparada con lo que obtuvieron con otras cepas, entre ellas LBA9402 en donde la FrT encontrada fue de 40-50%. *Abdy et al.*, (2016) también reportan FrTs de *S. rebaudiana* aproximadas de 46-49%, interesantemente en este estudio la cepa 15834 fue una de las que mayores frecuencias alcanzó, contrastantemente con lo encontrado por Michalec-Warzecha. La pasada comparación no es útil para ejemplificar lo altamente dependiente que es la transformación del protocolo de infección seguido; factores como el tipo de cepa, concentración y actividad metabólica del inóculo, y tipo de explante pueden afectar drásticamente las frecuencias de transformación. En el caso de este estudio puede mencionarse que se ha logrado un protocolo capaz de generar raíces transformadas de *Stevia*, sin embargo, no puede ser considerado aún como optimizado, principal razón por la cual se pueden justificar las bajas FrTs.

9.1.5 Establecimiento del cultivo de raíces transformadas en medio líquido

Una vez confirmada la transformación, los cultivos de raíces transformadas obtenidos con la cepa LBA9402.1, K599.1 y AR4.1 se trasladaron de medio semisólido a matraces que contenían medio líquido MS suplementado vitaminas, con sacarosa, y a diferencia de los cultivos no transformados establecidos por Alvarado-Orea (2016) dentro del grupo de trabajo, estos no requirieron de la adición de fitoreguladores de crecimiento para potenciar la acumulación de biomasa. Estos cultivos fueron subcultivados semanalmente hasta eliminar totalmente las bacterias residuales y lograr así el establecimiento de cultivos axénicos (Fig. 20).

A)



B)



C)



Figura 20. Cultivo en medio líquido de las raíces transformadas de *S. rebaudiana*. Medio MS adicionado con vitaminas. A) Raíces pilosas inducidas con LBA9402.1 B) Raíces pilosas inducidas con K599.1 C) Raíces pilosas inducidas con AR4.1.

Las líneas de raíces transformadas establecidas, después de un tiempo de incubación de 30 días adquirieron una tonalidad verde. Esto es probablemente debido a la exposición a la luz del durante el fotoperiodo, favoreciendo la transición de los amiloplastidios (presente en raíces) a cloroplastos que producen y almacenan clorofila en los tilacoides (Fig. 21) (Kobayashi *et al.*, 2013; Abdy *et al.*, 2016; Michalec-Warzecha *et al.*, 2016), indicando que permitirían que los cultivos pudieran producir metabolitos que normalmente se sintetizan en las partes verdes de la planta, tal es el caso de los glucósidos de esteviol, que se producen primordialmente a partir de la ruta MEP que es cloroplastídica. Por otra parte, Calderón-Gabriel (2017) y Jiménez-Brigada (2016), obtuvieron cultivos de raíces transformadas de *S. rebaudiana* que se caracterizaron por una tonalidad verde en presencia de luz y una producción de GEs significativamente mayor a los cultivos no transformados.

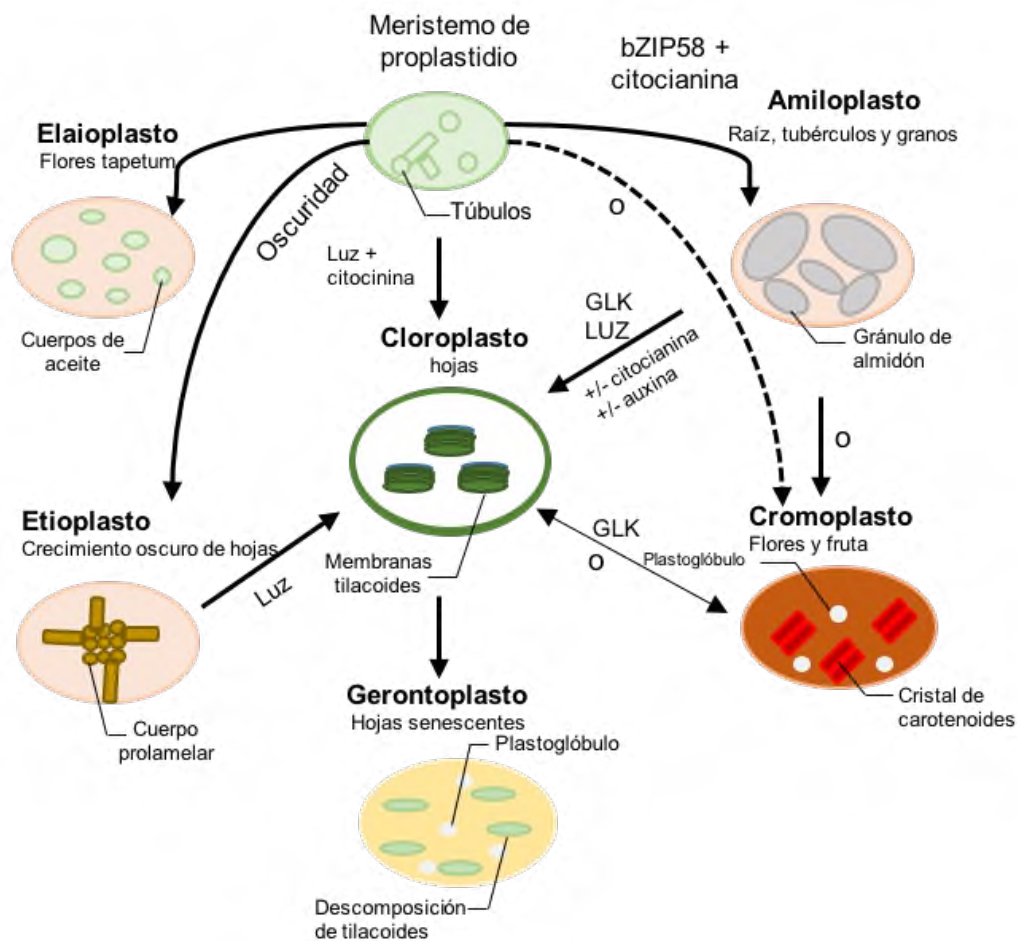


Figura 21. Esquema general de la diferenciación de plastidios.

Alvarado-Orea (2016) y Calderón-Gabriel (2017), mostraron que el crecimiento de los cultivos de raíces de *S. rebaudiana* en medio líquido en condiciones sumergidas y agitadas, favorece la acumulación de biomasa y GE, además de reportar que estos cultivos crecen formando agregados de raíces que tienen distribuidas raíces jóvenes en la superficie y un núcleo de tejido en proceso de envejecimiento.

Calderón-Gabriel (2017), además llevó a cabo la comparación de crecimiento en matraz con el crecimiento en reactor de inmersión temporal, de donde encontró que los cultivos transformados con cepas silvestres de *A.*

rhizogenes tuvieron un mejor crecimiento en cultivo sumergido alcanzando hasta 128 ± 14.1 gPF/L contra 90.1 ± 5 gPF/L en reactor. Estos reportes apuntan al potencial biotecnológico que pueden tener los cultivos establecidos en este trabajo al ser valuados en proyectos futuros en diferentes esquemas de crecimiento como lo es el crecimiento en biorreactor. Cabe mencionar que estos cultivos son metabólicamente diferentes debido inherentemente al proceso de transformación mediado por *Agrobacterium rhizogenes* albergando plásmidos binarios (Sharafi *et al.*, 2013).

Así, el cultivo de raíces transformadas *in vitro* es un sistema biotecnológicamente atractivo para la producción de compuestos de interés comercial, debido a que por su grado de especialización y organización celular pueden acumular cantidades considerables de metabolitos secundarios (Doran, 2002; Srivastava y Srivastava, 2007).

9.2 Análisis y modificación *in silico* de la secuencia de la enzima IPI1

9.2.1 Análisis de homología de la secuencia de la enzima IPI1

Como se mencionó en los antecedentes, la enzima IPI1 es una de las enzimas que ejercen mayor control metabólico, junto con la enzima DXS, sobre la ruta de biosíntesis de GE, por lo que es relativamente seguro asumir que debe haber mecanismos de regulación que actúan sobre ella a diferentes niveles. Una de las maneras más inmediatas de correlacionar la estructura de la proteína con la regulación que ejerza o a que es sujeta es la búsqueda de regiones conservadas respecto a otras proteínas que tienen funciones similares reportadas. La estructura primaria de la proteína IPI1 de *S. rebaudiana* ha sido reportada con anterioridad y puede obtenerse de bases de datos como NCBI (KT276235). Así, utilizando esta secuencia se realizaron los alineamientos múltiples en búsqueda de secuencias homólogas para estudiar la divergencia y las zonas conservadas, tal metodología es fundamental para la comprensión de la función de los grupos de secuencias de

ácidos nucleicos y de proteínas (Czar *et al.*, 2008). Sin embargo, los cambios que se pueden encontrar entre secuencias de proteínas homólogas pueden deberse a que esas proteínas, aunque tengan un origen evolutivo común pueden que realicen ahora diferentes funciones o que haya variado de acuerdo al modo de vida del organismo del que provienen (Richardson *et al.*, 2010), lo que puede repercutir en diversos cambios en la estructura tridimensional.

En este estudio, al momento de comparar secuencias homólogas de plantas dicotiledóneas, lo que realmente nos interesó fueron las zonas más conservadas, aquellas regiones que al ser fundamentales para la proteína, no han variado con el tiempo. Y en aquellas zonas conservadas, las estructuras tridimensionales se mantienen, por lo que encontrar estas zonas es de gran ayuda para predecir la estructura.

Se realizó una búsqueda de homología utilizando como secuencia original la de la enzima IPI1 de *Stevia rebaudiana* (KT276235) mediante el algoritmo de alineamiento BLAST ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Una vez realizada la búsqueda se seleccionaron de entre todos los resultados aquellos con mayor identidad de secuencia y que correspondieran a plantas (Fig. 22); las secuencias primarias de cada una de ellas se recopilaron en las bases de datos GeneBank del Centro Nacional de Información de Biotecnología de Estados Unidos (NCBI) ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) y UNIPROT (www.uniprot.org/) según la disponibilidad de la información (Ambrish *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2010).

Con las secuencias colectadas se realizó el multialineamiento usando el algoritmo de alineamiento Clustal W incluido en el paquete bioinformático MEGA 7, y se corroboraron los alineamiento con lo obtenido en la herramienta MegAlign (Czar *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2010)

El alineamiento obtenido se muestra en la figura 22 y se observó que las proteínas comparadas tienen una alta identidad (superior al 85% promedio) y que

tuvieron regiones altamente conservadas (Fig. 22), se muestra un fragmento del multialineamiento que comprende abarca las más extensas regiones conservadas de la proteína.

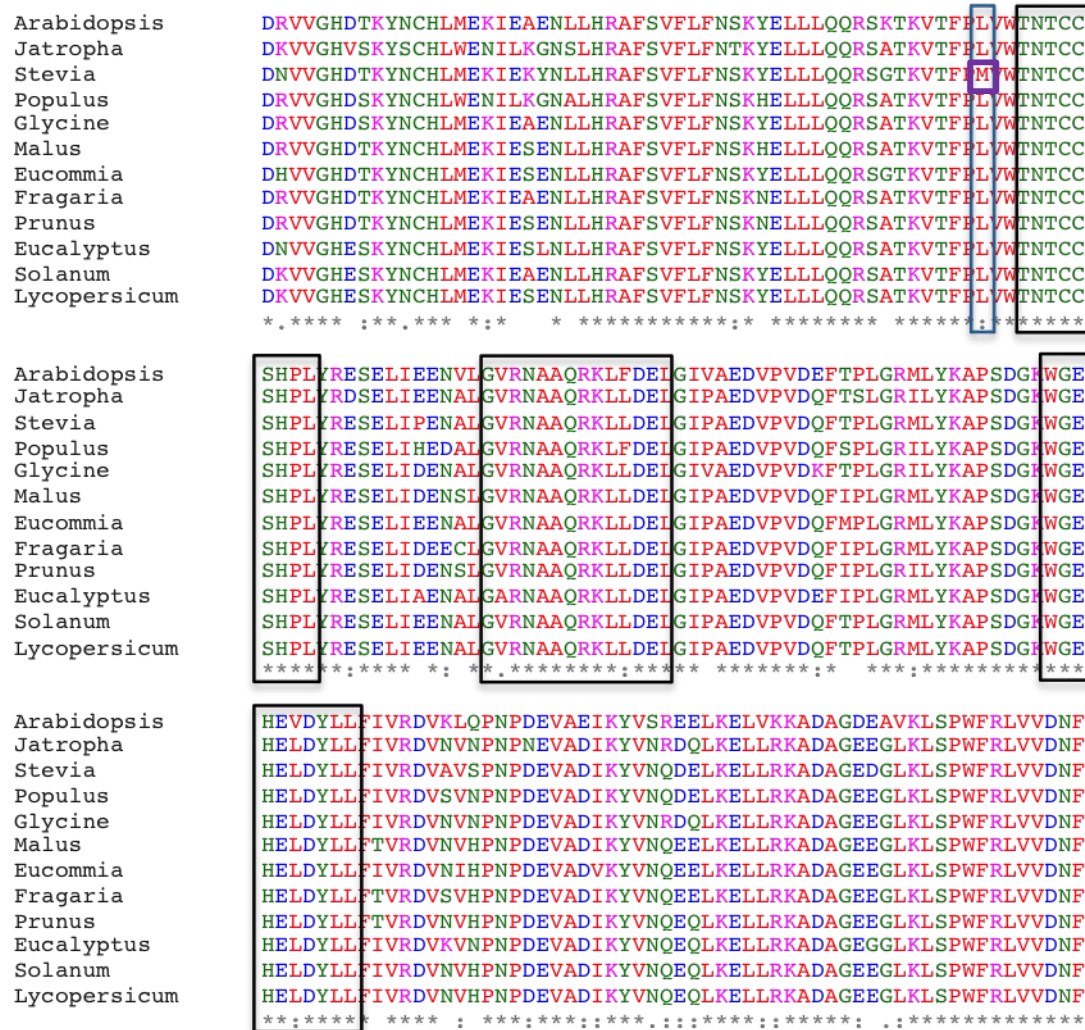


Figura 22. Alineamientos múltiples de la secuencia predicha de IPI1 con las secuencias de otras familias de plantas. *Arabidopsis thaliana* (U47324), *Jatropha curcas* (KJ908689), *Stevia rebaudiana* (kt276235), *Populus trichocarpa* (B3GEM7), *Glycine max* (I1L6A2), *Malus domestica* (XP_008345747), *Eucommia ulmoides* (AB041629), *Fragaria vesca* (XP_004302163), *Prunus persica* (EMJ06840), *Eucalyptus grandis* (A0A059DGB5), *Solanum tuberosum* (M1C547) y *Solanum lycopersicum* (EU253957). Los recuadros negros indican las regiones más conservadas entre todas las secuencias y el recuadro azul muestra el cambio en el consenso de un aminoácido en la secuencia proveniente de *S. rebaudiana*.

Los residuos de aminoácidos mostrados en el recuadro de color negro son altamente conservadas, sin embargo se puede observar el recuadro de color azul que la mayoría de las plantas se encuentra el aminoácido leucina en cambio en *S. rebaudiana* posee el aminoácido metionina (Gregorio-Ramírez *et al.*, 2017).

Ambos aminoácidos son de cadenas laterales alifáticas, sin embargo, la metionina contiene una molécula de azufre y un tioéter apolar en su cadena lateral, por lo general más hidrófilos que sus análogos alifáticos. Mientras que la leucina, su cadena lateral tiende a agruparse entre sí en las proteínas, estabilizando las estructuras proteicas a través de interacciones hidrofóbicas (Mathews, 2002).

Actualmente existen diversas investigaciones científicas que estudian las regiones conservadas de las enzimas IPI1 en diversas plantas. En el caso de *S. rebaudiana* se han identificado motivos, que son regiones altamente conservadas los cuales son TNTCCSHPL, VRNAAQRKLLDEL y WGEHELDYLL. El primero contiene dos residuos de cisteína, el segundo posee dos residuos de alanina y leucina y por último dos ácido glutámico (Fig. 22). La mayoría de las regiones conservadas mencionadas anteriormente tienen reportada una función de unión a iones metálicos para ejercer su acción, interviniendo en la unión del ion Mg^{2+} al sitio activo y, por ende, participa en la catálisis enzimática (Chen *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2014; Gregorio-Ramírez *et al.*, 2017).

9.2.2 Análisis y optimización de uso codónico de la secuencia de IPI1

Con el objetivo de diseñar una secuencia sintética que pueda ser expresada heterológamente y modificar la síntesis de GEs en cultivos de raíces transformadas de *S. rebaudiana*, se propuso analizar y optimizar el uso codónico de la secuencia codificante para la enzima IPI1. El uso codónico, que es la preferencia de ciertos organismos hacia ciertos codones durante la traducción de proteínas, permite a las secuencias expresarse de manera más eficiente y en

mayor cantidad, afectando los rendimientos de los metabolitos que sintetizan (Li *et al.*, 2013).

La secuencia nucleotídica del gen IPI1 se obtuvo de la base de datos Genbank de NCBI (KT276235.1), con una extensión de 1,278 pb correspondiente al mRNA completo de la enzima IPI1. Esta secuencia se caracterizó en el programa bioinformático Visual Gene Developer (Villalobos *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010) de donde primeramente se determinó el parámetro de índice de adaptación codónico (CAI), este parámetro indica el estado actual de la preferencia de uso de codones en la secuencia analizada (Sharp *et al.*, 1987). Este análisis requirió de la información de preferencia canónica de *Stevia rebaudiana* que se descargó en forma de la tabla de uso codónico para este organismo desde la Base de Datos de Uso Codónico del *Kazusa ADN Research Institute* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

Una vez analizada la secuencia se determinó un valor de CAI de 0.7315 en la secuencia nativa, con un contenido de GC de 45.83% que es un porcentaje relativamente bajo respecto a lo reportado para genes y genomas de origen vegetal (Kawabe *et al.*, 2003). Posteriormente, utilizando la función de optimización codónica de Visual Gene Developer, se ejecutaron rondas iterativas de optimización que progresivamente cambiaron los codones originales hacia codones preferentes de acuerdo a la tabla de uso codónico de *Stevia* y alcanzar un aumento en el valor de CAI de 5% (Tabla 9). El porcentaje de GC también se modificó hasta alcanzar un valor final de 43.46%, en la tercera iteración. En la figura 23 se muestra un alineamiento de la secuencia original de IPI1 con la secuencia obtenida de la tercera iteración de optimización.


```

# Length: 295
# Identity:   295/295 (100.0%)
# Similarity: 295/295 (100.0%)
# Gaps:      0/295 ( 0.0%)
# Score: 1548.0
#
#=====
EMBOSS_001      1  MSPSPNKMLKFSSIKTIANTLSLHRSSIQLNRFAPKSLPKTPQISFSSAL      50
|||||
EMBOSS_001      1  MSPSPNKMLKFSSIKTIANTLSLHRSSIQLNRFAPKSLPKTPQISFSSAL      50
|||||
EMBOSS_001     51  TVPRRSSATVTAGMGDDSGMDAVQRRLMFDEECILVDENDNVVGHDTKYN     100
|||||
EMBOSS_001     51  TVPRRSSATVTAGMGDDSGMDAVQRRLMFDEECILVDENDNVVGHDTKYN     100
|||||
EMBOSS_001    101  CHLMEKIEKYNLLHRAFSVFLFNSKYELLLQQRSGTKVTFPMVWNTCCS     150
|||||
EMBOSS_001    101  CHLMEKIEKYNLLHRAFSVFLFNSKYELLLQQRSGTKVTFPMVWNTCCS     150
|||||
EMBOSS_001    151  HPLYRESELIPENALGVRNAAQRKLLDELGIPAEDVPVDQFTPLGRMLYK     200
|||||
EMBOSS_001    151  HPLYRESELIPENALGVRNAAQRKLLDELGIPAEDVPVDQFTPLGRMLYK     200
|||||
EMBOSS_001    201  APSDGKNGEHELDYLLFIVRDVAVSPNPDEVADIKYVWQDELKELLRKAD     250
|||||
EMBOSS_001    201  APSDGKNGEHELDYLLFIVRDVAVSPNPDEVADIKYVWQDELKELLRKAD     250
|||||
EMBOSS_001    251  AGEDGLKLSPWFRWLVDNFLFKWMDHVQKGTLP E AIDMKTIHKLI       295
|||||
EMBOSS_001    251  AGEDGLKLSPWFRWLVDNFLFKWMDHVQKGTLP E AIDMKTIHKLI       295
|||||

```

Figura 24. Alineamiento de las secuencias proteicas de IPI1 original con la secuencia de tercera iteración de optimización. Se muestra una cobertura total del marco abierto de lectura y 100% de identidad.

Cuando se realizaron modificaciones de uso codónico se tuvo en cuenta que existe un número enorme de secuencias de ADN que pueden codificar para una misma secuencia de aminoácidos. Haciendo un cálculo hipotético, cada aminoácido podría ser codificado por un promedio de tres codones diferentes, entonces una secuencia de 430 aminoácidos podría ser codificada por alrededor de 3^{430} ($\sim 1.45 \times 10^{205}$) secuencias diferentes (Gustafsson *et al.*, 2004), por esta razón, para seleccionar la secuencia final de IPI1 se tuvo en cuenta que los parámetros determinados en las secuencias, particularmente el CAI, no incurriera

en el fenómeno de sesgo codónico (Perlak *et al.*, 1991; Lanncone *et al.*, 1997) al no sobrepasar el umbral propuesto de 5% de aumento de CAI.

Para explicar el efecto de sesgo codónico se retoma la definición del parámetro CAI, que es una medida de la similitud del uso codónico y el grupo de frecuencias de referencia (tabla de uso codónico) (Puigbo *et al.*, 2008). Los valores de CAI oscilan entre 0 y 1, donde un valor de 1 apunta a que un gen o secuencia siempre usa las mismas frecuencias que las de la tabla de referencia (Puigbo *et al.*, 2008), determinada experimentalmente para diferentes organismos. No obstante, un valor de CAI de 1 o cercano a 1 implicaría también un sesgo de uso codónico debido a la alta especificidad implícita. Este sesgo de uso codónico se ha reportado que puede tener efectos negativos en los niveles de expresión de proteínas heterólogas, resultando a menudo en efectos opuestos a lo proyectado (Gustafsson *et al.*, 2004).

Sin embargo, no existe una regla clara sobre cuanto se puede aumentar el valor de CAI de una secuencia sin incurrir en sesgo codónico, además de que rondas sucesivas de optimización pueden forzar cambios no previstos en las secuencias (Laguía-Becher *et al.*, 2010). A pesar de que la mayoría de los genes usados en transgénesis vegetal son modificados para favorecer el uso codónico de la planta receptora, hay pocos autores que indican el valor de CAI, debido a que la modificación de uso codónico es un servicio ofrecido por empresas biotecnológicas.

Así, en este trabajo se tomó una decisión de compromiso entre el aumento del CAI y la correspondiente modificación del %GC para llegar a la versión modificada con CAI de 0.7585 y %GC de 43.46.

A la secuencia generada a través de este proceso de optimización se le permitió la introducción de cambios aminoacídicos con respecto a la secuencia original de la proteína IPI1. Así, las modificaciones introducidas fueron de la

siguiente manera ácido glutámico por lisina en la posición 36 (E36K), asparagina por ácido aspártico (N95D), alanina por ácido glutámico (A103E), arginina por histidina (R112H), prolina por leucina (P119L) y metionina por leucina (M140L) (Fig. 25), ninguno de estos aminoácidos está involucrado en la estructura del sitio catalítico de la enzima y serán utilizados como una fuente de variación en la estructura que pueda revelar posibles mecanismos regulatorios a que está sujeta la enzima en futuros proyectos de expresión heteróloga de la secuencia en *Stevia rebaudiana*.

IPI1 (1,290 bp)

>5' NcoI

```
1  CCATGGTTTAATAAAA TATCAAGTCTCAAAG ATGTCACCTTCACCT AACAAAAATGTTAAAA TTTTCCTCCATAAAA
1  P W F N K Y Q V S K M S P S P N K M L K F S S I K
76  ACCATCGCCAACACA CTCTCTTTGCATCGC TCGTCAATCCAATTA AACCGCTTCGCCCCCT AAACTCTCCACCAAAA
26  T I A N T L S L H R S S I Q L N R F A P K S P P K
151  ACGCCTCAAATCTCA TTCTCCTCCGCTCTC ACTGTCCCCCGCCGG TCTTCGCCACCAGTA ACTGTGGGTATGGGT
51  T P Q I S F S S A L T V P R R S S A T V T V G M G
226  GACGATTCGGGCATG GACGCCGTCCAGAGA CGCCTCATGTTTGAT GATGAATGCATTTTG GTAGATGAGAATGAC
76  D D S G M D A V Q R R L M F D D E C I L V D E N D
301  AATGTGGTGGACAT GATACCAAATACAAC TGCCACTTGATGGAG AAGATTGAAAAATAT AATTTGCTGCACAGG
101  N V V G H D T K Y N C H L M E K I E K Y N L L H R
376  GCATTCAGTGATTT CTAATTTAATTCAAAA TATGAGTTACTCCTT CAGCAACGGTCTGGA ACCAAGGTGACATTC
126  A F S V F L F N S K Y E L L L Q Q R S G T K V T F
451  CCTCTGGTATGGACC AACACATGTTGCAGC CATCCGCTCTACAGA GAATCGGAGCTTATT CCCGAAAAATGCCCTT
151  P .L. V W T N T C C S H P L Y R E S E L I P E N A L
526  GGTGTGAGAAATGCT GCCCAGAGGAAGCTG TTGGATGAACTTGGT ATCCCTGCTGAAGAT GTTCCAGTTGATCAG
176  G V R N A A Q R K L L D E L G I P A E D V P V D Q
601  TTTACGCCTTTGGGT CGCATGCTCTACAAG GCTCCCTCTGATGGA AAGTGGGGAGAACAT GAACTTGACTACCTA
201  F T P L G R M L Y K A P S D G K W G E H E L D Y L
676  CACTTCATGTGCGA GACGTTGCTGTGAGC CCAAACCAGATGAA GTGGCAGATATCAAA TACGTGAACCGAGAC
226  H F I V R D V A V S P N P D E V A D I K Y V N R D
751  GAGTTAAGAGAGTTG CTAAGGAAGGCGGAT GCAGGGGAGGATGGG TTGAAGCCGTCTCCC TGGTTCAGGTTAGTG
251  E L R E L L R K A D A G E D G L K P S P W F R L V
826  GTTGACAACCTTCTG TTCAAATGGTGGGAT CATGTTCAAAAAGGGT ACGCTTCCTGAAGCA ATTGACATGAGAACC
276  V D N F L F K W W D H V Q K G T L P E A I D M R T
901  ATCCATAAGTTGATA TGAACCACATATGCC CCTCAACTCATTTGGT ATGGGGCTAATAGTG TTTAATCTGTCTTAG
301  I H K L I * T T Y A P Q L I G M G L I V F N L S *
976  CATGTGGTTCCTTGTG TGTGGGTTTTTGTG TCATGAGTGTAAATAA CGAGCCACGTTGGTT CTAGTCAAAAATTGG
326  H V V L V C W V F V S * V * * R A T L V L V K T W
1051  GAACTTTTTTTTTTA CATGTATTTCCTTTT CTTTCTAAGAAGATA ACTTGCTGAATTTCT ATTTTTGCTCTAAAC
351  E L F F L H V F P F L S K K I T C * I S I F A L N
1126  TTTGATCGTGCAATG GTTGAGAACGACAAG CTAAGCTGGTTAACT GAAAGAGCATCGACA GTTTTAACAAAAGTTT
376  F D R A M V E N D K L S W L T E R A S T V L T K F
1201  CATTTTTCAAAATGT TAGCTTGTGTTTTTA ACCGATTAATTTGTA AAATAAAAATATTTT CTTGTGGTGAATGGT
401  H F S K C * L V F L T D * F V K L K Y F L V V N G
1276  GTTCTCTTAGATCT
426  V L L D S
```

>3' BglII

Figura 25. Secuencia de IPI1 optimizada. Las secuencias subrayadas son sitios que reconocen las enzimas de restricción que fueron diseñadas, en verde el codón de inicio, en rojo el de paro, mientras que en el color azul se muestran los cambios de bases que modifican los aminoácidos con igualdad de características físico-químicas, previamente descritos.

9.2.3 Modelado tridimensional por homología de la IPI1 modificada

La enzima de IPI1 nativa de *S. rebaudiana* actualmente no tiene estructura tridimensional reportada, no obstante existen modelos tridimensionales reportados para enzimas relacionadas que tienen similitud de secuencia y comparten funciones catalíticas (Zhang, 2008). Dada la aplicación que se dará a la secuencia modificada de IPI1 generada en este trabajo, resultó importante conocer la posible estructura tridimensional de esta molécula e inferir si sería capaz de adquirir un plegamiento similar al de isomerasas reportadas. Para este análisis se siguió la metodología del modelado de estructuras tridimensionales por homología.

Esta metodología requiere de modelos tridimensionales (3D) de referencia que son conseguidos de bases de datos, Protein Data Bank principalmente, mediante una búsqueda de homología de secuencias y seguidamente la disponibilidad de modelos reportados (Roy *et al.*, 2010). Deduce estructuralmente la función biológica de las proteínas con base a la secuencia primaria aminoacídica (Roy *et al.*, 2010).

La construcción de los modelos 3D teóricos de IPI1 modificada, así como la recolección de los modelos de referencia se obtuvo automatizadamente a través del servidor interactivo I-TASSER (Iterative Threading ASSEmby Refinement), (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).

Se ingresaron independientemente las secuencias de las proteínas IPI1 nativa e IPI1 modificada en el servidor I-TASSER, el análisis se realizó de manera remota y tomó como los principales modelos de referencia con mayor homología a

los siguientes: estructura cristalina de IPI1 humana (PDB: 2DHO) (Fig. 26A) y la estructura tridimensional de IPI1 de *Escherichia coli* cepa K12 (PDB: 1NFS) (Fig. 26B).

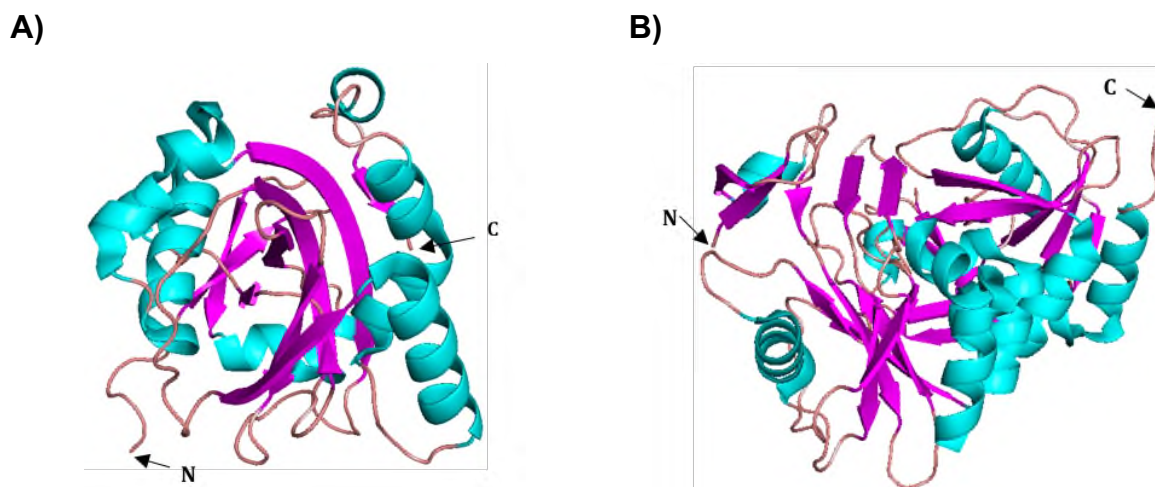


Figura 26. Principales estructuras 3D de referencia usadas en el modelado de IPI1 nativa y modificada. A) Estructura cristalina de IPI1 humana (Zhang *et al.*, 2007). B) Estructura cristalina de IPI1 de *Escherichia coli* (cepa k12) (Wouters *et al.*, 2003). (N), el extremo C-terminal (C). Visualización 3D en el programa PyMOL.

Los resultados devueltos por el servidor incluyeron 5 modelos predichos de cada estructura analizada, de los cuales el mejor modelo se muestra en la figura 27, para la estructura nativa y modificada. De manera general, los 5 modelos obtenidos se diferencian entre sí en el número de hélices, ya que en los modelos más confiables de ambas estructuras se presentaron 4 α hélices y 9 láminas β , a diferencia de otros modelos que presentaban diferentes números de hélices.

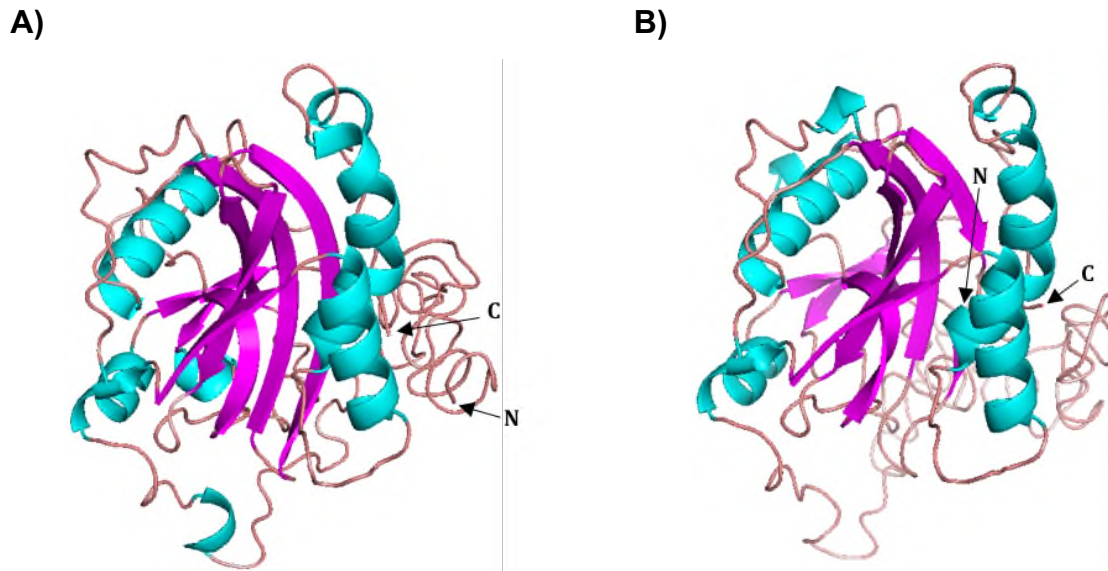


Figura 27: Modelos estructurales de IPI1 nativa y modificada. A) Estructura modelada de la proteína nativa. B) Estructura modelada de la proteína modificada. El extremo N-terminal (N), el extremo C-terminal (C). Visualización 3D en el programa PyMOL.

La precisión de predicciones cada uno de los modelos 3D puede ser expresada cuantitativamente a través del parámetro *C-score*. El *C-score* es una estimación de la confianza de los modelos predichos y es calculado basándose en la significancia (*Z-score*) de los alineamientos hechos automáticamente en el programa LOMETS, (local meta-threading server) y la convergencia (densidad de clusters) de las simulaciones de I-TASSER (Zhang, 2008). Los puntajes del *C-score* se encuentran típicamente entre -5 y 2, en donde un puntaje más alto refleja un modelo de mejor calidad y confianza (Roy *et al.*, 2010).

Así, el valor de *C-score* de la mejor estructura 3D de la proteína nativa fue -1.95 mientras que en la estructura correspondiente a la proteína modificada fue de -2.12, lo que indica que los modelos predichos tienen un aceptable grado de confianza, sin embargo dado que ambos valores no sobrepasaron un *C-score* -1.5 da cabida a la mejora de la predicción del modelo si se extienden los modelos tridimensionales de referencia hacia otras especies (Ambrish *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015).

Como se mencionó anteriormente, durante el análisis de la secuencia original, la enzima IPI1 posee regiones conservadas que han sido correlacionadas con la actividad catalítica y la unión a cofactores metálicos (Wei *et al.*, 2014; Gregorio-Ramírez *et al.*, 2017). En la figura 28, se muestran dichas regiones en los dos modelos tridimensionales generados; donde las hojas β y hélice α se observan en ambos modelos (proteína nativa y modificada) prácticamente en la misma distribución espacial, lo que permite conjeturar que la función podría mantenerse en la proteína IPI1 modificada cuando se exprese *in vivo*.

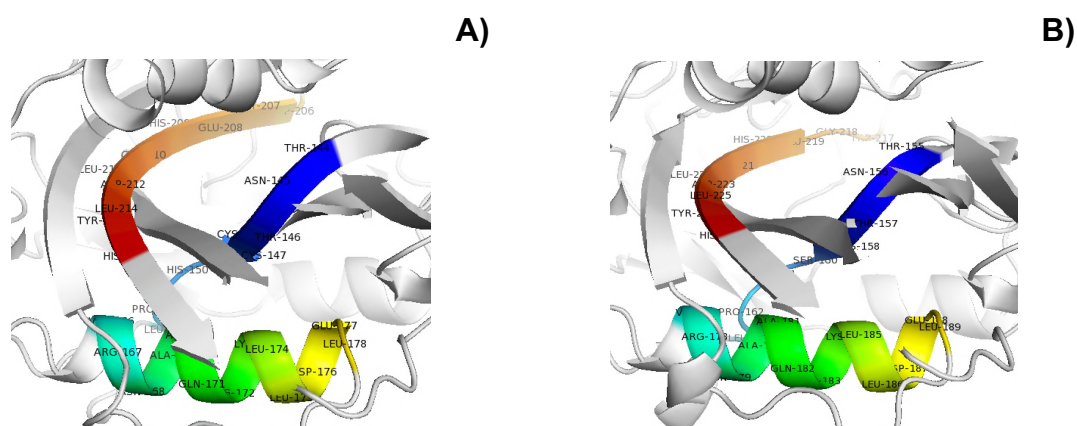


Figura 28. Disposición espacial de regiones conservadas involucradas en la unión de Mg^{2+} en los modelos 3D predichos. A) IPI1 nativa y B) modificada.

Por último los modelos predichos de IPI1 fueron validados a través del análisis de su gráfico *Ramachdran* que permite determinar la factibilidad de los ángulos de enlace y, por ende, asegurar la correcta conformación de las estructuras. El gráfico *Ramachdran* de una representación de la intervención de cada aminoácido en las estructuras ya que en él se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos dihédricos Ψ (psi) y Φ (phi) (Xiong, 2006).

En la figura 29 se muestran los diagramas *Ramachdran* de cada modelo tridimensional predicho. Cada punto en los cuadrantes representa un aminoácido de la secuencia con su combinación de ángulos dihédricos, en la medida que estos puntos no se alejen de los perímetros de tolerancia definidos por los contornos azules y amarillos, las posiciones que describen son más factibles en

una estructura 3D real. Así, puede observarse que la mayoría de los aminoácidos y sus ángulos para cada modelo (proteína nativa y predicha) se encuentran en zonas de tolerancia, indicando que el modelado por homología de estas proteínas es bueno, aunque aún susceptible de mejorarse a través de la inclusión de diferentes modelos de referencia o información estructural parcial.

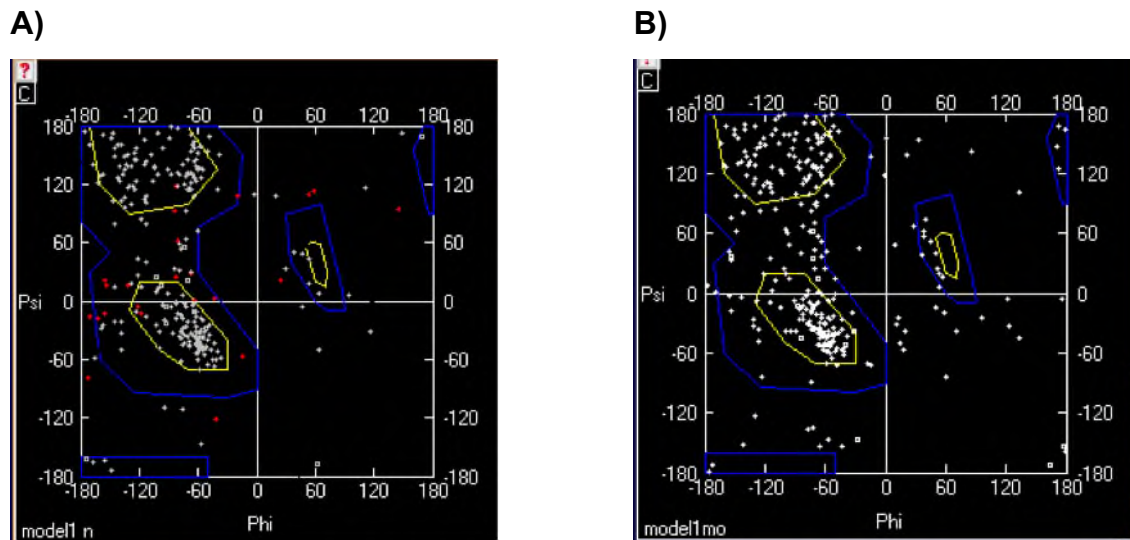


Figura 29. Gráficos *Ramachandran* de los modelos tridimensionales predichos. A) Modelo de IPI1 nativa. B) Modelo de IPI1 modificada. En ambos diagrama, el primer cuadrante se encuentran las combinaciones de las estructuras hélices α con giro hacia la izquierda, el segundo cuadrante muestra las combinaciones de la hoja β y en el tercer cuadrante las de las estructuras α hélices con giro hacia la derecha y los loops. Las cruces y los cuadrados representan a glicinas, los aminoácidos permitidos y los no permitidos.

9.3 Construcción del vector quimérico pCAMPIM

La secuencia modificada de IPI1 generada y descrita en secciones anteriores debía ser insertada en el vector pC1105.1 para generar al vector binario pCAMPIM, este estrategia fue seguida *in silico* y de manera experimental.

9.3.1 Ensamblaje *in silico* de los elementos de la construcción pCAMPIM

Se realizó la simulación *in silico* para confirmar el funcionamiento de la estrategia experimental propuesta figura.6, así como también detectar posibles problemas en las reacciones de digestión, inserción direccional y reconocimiento de secuencias por las enzimas de restricción *NcoI* y *BglII*. Los resultados obtenidos fueron de gran utilidad para las interpretaciones y análisis a nivel molecular de las técnicas de clonación y electroforesis. Además se verificó que el marco de lectura estuviera en fase correcta.

El ensamblaje requirió de un análisis previo de la secuencia de IPI1 modificada en el software Gene Designer 2.0 (Villalobos *et al.*, 2006). Este programa posee una interfaz que permite ordenar los elementos que se deseen en el casete de expresión. De esta forma se insertaron las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *NcoI* y *BglII* en los extremos de la secuencia modificada de IPI1, estas secuencias de reconocimiento para las enzimas se eligieron debido a que solamente cortan una sola vez en el vector pC1105.1 en un sitio de clonación justo entre el promotor 35S y el gen reportero GUSPlus, permitiendo la clonación direccional dentro del vector. El casete de expresión completo incluyó, además de la secuencia codificante, la región 3' no traducida del ARN mensajero (ARNm) que contiene al sitio de unión a ribosoma y la región 5' no traducida que contiene la secuencia de terminación de la transcripción (Fig. 30).

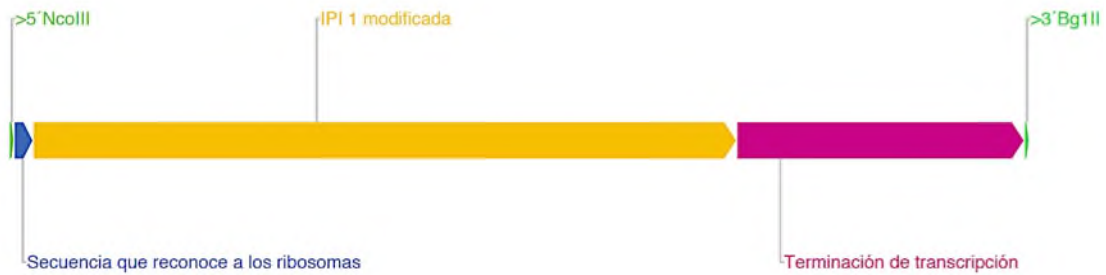


Figura 30. Casete de expresión de IPI1 modificada.

Un análisis de secuencia mediante la herramienta de búsqueda de marcos abiertos de lectura (ORF) permitió detectar que había un sitio más de reconocimiento de la enzima *NcoI*, que se eliminó al realizar un cambio silencioso de CCATGG a CCCTGG para eliminar dicho sitio sin alterar el ORF, de ésta forma se evitaría una digestión inespecífica.

Con todas las secuencias definidas y compiladas en el software SnapGene se generó la figura 31 que muestra el ensamblaje de la secuencia de IPI1 modificada con el vector pC1105.1 que dio como resultado la construcción pCAMPIM (13,413 pb).

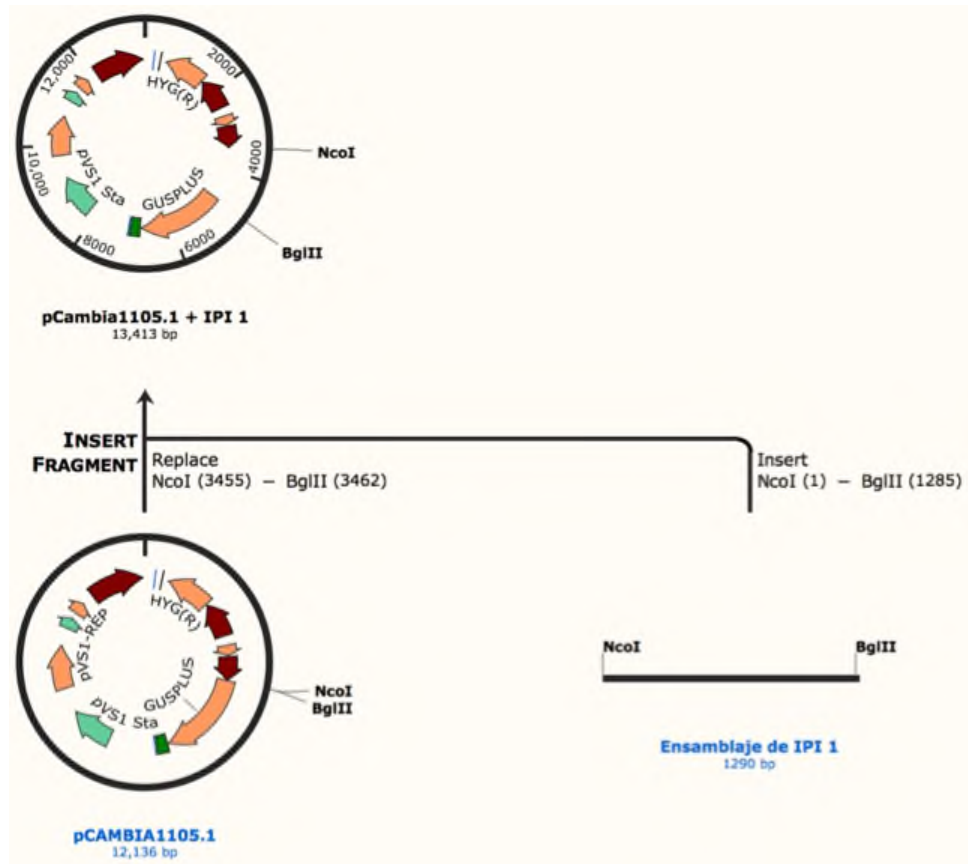


Figura 31. Ensamblaje *in silico* del plásmido binario pC1105.1 con la secuencia modificada de IPI1 (pCAMPIM).

Posteriormente, se simuló un corrimiento electroforético en agarosa al 1% de los fragmentos resultantes de una restricción con las enzimas *NcoI* y *BglII* que debería liberar el inserto correspondiente a IPI1 modificada (Fig. 32). En el gel simulado se visualizaron dos bandas, la primera fue de alto peso molecular (12,129 bp) que corresponde al plásmido *backbone* del vector binario, y la segunda banda de menor peso molecular (1,290 bp) correspondiente a IPI1 modificada (Fig. 32).

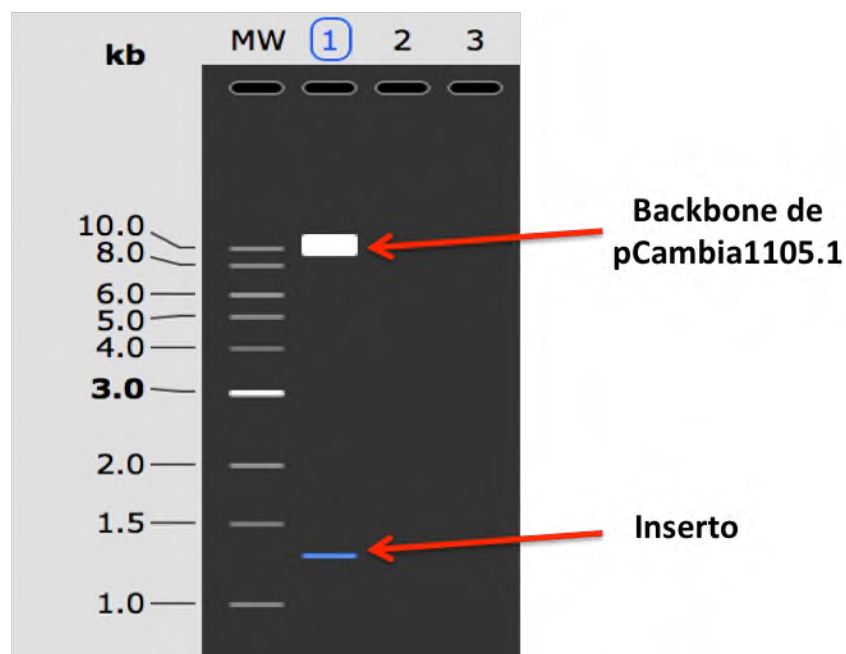


Figura 32. Simulación del corrimiento electroforético de la digestión del vector pCAMPIM. Gel de agarosa al 1%; MW: marcador de peso molecular.

Estos resultados de digestión son los esperados del escrutinio una vez que se lograra la clonación experimental descrita a continuación.

9.3.2 Clonación molecular de los elementos de la construcción pCAMPIM

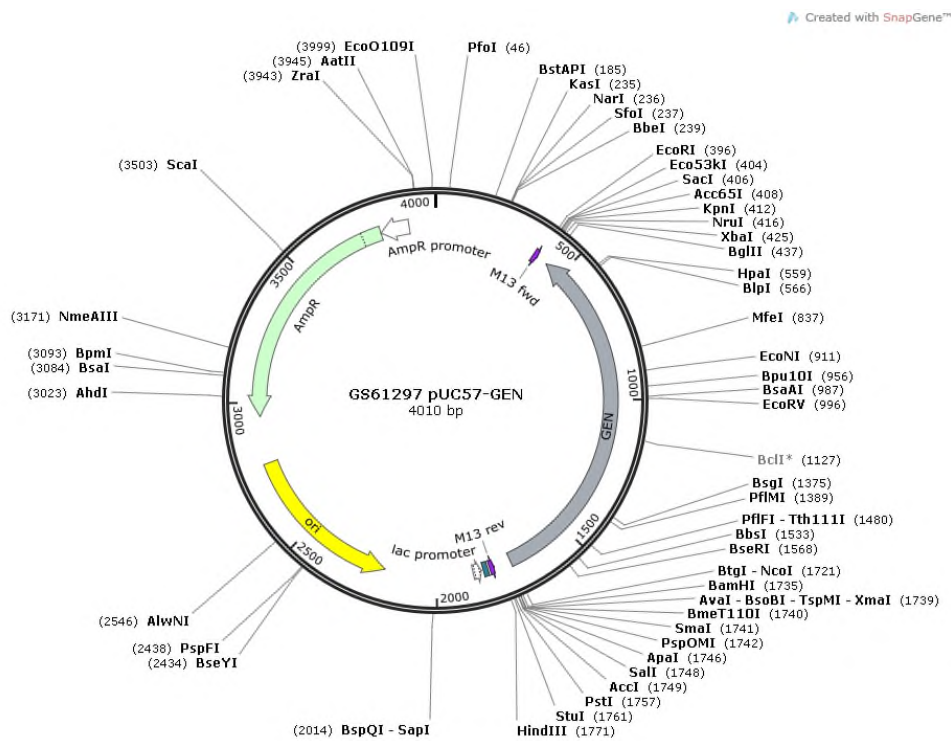
9.3.2.1 Recuperación del vector de clonación pUC57-IDI1

El gen IPI1 modificado fue sintetizado por la empresa OligoT4 y subclonado en el vector pUC57-IDI1 (4,010 pb) con los sitios de restricción *Nco*I y *Bgl*II de acuerdo al diseño mostrado anteriormente. El plásmido pUC57-IDI1 (Fig. 33A) fue entregado en liofilizado, por lo que se resuspendió y se utilizó para electroporar células competentes de *E. coli* DH5 α previamente preparadas.

A las colonias que crecieron en medio de cultivo LB selectivo, se les realizó extracción de ADN plasmídico y fueron caracterizadas mediante análisis de

restricción usando la enzima *BglII* y *NcoI* para liberar el fragmento correspondiente a IPI1 modificada (IPI1M) (Fig. 33B). De esta manera se lograron identificar dos colonias que fueron transformadas de forma positiva, crecieron en medio selectivo y liberaron fragmentos aproximadamente de 1,290 pb correspondientes al inserto esperado (Fig. 33B). Estas colonias fueron criopreservadas y adicionadas al cepario bacteriano del laboratorio. Estas cepas fueron el reservorio del vector pUC57-IDI1 al cual se regresó para obtener el inserto IPI1M y ser usado en los posteriores experimentos de ligación y transformación.

A)



B)

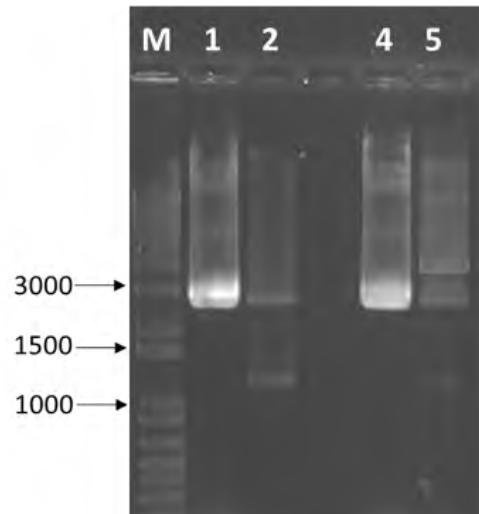


Figura 33. Análisis de restricción del vector pUC57-IPI1. A) Mapa de restricción del vector pUC57-IPI1. B) Resultado de la digestión enzimática del vector pUC57-IPI1 con la enzima *Nco*I y *Bgl*II. M: Marcador de peso molecular. 1 y 4: ADN plasmídico sin digerir. 2 y 5: Plásmidos PUC-57-ID11 digeridos.

9.3.2.2 Obtención del vector pC1105.1 linealizado

El vector pCamSrDXS, utilizado previamente en el grupo de trabajo (Jiménez-Brigada 2016) que incluye el backbone pC1105.1 y una secuencia modificada de la enzima DXS en el sitio de clonación mencionado anteriormente para la construcción del vector pCAMPIM fue utilizado como fuente de vector pC1105.1 linealizado.

La cepa de *E. coli* que contenía el vector pCamSrDXS fue caracterizada mediante análisis de doble restricción con *Nco*I y *Bgl*II (Fig. 34) para liberar el fragmento de DXS (2,200 pb) y recuperar el plásmido vacío en forma lineal (12,136 pb). Los fragmentos resultantes de la digestión se muestran en la figura 34.

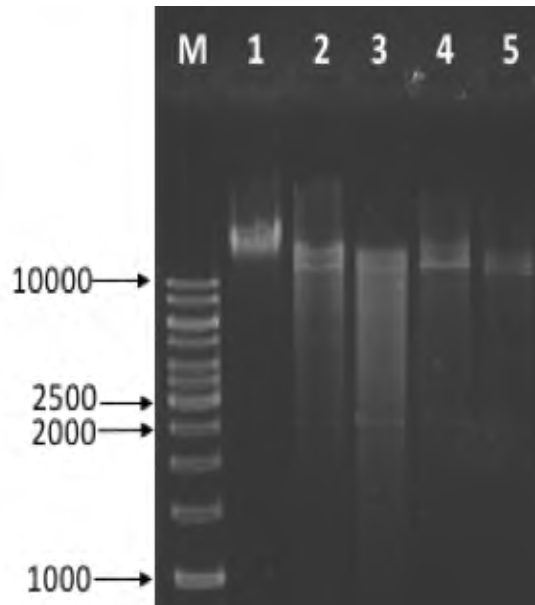
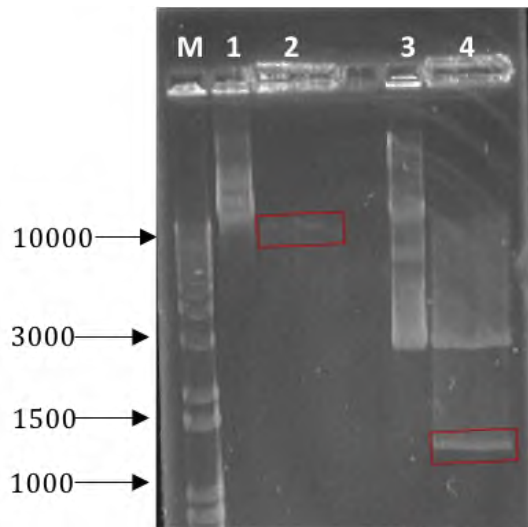


Figura 34: Digestión del vector pCamSrDXS con *Nco*I y *Bgl*II. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular. 1: ADN plasmídico sin digestión. 2, 3, 4 y 5: Plásmidos pCamSrDXS digeridos.

Para proseguir con la construcción del vector pCAMPIM, tanto la secuencia IPI1M y el vector vacío fueron purificados a partir de geles de agarosa para continuar con los experimentos de ligación (Fig. 35).

A)



B)

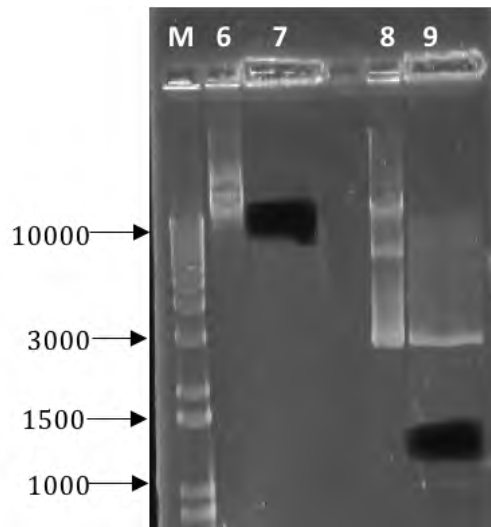


Figura 35. Geles de agarosa (1%) preparativos para la purificación de los fragmentos IPI1M y el vector binario pCAMBIA1105.1. A) Visualización de los fragmentos de pC1105.1 linealizado y de IPI1M 1 y 3: Plásmidos sin digerir pCamSrDXS y pUC57-IDI1. 2 y 4: ADN plasmídico correspondiente digeridos con *Nco*I y *Bgl*II. B) Vector e inserto removido en el gel de agarosa. 6 y 8: Plásmidos sin digerir pCamSrDXS y Puc-57. 7 y 9: Plásmidos de pCAMBIA1105.1 e IPI1 sometidos con doble restricción enzimática (*Nco*I y *Bgl*II).

Los fragmentos purificados de gel fueron cuantificados por espectrofotometría. Los resultados de cuantificación se muestran en la Tabla 10. La cuantificación fue importante para la determinación de las proporciones inserto:vector para la ligación molecular.

Tabla 10. Cuantificación espectrofotométrica de los productos purificados de gel.

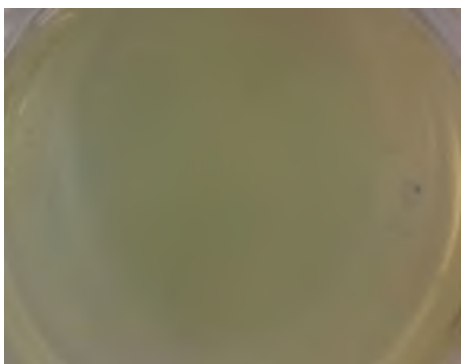
Plásmido/Inserto	Concentración de ácido nucleico	Unidad	260/280
pC1105.1	12.2	ng/μg	2.00
pC1105.1	45.3	ng/μg	1.6
IPI1M	20.9	ng/μg	1.71
IPI1M	74.0	ng/μg	1.67

Una vez obtenido el vector e inserto con extremos cohesivos y purificados, se llevó a cabo la ligación ocupando una relación inserto/vector 3:1. Las reacciones de ligación se dejaron en incubación por dos horas a temperatura ambiente y 20 minutos para la inactivación. Posteriormente se los productos de ligación se usaron para electroporación de células competentes de *E. coli*.

9.3.2.3 Electroporación de *E. coli* DH5α con los productos de ligación

En la figura 36, se pueden observar cajas petri con medio selectivo LB-agar, donde no hubo crecimiento de ninguna colonia que contuviera el vector pCAMPIM. Este resultado se obtuvo en repetidas ocasiones aún después la repetición de las mezclas de ligación. Una de las razones pudo ser la diferencia de concentración de estreptomicina como agente selectivo (0, 30, 50 y 100 mg/mL), la relación inserto/vector utilizada, la competencia de las células y el estado de las celdas de electroporación debido a su reuso. De esta manera se exploró utilizar otras alternativas para la transformación bacteriana.

A)



B)

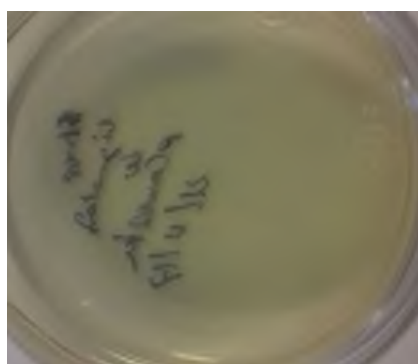


Figura 36. Placas con medio LB-agar adicionado con estreptomicina. A) Control negativo de crecimiento y B) Células transformadas con mezclas de ligación del vector pCAMPIM.

9.3.2.4 Transformación por choque térmico de células *Escherichia coli* One Shot con productos de ligación

Debido a los recurrentes resultados negativos de transformación con la técnica de electroporación, se optó por utilizar células químicamente competentes comerciales de la cepa bacteriana de *Escherichia coli* One Shot Top10 (Invitrogen) como receptora de la construcción. La transformación se realizó mediante la técnica por choque térmico, descrita en la sección de materiales y métodos.

Después de seguir el protocolo de transformación, las células fueron sembradas en medio LB-Agar, obteniendo numerosas colonias (Fig. 37). A estas colonias, posiblemente transformadas, se les extrajo ADN plasmídico de buena calidad. Las relaciones de pureza con respecto a proteínas de estas muestras, para todas las colonias analizadas, fueron aceptables para los siguientes análisis de confirmación de la presencia del vector completo pCAMPIM.

A)



B)



Figura 37. Placas con medio LB-agar adicionado con estreptomicina. A) Control negativo de crecimiento. B) Células bacterianas transformadas con el vector pCAMPIM.

En la figura 38 se muestran, en los primeros carriles del gel (1 al 6), los plásmidos extraídos y sus digestiones con la enzima unicorte *EcoRI* que deberían generar una sola banda del peso aproximado del vector pCAMPIM (13,413 pb). En los carriles 2, 4 y 6 se pueden observar esas bandas aproximadas.

Además en la figura 38, a partir del carril 7 y hasta el 12 se muestran las amplificaciones por PCR usando los oligonucleótidos pCambseqF y pCambseqR que generarían un fragmento de 1,508 pb en caso de haber incorporado el inserto. Ninguna de estas muestras mostró el amplificado por lo que se asumió que ninguna colonia analizada tenía el vector pCAMPIM. En el último carril se incluyó un control positivo de amplificación sobre una región de 250 pb del promotor 35S, la banda observada indica que muy probablemente hubo una re-circularización de los plásmidos vacíos, antes de la ligación del inserto.

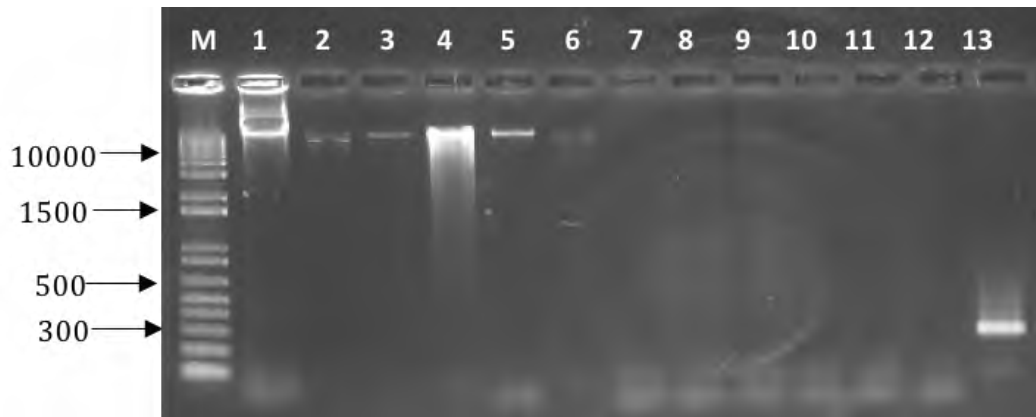


Figura 38: Caracterización de los plásmidos extraídos de colonias resultantes del proceso de transformación por choque térmico con el vector pCAMPIM. M: Marcador de peso molecular. 1, 3 y 5: Plásmidos pCAMPIM sin digerir. 2, 4 y 6: Plásmidos pCAMPIM digeridos con *EcoRI*. 7-12: Amplificación de IPI1M sobre plásmidos pCAMPIM. 13: Amplificación de un fragmento del promotor 35S, control positivo de amplificación.

Dado que la falta de amplificación en los experimentos de amplificación por PCR pudo ser debida a que las condiciones de amplificación de los oligos no estaba optimizada o a posibles errores en el diseño de la secuencia de los mismos, se decidió realizar experimentos de digestión adicionales sobre los plásmidos extraídos antes de descartar la exitosa ligación de los fragmentos.

Así el ADN fue digerido con las enzimas *SpeI* y *PstI*, que generarían un patrón de restricción con fragmentos dos fragmentos; uno de 2,263 pb y uno de 11,150 pb (Fig. 39A). Para este análisis se extrajo ADN plasmídico de colonias adicionales a los ya antes analizadas. Desafortunadamente, ninguna de las colonias generó el patrón de restricción esperado (Fig. 39A carriles 1-12) aumentando la probabilidad de que la ligación no haya sido exitosa.

Con la finalidad de agotar las probabilidades de encontrar una colonia con la construcción pCAMPIM, se analizaron por PCR para con los oligos pldidseqF y pldidseqR (ver sección de materiales y métodos) esperando ver un fragmento de aproximadamente 200 pb correspondiente a la presencia de la secuencia IPI1M,

aunque los resultados (Fig. 39B) tampoco fueron positivos en ningunos de los casos.

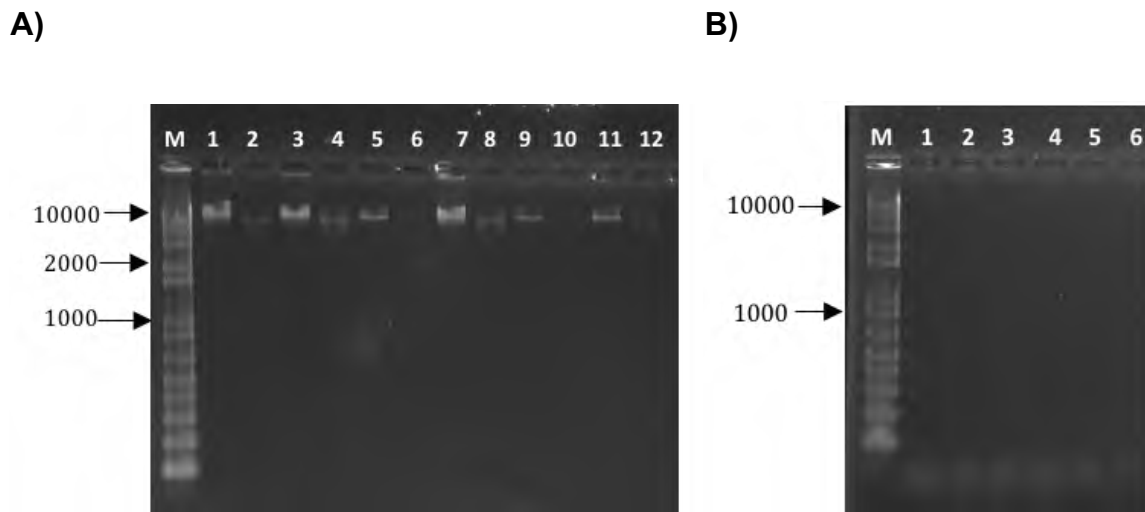


Figura 39: Segunda ronda de análisis sobre los plásmidos extraídos de colonias resultantes del proceso de transformación por choque térmico con el vector pCAMPIM. M: marcador de peso molecular. A) 1-12 Digestiones con *SpeI* y *PstI* de la ligación pCAMPIM. B) 1-6: Amplificación de un fragmento de IPI1M1.

Después de la serie de experimentos anteriormente descrito en los que no se obtuvo algún resultado favorable para la transformación se cerró la etapa experimental de este proyecto. Un análisis integral de los resultados apunta a diferentes causas para que no se lograra la construcción del vector pCAMPIM.

Uno de los primeros problemas podría ser el método de transformación. En este caso el método principal a utilizar fue electroporación, que ya había dado buenos resultados en el grupo de trabajo y en el presente durante la incorporación del plásmido pC1105.1 a las cepas silvestres de *A. rhizogenes*, no obstante los últimos experimentos apuntan que posiblemente las células de *E. coli* preparadas no estuvieran completamente competentes y eso dificultará la captación de los productos de ligación. Por otro lado, este método de transformación depende en gran medida de la integridad de las celdas de electroporación, por lo que es poco recomendable usarlas más de una vez, sin embargo se tuvo que hacer reciclaje de

celdas para seguir la experimentación, aunque cabe mencionar que en contadas ocasiones se observó la aparición de arco eléctrico durante el pulso de voltaje, que indicaría un fallo total de la transformación debido al estado de las celdas o la fuerza iónica presente en la mezcla de ligación. Probablemente la combinación de estos factores llevó a los resultados antes expuestos.

Así, al intentar una nueva metodología de transformación usando células competentes comerciales se minimizaba el efecto de la falta de competencia, no obstante los resultados fueron negativos de igual manera apuntando esta vez al proceso de ligación. Este último proceso depende en gran medida de dos factores: la proporción inserto/vector utilizada y la actividad de la enzima Ligasa que cataliza la unión de los extremos cohesivos en los fragmentos. El cálculo de la proporción inserto/vector fue de acuerdo a lo reportado típicamente (3:1) y se calculó de manera meticulosa después de la cuantificación de los fragmentos por espectrofotometría.

La enzima ligasa pudo haber no tenido la totalidad de su actividad, aunque experimentos que mostraran su actividad no fueron hechos, por ejemplo en la religación de fragmentos pequeños y su análisis electroforético en búsqueda de escalonamiento de los pesos moleculares, no obstante no había ninguna señal que hiciera dudar la actividad de la enzima.

Otro potencial problema, derivado de la presencia del vector pC1105.1 en las colonias que crecieron en medio selectivo, fue la re-circularización espontánea del vector antes de integrar el inserto IPI1M, no obstante este efecto fue observado aún después de usar la enzima fosfatasa alcalina sobre los fragmentos antes de la ligación.

De esta manera se sugiere que los resultados negativos con respecto a la construcción del plásmido pCAMPIM se generaron por causas multifactoriales que

requerirán de la optimización de condiciones experimentales, a través de diseños experimentales, en futuros proyectos en esta línea de investigación.

9.4 Articulación de los elementos de la estrategia de ingeniería metabólica propuesta

La biosíntesis de GEs en *Stevia rebaudiana* ha sido estudiada principalmente a nivel de la determinación de los pasos catalíticos que componen la ruta. Actualmente se conocen la totalidad de esos pasos pero los mecanismos de regulación y cómo está distribuido el control metabólico son campos de estudio relativamente poco explorados.

Así, la propuesta de ingeniería metabólica de este trabajo sugiere la expresión de una versión modificada de la enzima IPI1, en cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana*, para evaluar los efectos en el crecimiento y producción de GE en estos cultivos. Además de ofrecer información que pueda correlacionarse con los mecanismos de regulación de la ruta biosintética y, eventualmente, poder modificarlos también para lograr aumentar de manera significativa los rendimientos producción de GE.

Los cultivos de las raíces transformadas establecidos en este trabajo con las cepas LBA9402.1, K599.1 y AR4.1 de *A. rhizogenes* serán empleados como cultivos de referencia, junto con cultivos de raíces no transformadas, para la comparación completa de cultivos de raíces transformados con la secuencia modificada del IPI1.

10. CONCLUSIONES

Se logró establecer cultivos de raíces transformadas de *S. rebaudiana* con las cepas LBA9402.1, K599.1 y AR4.1 de *A. rhizogenes* incluyen el ADN-T del vector pCAMBIA1105.1.

Se encontró que el valor del parámetro CAI pudo ser mejorado significativamente sin llegar a sesgos de uso codónico o cambios extensivos de la secuencia de aminoácidos aun cuando se hizo sobre una secuencia endógena.

El modelado molecular por homología permitió predecir la estructura tridimensional de las proteínas IPI1 nativa y modificada, con un buen nivel de confianza (C-score -1.95 y -2.2 respectivamente) y apego a modelos 3D reportados de moléculas con homología estructural.

Los dominios conservados involucrados en la unión de cofactores metálicos resultaron tener una gran similitud estructural en los modelos predichos para IPI1 nativa y modificada.

Al momento las condiciones de clonación molecular de la secuencia modificada de IPI1 en el vector pC1105.1 no dieron resultados positivos, lo que indica que la construcción del plásmido pCAMPIM requerirá de la optimización de condiciones experimentales, a través de diseños experimentales, en futuros proyectos en esta línea de investigación.

11. PERSPECTIVAS

Caracterizar los cultivos de raíces establecidos en este trabajo y compararlos con los que se establezcan en el futuro, transformados con la secuencia IPI1M, en términos de su velocidad de crecimiento y productividad de GE.

En función de los resultados de acumulación de GE de los cultivos, proponer el papel de la enzima IPI1 y sus modificaciones en la regulación de la ruta biosintética, por ejemplo por mecanismos de modificación estructural de la enzima o debidos a la sobreexpresión y eficiencia de traducción de la secuencia IPI1M.

Utilizar los materiales biológicos y ensamblajes génicos generados en este trabajo para generar el vector pCAMPIM a través de condiciones experimentales optimizadas de clonación molecular para construir y/o optar por la síntesis comercial del plásmido completo.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdy IZ, Morteza M, Mansour O (2016) Production of stevioside by hairy root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Sh. Veheshti University, international, congress Center, Tehran I. R of Iran.
2. Ahmad N, Rab A, Ahmad N, Fazal H (2018) Differential pH-Induced biosynthesis of steviol glycosides and biochemical parameters in submerge root culture of *stevia rebaudiana* (Bert.). Society for Sugar Research and Promotion.
3. Altamura MM (2004) *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* and *rolD* genes: regulation and involvement in plant development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 77: 89–101.
4. Alvarado-Orea IV, Montes-Palmeros M, Vera-Reyes I, Lira-Saldívar RH, Pavón-Orozco P, Huerta-Heredia AA (2016) Steviol glucosides production in *Stevia rebaudiana* Bertoni root culture Producción de glucosidos de esteviol a partir de raíces *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Mexican Journal of Biotechnology*. 1(1):12-20.
5. Ambrish R, Alper K, Yang Z (2010) I-Tasser: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 5; 725-738.
6. Arpan RM, Sandip R, Poonam K, Armi P, Subhash N (2013) Analysis of differentially expressed genes involved in stevioside biosynthesis in culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni treated with Steviol as an immediate precursor. *Journal of Plant Growth Regulation*. 33: 481-488.
7. Arya A, Kumar S (2018) *Agrobacterium* pathology and Ti plasmid based vector desing. ResearchGate. DOI: 10.13140/RG.2.2.18345.49769.
8. Ávalos GA, Pérez-Urria EC (2009) Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2(3):119-145.

9. Berthelot K, Estevez Y, Deffieux A, Peruch F (2012) Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Journal Biochimie*. 94:1621-634.
10. Brandle JE y Telmer PG (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*. 68: 1855–1863.
11. Brijwal L, Tamta S (2015) *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC. *SpringerPlus* 4: 443.
12. Calderón-Gabriel L, Jiménez–Brigada A, Huerta–Heredia AA, Capataz-Tafur J, García-López E (2017) Crecimiento de raíces transformadas y no transformadas de *Stevia rebaudiana* en reactores de inmersión temporal. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
13. Calderón-Gabriel L, Jiménez–Brigada A, Huerta–Heredia AA, García-López E (2016) Effect of three strains of *Agrobacterium rhizogenes* and explant type on genetic transformation of *Stevia rebaudiana*. *Mexican Journal of Biotechnology*. 1(1):34-41.
14. Chen R, Harada Y, Bamba T, Nakazawa Y, Gyokusen K (2012) Overexpression of an isopentenyl diphosphate isomerase gene to enhance trans-polyisoprene production in *Eucommia ulmoides* Oliver. *BioMed Central Biotechnology* 12:78.
15. Cortés-Tolalpa, Beatriz SC, Cervantes-Salinas A, Antonio GM, Gosset G, Escalante A, Bolívar F (2011) Ingeniería de vías metabólicas en *Escherichia coli* para la producción de Shikimato como precursor para la síntesis de compuesto antivirales contra influenza. ISSN-0188-137X.
16. Czar M, Anderson J, Bader J, Peccoud J (2008) Gene synthesis demystified. *Trends in Biotechnology*. 27(2); 63-72.
17. Díaz GC, Chaparro-Giraldo A (2012) Plant genetic transformation methods. *Revista Actualidad y Divulgación Científica*. 15: 49-61.
18. Doran P, Oksman-Caldentey K, Wolfgang HB, Marcel D (2002) Properties and application of hair root cultures en biotechnology plants transgenic plants. *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*. DOI: 10.1201/9780203910849.ch7.

19. Durbecq V, Sainz G, Oudjama Y, Clantin B, Bompard-Gilles C, Tricot C, Caillet J, Stalon V, Droogmans L, Villeret V (2001) Crystal structure of isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase. *The EMBO Journal*. 20: 1530-1537.
20. Espinosa SR (2012) Theoretical foundations of transformation in plant cells. *Journal de Ciencia e Ingeniería*. 4; 17–26.
21. Figlan S, Makunga NP (2017) Genetic transformation of the medicinal plant *Salvia runcinata* L. f. using *Agrobacterium rhizogenes*. *South African Journal of Botany*. 112:193-202.
22. Fu X, Ying ZP, Chen JQ, Shangguan XC, Wang X, Zhang QF, Peng DY (2004) Production of chlorogenic acid and its derivatives in hairy root cultures of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63:262-268.
23. García L E, Gloria R R E, Gomez G O, Calva C B G (2014) MALDI-TOF Characterization of hGH1 produced by hairy root cultures of *brassica oleracea* var. italica grown in an airlift with mesh bioreactor. *Biotechnology Progress*. 1:161-71.
24. Garro G, Ramijan K, Blanco B, Lam K, Alvarenga S (2012) Implementación de un protocolo para la producción de raíces pilosas (hairy roots) de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) mediante transformación con *Agrobacterium rhizogenes*. *Tecnología en Marcha*. 25(3):28-38.
25. Garro-Monge G, Jimenez-Quesada K, Alvarenga-Venuolo (2014) Molecular-genetic characterization of *Stevia rebaudiana* processed materials using microsatellite technique. *Tecnología en Marcha*. 3; 32-40.
26. Giri A, Ravindra TS, Dhingra V, Lakshmi NM (2001) Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current Science*. 81 (4):378-382.
27. Goyal SK, Samsher, Goyal RK (2010) *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 61:1-10.
28. Gregorio-Ramírez O, Huerta-Heredia A.A, García-López E. (2017) *In silico*

- modification of the isopentenyl pyrophosphate isomerase 1 enzyme from *Stevia rebaudiana* useful for metabolic regulation study. Mexican Journal of Biotechnology 2(2):161-168. ISSN:2448-6590.
29. Gupta P, Sharma S, Saxena S (2010) Callusing in *Stevia rebaudiana* (Natural Sweetener) for steviol glycoside production. International Science Index, Biotechnology and Bioengineering. 4 (12): 893-897.
 30. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshall J (2004) Codon bias and heterologous protein expression. Trends in Biotechnology. 22(7):346-353.
 31. Hu B, Du M (2006) Hairy root and its application in plant genetic engineering. Journal of Integrative Plant Biology. 48 (2):121-127.
 32. Hunter WN (2007) The Non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. The Journal of Biological Chemistry. 282 (30): 21573-21577.
 33. Iannaccone R, Grieco P, Cellini F (1997) Specific sequence modifications of a cry3B endotoxin gene result in high levels of expression and insect resistance. Plant Molecular Biology. 34(3):485-496.
 34. Jackson AU, Tata A, Wu C, Perry RH, Haas G, West L, Cooks RG (2009) Direct analysis of *Stevia* leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*. 134:867-74.
 35. Jarma-Orozco A, Miguel CE (2010) Nutritional aspects and metabolism of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) a review. *Agronomía Colombiana*. 28: 199-208.
 36. Jiménez-Brigada A, Calderón-Gabriel L, Gregorio-Ramírez O, Huerta-Heredia AA, García-López E (2016) Agrotransformación de *Stevia rebaudiana* con el plásmido pCAMBIA 1101.5. XVII Congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería.
 37. Kaushik R, Narayanan P, Vasudevan V, Muthukumaran G, Antony U (2010) Nutrient composition of cultivated *Stevia* leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *Journal of Food Science Technology*. 47: 27–33.
 38. Kawabe A, Miyashita NT (2003) Patterns of codon usage bias in three dicot and four monocot plant species. *Genes Genet Syst*. 78(5):343-352.

39. Kobayashi K, Sasaki D, Noguchi K, Fujinuma D, Komatsu H, Kobayashi M, Sato M, (2013) Photosynthesis of root chloroplasts developed in *Arabidopsis* lines overexpressing GOLDEN2-LIKE transcription factors. *Plant Cell Physiology*. 54(8): 1365–1377.
40. Kryvenki M, Kosky RG, Guerrero D, Dominguez M, Reyes M (2008) Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bertoni en medios de cultivos semisólidos. *Biotecnología vegetal*. 2: 91-98.
41. Kumar YS, Guleria P (2014) Steviol Glycosides from *Stevia*: Biosynthesis Pathway Review and their application in foods and medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 52:988–998.
42. Kyung K M, Kang HJ, Ho K J, Hwan O S, Cheon L P (2015) Metabolic engineering of the *Stevia rebaudiana* ent-kaurenebiosynthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 214: 95–102.
43. Laguía-Becher M, Martín V, Kraemer M, Corigliano M, Yacono M, Goldman A, Clemente M (2010) Effect of codon optimization and subcellular targeting on *Toxoplasma gondii* antigen SAG1 expression in tobacco leaves to use in subcutaneous and oral immunization in mice. *BMC Biotechnology*. 10(1):1-14.
44. Lengliz R, Gorsane F, Majoul H, Fakhfakh H (2009) Molecular and phenotypical characterization of transgenic tomato plants: *Solanum lycopersicon*. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 823: 33-40.
45. León P, Guevara-García A (2015) La síntesis de isoprenoides a través de la vía MEP, un nuevo blanco de manipulación para la salud y el beneficio humano. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXI. ISSN-0188-137X.
46. Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L (2010) *Biología y mejoramiento vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuario.
47. Li R, Li R, Li X, Fu D, Zhu B, Tian H, Luo Y, Zhu H (2017). Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnology Journal*. 16(2): 415-427.

48. Li X, Li S, Lang Z, Zhang J, Zhu L, Huang D 2013. Chloroplast-targeted expression of the codon-optimized truncated cry1Ah gene in transgenic tobacco confers a high level of protection against insects. *Plant Cell Reports*. 32(8):1299-1308.
49. Mathews CK, Van Holde K, Ahern KG (2002) *Bioquímica 3 Edición* Perason Addison Wesley. ISBN: 978-84-7829-053-6.
50. Mehrotra S, Srivastava V, Rahman LU, Kukreja AK (2015) Hairy root biotechnology—indicative timeline to understand missing links and future outlook. *Protoplasma*. 252:1189–1201.
51. Michalec-Warzecha A, Pistelli L, D’Angiolillo F, Libik-Konieczny M (2016) Establishment of highly efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for *Stevia rebaudiana* Bertoni explants. *Acta Biologica Cracoviensia. Series botánica*. 58(1):113–118.
52. Ministerio de Salud Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos (2009) Año de Homenaje a Raúl Scalabrini Ortiz.
53. Mitchell T, Gregory NS (2012) Metabolic engineering: enabling technology for biofuels production. *Wires energy and environment*, 2:165–172.
54. Molphe-Balch EP, Ramírez-Malagón R, Nuñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo (1999) *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. ISBN 968-6259-62-7.
55. Montes-Palmeros M, Alvarado-Orea V., Pavón-Orozco, García-López E, Huerta-Heredia AA (2016) Steviol glucosides production in micropropagated seedlings of *Stevia rebaudiana* elicited with methyl jasmonate. *Mexican Journal of Biotechnology*. 1(1):113-119.
56. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioAssays with tabacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. 15 :473-497.
57. Pandey H, Pandey P, Shanker PS, Singh S, Banerjee S (2016) Meeting the challenge of stevioside production in the hairy roots of *Stevia rebaudiana* by probing the underlying process.
58. Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect

- control protein genes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 88(8):3324-3328.
59. Phillips MA, D'Auria JC, Gershenzon J, Pichersky E (2008) The *Arabidopsis thaliana* type I Isopentenyl Diphosphate Isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. The Plant Cell. 20: 677-696.
60. Puigbo P, Bravo IG, Garcia-Vallvé S (2008) E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). BMC Bioinformatics, 9, 65. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-9-65>.
61. Razak U, Ong CB, Yu TS, Lau LK (2014) *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. Brazilian Archives of Biology and Technology. 57 (1): 23-28.
62. Richardson S, Nunley P, Yarrington R, Boeke J, Bader J (2010) Gene Design 3.0 is an updated synthetic biology toolkit. Nucleic Acids Research. 38(8):2603–2606.
63. Richardson S, Wheelan S, Yarrington R, Boeke J (2008) Gene Design: Rapid, automated design of multikilobase synthetic genes. Genome Research. 16; 550-556.
64. Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nature Protocols. 5: 725-738.
65. Sambrook J, Russell D (2001) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third edition. Volume 1.
66. Sarker RH, Biswas A (2002) *In vitro* plantlet regeneration and *Agrobacterium* mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L). Plant Tissue Culture. 12(2): 155-165.
67. Savita SM, Sheela K, Sunanda S, Shankar, AG y Ramakrishna P (2004) *Stevia rebaudiana*: A functional component for food industry. Journal of Human Ecology. 15: 261–264.

68. Serna PA, Molphe-Balch EP (2004) Generation of grapefruit and sweet lime transgenic roots and plantlets via *Agrobacterium rhizogenes*. *Revista fitotecnia Mexicana*. 3; 251-259.
69. Sharafi A, Hashemi S, Azadi P, Allah S (2013) Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. *Physiology Molecular Biology Plants*. DOI: 10.1007/s12298-013-0217-z.
70. Sharp PM, Li W-H (1987) The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acid Research*. 15(3):1281-1295.
71. Sheela C, Ramesh C (2011) Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry Reviews*. 10:371–395.
72. Sheikh RA, Shohag HM, Sutradhar P, Yasmin S (2016) An efficient protocol for *in vitro* regeneration of *Stevia rebaudiana*. *Asian Journal of Medical and Biological Research*. 2 (1): 95-106.
73. Shivanand P, Noopur S (2010) Recombinant DNA technology and genetic engineering a safe and effective meaning for production valuable biologicals. *International Journal of pharmaceutical sciences review and research*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 1:14-20.
74. Smith RH (2000) *Plant tissue culture, technique and experiments*. Segunda edición. Academic Press. EUA 231 pp.
75. Sreedhar RV, Venkatachalam L, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Narayan MS, Ravishankar GA (2008) Direct organogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana* and cultivation in bioreactor. *Biologia Plantarum*. 52(2):355-360.
76. Srivastava S, Srivastava AK (2012) *In Vitro* Azadirachtin Production by Hairy Root Cultivation of *Azadirachta indica* in Nutrient Mist Bioreactor. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 166:365–378.
77. Stanton BG (2003) *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and molecular biology reviews*. 67; 16-37. DOI: 10.1128/MMBR.67.1.

78. Sykłowska BK, Pietrosiuk A, Gawron A, Kawiak A, Lojkowska E, Jeziorek M, Chinou I (2011) Enhanced production of antitumour naphthoquinones in transgenic hairy root lines of *Lithospermum canescens*. *Plant Cell*. 108: 213-219.
79. Tadhani MB, Patel VH, Subhash R (2007) *In vitro* antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition Analysis*. 20: 323–329.
80. Tzfira T, Citovsky V (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 17:147–154
81. Valimehr S, Sanjarian F, Haleh Hashemi H, Sharafi A, Sabouni F (2014) A reliable and efficient protocol for inducing genetically transformed roots in medicinal plant *Nepeta pogonosperma*. *Physiology Molecular Biology Plants*. 20(3):351–356.
82. Vázquez Baxcajaj L (2012) Cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis de Maestría. Campus Montecillo.
83. Villalobos A, Ness J, Gustafsson C, Minshull J, Govindarajan S (2006) Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial ADN segments. *BMC Bioinformatics*. 7 (285);1-8.
84. Wanke M, Tudek KS y Swiezewska E (2001) Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate/2-Cmethyl-D-erythritol-4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. *Acta Biochimica Polonica*. 48: 663–672.
85. Wei L, Yin L, Hu X, Fang C (2014) A novel chloroplastic isopentenyl diphosphate isomerase gene from *Jatropha curcas*: Cloning, characterization and subcellular localization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 17: 296-303.
86. Wölwer-Rieck U (2012) The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 4:886-95.
87. Wu J, Baldwin I (2010) New Insights into Plant Responses to the Attack from Insect Herbivores. *Annual Review Genetics*. 44;1–24.

88. Xiong J (2006) Essential bioinformatics. ISBN:10 0-521-60082-0.
89. Yadav SK, Guleria P (2012) Steviol glycosides from *Stevia*: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 52:988–998.
90. Yang J, Zhang Y (2015) Protein structure and function prediction using I-TASSER. *Current protocols bioinformatics*. 52: 5.81-5.815.
91. Yang YT, Bennett GN, San KY (1998) Genetic and metabolic engineering. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3:0717-3458.
92. Yang z, Rannala B (2012) Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews/ Genetics*. 13: 303-314.
93. Zahra AL, Morteza M, Mansour O (2016) Production of stevioside by hairy root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Congreso internacional de genéticas*.
94. Zhang Y (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 9: 40.
95. Zhang Y, Liu L, Xu H, Wei Z, Wang Y, Lin Y, Gong W (2007) Crystal structure of human IPP isomerase: new insights into the catalytic mechanism. *Journal of Molecular. Elsevier*. 366, 1437–1446.
96. Zhao B, Agblevor FA, Ritesh KC, Jelesko JQ (2013) Enhanced production of the alkaloid nicotine in hairy root cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell*. 113 (1): 121-129.
97. Zorrilla-López U, Masip G, Arjó G (2013) Engineering metabolic pathways in plants by multigene transformation. *The International Journal of Developmental Biology* 57: 565-576.