



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE INGENIERÍA
DOCTORADO EN INGENIERÍA DE BIOSISTEMAS**

**“PRODUCCIÓN DE GLUCÓSIDOS DE ESTEVIOL EN ESTEVIA BAJO CONDICIONES
DE INVERNADERO, APLICANDO FACTORES MODIFICADORES DEL METABOLISMO”**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INGENIERÍA DE BIOSISTEMAS**

PRESENTA:

M.C. MA. CRISTINA VÁZQUEZ HERNÁNDEZ

DIRIGIDO POR:

DR. RAMÓN G. GUEVARA GONZÁLEZ

Dr. Ramón G. Guevara González
Presidente

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Secretario

Dra. Rosalía V. Ocampo Velázquez
Vocal

Dr. Enrique Rico García
Suplente

Dr. Irineo Torres Pacheco
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Enero, 2020
México

DEDICATORIAS

A mi esposo Serafín Jiménez por apoyarme siempre y darme la fuerza para continuar aun cuando yo misma creo que no puedo más.

A mis hijos: Eduardo Guadalupe, Naomi y Ángel Serafín por soportar mis ausencias y amarme tanto.

A mi familia: Mi mamá, mi papá, mis hermanas y hermano, y mis suegros por todo su apoyo y cariño.

A mis compañeros y amigos Humberto y Aurora que siempre estuvieron a mi lado en las buenas y las malas.

Y a Dios por permitirme terminar esta etapa de mi vida profesional, fueron cuatro años de aprendizaje y de grandes vivencias.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, al Dr. Ramón Gerardo Guevara González (Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Facultad de Ingeniería campus Amazcala) por permitir realizar la presente investigación dentro de sus instalaciones y por el apoyo y guía en la realización de este proyecto.

A la Dra. Ana Angélica Feregrino (Laboratorio de Metabolitos y Nanocompositos, Facultad de Ingeniería campus Aeropuerto) por el apoyo brindado para la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Rosalía V. Ocampo, Dr. Enrique Rico y al Dr. Irineo Torres, miembros del Cuerpo Académico de Biosistemas y del comité para la revisión y evaluación del presente proyecto por el apoyo brindado y los comentarios realizados para la mejora de esta investigación.

Al Dr. Dietmar Schwarz por todo el apoyo brindado por la realización de la estancia doctoral en el Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops en Alemania.

A CONACyT por los fondos destinados a beca de manutención y beca mixta.

A mis amigos, compañeros de maestría y doctorado, colaboradores en el laboratorio A4 de Biotecnología de Plantas de la Facultad de Ingeniería campus Amazcala, Gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT.....	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
2.2 ANTECEDENTES.....	7
2.2.1 Descripción <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni).....	7
2.2.2 Variedades.....	10
2.2.3 Requerimientos agroecológicos	12
2.2.4 Glucósidos de esteviol (SGs).....	13
2.2.5 Ruta de biosíntesis de SGs.....	16
2.2.6 Extracción y purificación de SGs	19
2.3 SISTEMA DE DEFENSA DE PLANTAS	21
2.3.1 Respuesta de defensa	21
2.3.2 Elicitores	23
2.3.3 Respuesta adaptativa al estrés	25
2.4 HORMESIS	27
2.5 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN	28
2.5.1 Cultivo a cielo abierto.....	28
2.5.2 Cultivo bajo condiciones de invernadero	29
III. HIPOTESIS	31
3.1 HIPÓTESIS	31
IV. OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	32
4.1.1 Objetivos Particulares	32
V. METODOLOGÍA	33
5.1 UBICACIÓN DEL ÁREA DE EXPERIMENTACIÓN.	33
5.2 APLICACIÓN DE ELICITORES EN CULTIVO DE <i>STEVIA REBAUDIANA</i> BERTONI BAJO INVERNADERO.	34
5.3 MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	34
5.4 ESPECIFICACIONES DEL INVERNADERO	35
5.5 SISTEMA DE RIEGO	36
5.6 MANEJO DEL CULTIVO.....	36
5.7 TRATAMIENTOS DE ELICITACIÓN	36
5.7.1 Ácido salicílico (AS).....	37
5.7.2 Quitosan (CH)	37
5.7.3 Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	38
5.8 DISEÑO DEL EXPERIMENTO.....	38

5.8.1	<i>Distribución de las plantas de estevia en el invernadero</i>	40
5.9	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	40
5.10	DETERMINACIÓN LOS NIVELES DE GLUCÓSIDOS DE ESTEVIOL EN PLANTAS DE <i>STEVIA REBAUDIANA</i> BERTONI	41
5.11	VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA	42
5.11.1	<i>Extracción y purificación de ARN</i>	42
5.11.2	<i>RT-PCRs</i>	43
5.11.3	<i>RT-qPCR</i>	44
5.12	MEDICIÓN DE VARIABLES MORFOLÓGICAS.....	46
5.13	ELABORACIÓN DE PROTOCOLO PARA REPRODUCCIÓN ASEJUAL DE PLANTAS DE ESTEVIA	46
5.14	CAMBIOS EN LA METILACIÓN DE LAS SECUENCIAS CpG-ADN ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON ELICITORES	48
5.14.1	<i>Extracción de ADN y análisis de metilación CpG-ADN</i>	49
5.15	EVALUACIÓN DEL EFECTO HORMÉTICO EN PLANTAS DE ESTEVIA, APLICANDO ÁCIDO SALICÍLICO.....	49
VI	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
6.1	CULTIVO DE PLANTAS DE <i>S. REBAUDIANA</i>	51
6.2	APLICACIÓN DE ELICITORES	51
6.3	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	52
6.4	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCÓSIDOS DE ESTEVIOL	55
6.5	DINÁMICA DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE PLANTAS DE ESTEVIA, APLICANDO ELICITORES	56
6.6	CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE LA PLANTA DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS DE ELICITACIÓN	60
6.7	CORRELACIÓN DE VARIABLES DE RESPUESTA EN FUNCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE ELICITACIÓN	62
6.8	PROTOCOLO PARA REPRODUCCIÓN ASEJUAL DE PLANTAS DE ESTEVIA.....	63
6.9	ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS EN LA METILACIÓN DE LAS SECUENCIAS CpG-ADN ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON ELICITORES.....	64
6.9.1	<i>Cambios en los niveles de metilación CpG-ADN</i>	64
6.9.2	<i>Respuesta morfológica de las plantas a los tratamientos de elicitación</i>	65
6.10	EVALUACIÓN DEL ESTADO HORMÉTICO DE PLANTAS DE ESTEVIA APLICANDO ÁCIDO SALICÍLICO	66
6.10.1	<i>Dinámica de la expresión genética de plantas de estevia, aplicando ácido salicílico</i> 66	
6.10.2	<i>Cambios en la morfología de la planta después de los tratamientos con ácido salicílico</i>	68
VI.	CONCLUSION.....	70
VIII.	REFERENCIAS	71
IX.	ANEXOS.....	84
ANEXO 1.	PROTOCOLO: EXTRACCIÓN RNA MÉTODO TRIZOL	84
ANEXO 2.	PROTOCOLO: SÍNTESIS DE CDNA	86
ANEXO 3.	PROTOCOLO: PCR PUNTO FINAL.....	87
ANEXO 4.	PROTOCOLO: PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA 1.2% PARA DNA/cDNA.....	89
ANEXO 5.	PROTOCOLO: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA RELATIVA POR QRTPCR	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. Elaboración propia con información de (Rather <i>et al.</i> , 2019).	8
Cuadro 2. Variedades de <i>S. rebaudiana</i> y su contenido de Glucósidos de esteviol. Elaboración propia de acuerdo con información de (Carrascal, 2016; González-Chavira <i>et al.</i> , 2018; González <i>et al.</i> , 2014).....	11
Cuadro 3. Grupos R, formulas moleculares, pesos moleculares y potencia de los principales SGs presentes en <i>S. rebaudiana</i> . Elaboración propia de acuerdo con información de (Prakash <i>et al.</i> , 2014)	14
Cuadro 4. Métodos para extracción de SGs a partir de hojas secas de estevia. Elaboración propia de acuerdo con información de (Ferrazzano <i>et al.</i> , 2016)	20
Cuadro 5. Nomenclatura para el análisis de los tratamientos de elicitación. Elaboración propia con información de (Mejía-Teniente <i>et al.</i> , 2013).....	37
Cuadro 6. Elicitores aplicados vía foliar en plantas de <i>S. rebaudiana</i> . Elaboración propia con información de (Mejía-Teniente <i>et al.</i> , 2013).....	39
Cuadro 7. Secuencias de oligonucleótidos específicos para los genes implicados en la síntesis de glicósidos de esteviol en <i>S. rebaudiana</i> , condiciones de alineación y tamaño de banda esperado. Elaboración propia con información de (Guleria & Yadav, 2013; Hajihashemi & Geuns, 2017).	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación SGs en hojas de estevia cuantificadas en mg de SGs por g de muestra seca.....	55
Tabla 2. Contenido de SGs en estevia, reportado como mg de glucósido de esteviol por gramo de muestra seca.	56
Tabla 3. Cambios morfológicos en plantas de estevia, aplicando eliciores. Las letras indican una diferencia significativa entre los tratamientos según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p = 0.05$).....	61
Tabla 4. Correlación multivariada de respuesta a los tratamientos de elicitación.....	62
Tabla 5. Respuesta morfológica a los tratamientos de elicitación de las plantas de estevia (<i>Stevia rebaudiana</i>).....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>S. rebaudiana</i> B. a) Variedad Eirete. b) Variedad Morita II. UAQ Campus Amazcala. Elaboración propia, 2019.	8
Figura 2. Estructura de glucósidos de esteviol (Steviosido y Rebaudiosido A). Elaboración propia con información de (Tada <i>et al.</i> , 2012)	15
Figura 3. Diagrama esquemático de la ruta biosintética de SGs. Elaboración propia con información de (Kumar <i>et al.</i> , 2012).....	17
Figura 4. Ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol. Elaboración propia con información de (Guleria & Yadav, 2013).....	18
Figura 5. Clasificación de eustresores con base en su naturaleza. Elaboración propia con información de (Vázquez-Hernández <i>et al.</i> , 2019a).	25
Figura 6. Diagrama de hormesis. Efecto dosis-respuesta de la aplicación de elicitores. Elaboración propia, 2020; con datos de Vargas-Hernandez <i>et al.</i> 2017.....	28
Figura 7. Ubicación de la UAQ Campus Amazcala. Amazcala, municipio de El Marqués, estado de Querétaro. Elaboración propia con información de Google maps 2019.....	33
Figura 8. Línea de tiempo para la aplicación de elicitores. Elaboración propia, 2019.....	34
Figura 9. Plántulas de <i>S. rebaudiana</i> var. Morita II. Elaboración propia, 2019.	34
Figura 10. a) Vista frontal y b) lateral del invernadero para producción de plántula. UAQ Campus Amazcala. Elaboración propia, 2019.	35
Figura 11. Diseño del experimento (T1, T2, T3, T4: Tratamientos, C1, C2, C3: concentraciones de los elicitores, p1, p2, p3, p4, p5 y p6: Número de planta) (Modificado de Reyes, 1997). <i>S. rebaudiana</i> var. Morita II. Elaboración propia, 2019.	39
Figura 12. Diagrama de distribución de plantas de estevia en el invernadero de plántula. Elaboración propia, 2019.	40
Figura 13. Programa para RT-PCR punto final. Elaboración propia, 2019.....	44
Figura 14. Programa estandarizado para RT-qPCR. Elaboración propia, 2019.	44
Figura 15. Placa para reacciones de RT-qPCR. Ordenamiento para carga de reacciones: Blancos (B1, B2, B3) y del gen constitutivo de β -actina (HK). Elaboración propia, 2019.	45
Figura 16. Plantas madre de estevia (<i>s. rebaudiana</i> B. var. Morita II) para reproducción asexual. Elaboración propia, 2019.	47
Figura 17. Línea de tiempo de la aplicación de elicitores a plantas de <i>S. rebaudiana</i> var. Eirete. Elaboración propia, 2019.	48
Figura 18. Plantas de <i>S. rebaudiana</i> Morita II. a) Recepción de plantas. b) Trasplante a peat moss: perlita (50:50) y establecimiento en el invernadero de plántula. Elaboración propia, 2019.....	51

Figura 19. Aplicación de elicitors via foliar a plantas de estevia. Elaboración propia, 2019.....	52
Figura 20. Colecta de muestras después de la elicitación. Elaboración propia, 2019.	53
Figura 21. Liofilizadora LABCONCO modelo Freezone 10. UAQ Campus Aeropuerto. Elaboración propia, 2019.....	54
Figura 22. Muestra de estevia. a) liofilizada, b) pulverizada. Elaboración propia, 2019.....	54
Figura 23. Expresión génica. Expresión relativa de genes involucrados en la producción de glucósidos de esteviol en plantas de <i>S. rebaudiana</i> var. Morita II. Elicitors aplicados: dH ₂ O ₂ (agua destilada), SA (ácido salicílico), CH (chitosán), H ₂ O ₂ (peróxido de hidrógeno). Las letras indican una diferencia significativa entre los tratamientos según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p = 0.05$). Elaboración propia, 2019.	58
Figura 24. Dinámica de la expresión génica. Resumen de los cambios en la expresión génica en la vía biosintética de los glucósidos de esteviol- MEP, con aplicación de elicitors. La descripción en cada panel corresponde a: a) SA (0.1 mM), b) CH (1500 mM), c) H ₂ O ₂ (20 mM). Simbología; Las flechas verdes indican la sobreregulación y las flechas rojas indican la repression en la regulación d los genes, ? Indica genes desconocidos. Se muestran los tratamientos con diferencia significativa de expresión génica y contenido de SGs. Elaboración propia, 2019.	59
Figura 25. Morfología de plantas de estevia al término del experimento. a) Control (agua destilada), b) SA 0.1 mM. Elaboración propia, 2019.	61
Figura 26. Heatmap X-Y de la correlación multivariada de respuesta a los tratamientos de elicitación. JMP 7.0. Elaboración propia, 2019.....	63
Figura 27. Esquema del protocolo de reproducción asexual de plantas de estevia. Elaboración propia, 2019.....	63
Figura 28. Plantas obtenidas a partir del protocolo de esquejado. Elaboración propia, 2019.	64
Figura 29. Porcentaje de metilación en plantas elicitadas con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂ a 200 mM). Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$). Elaboración propia, 2019.	65
Figura 30. Expresión génica con aplicación de ácido salicílico. Expresión relativa de genes involucrados en la producción de glucósidos de esteviol en plantas de <i>S. rebaudiana</i> var. Morita II. Elicitors aplicados: dH ₂ O ₂ (agua destilada), SA (ácido salicílico). Las letras indican una diferencia significativa entre los tratamientos según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p = 0.05$). Elaboración propia, 2020.....	67
Figura 31. Cambios morfológicos en plantas de estevia, aplicando elicitors. Las letras indican una diferencia significativa entre los tratamientos según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p = 0.05$). Elaboración propia, 2020.	69
Figura 32. Hormesis de estevia. Efecto dosis-respuesta en plantas de estevia con la aplicación de ácido salicílico (Concentraciones en mM). Elaboración propia, 2020.	70

RESUMEN

Las plantas son organismos sésiles que están expuestos constantemente a diferentes estímulos ambientales que pueden causar estrés. Como mecanismo de defensa para sobrevivir y continuar su ciclo de vida, estos organismos modifican su metabolismo y pueden aumentar la producción de metabolitos especializados como respuesta. Los eustresores son factores que actúan mimetizando el efecto del estrés ambiental y pueden ser de origen biótico o abiótico. Los elicitores son factores biológicos que aplicados vía foliar estimulan el sistema de defensa de las plantas y pueden incrementar la producción de metabolitos especializados. *Stevia rebaudiana* Bertoni es una hierba perene, nativa de Paraguay que tiene un poder edulcorante de hasta 300 veces más que la sacarosa, además de propiedades antihipertensivas, anticariogénicas, antiinflamatorias, anticancerígenas, entre otras. Los compuestos responsables de estas propiedades son los glucósidos de esteviol (SGs), los cuales son metabolitos derivados de los terpenos, sintetizados vía 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP) principalmente en las hojas. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la elicitación controlada con ácido salicílico, quitosán y peróxido de hidrógeno en el contenido de los glucósidos de esteviol, la expresión génica asociada a la biosíntesis de SGs (*SrKA13H*, *SrUGT85C2*, *SrUGT74G1* y *SrUGT76G1*) y la morfología en plantas de estevia cultivadas bajo condiciones de invernadero. Los elicitores fueron aplicados semanalmente vía foliar durante cuatro semanas y las muestras se recolectaron 24 horas después de la última elicitación. Se realizaron mediciones morfológicas, las muestras se liofilizaron y procesaron para evaluar el contenido de SGs y la expresión génica asociada. Los resultados mostraron que todos los elicitores evaluados (especialmente el ácido salicílico 0.1 mM) aumentaron el contenido de glucósidos de esteviol, lo que se correlacionó con la inducción de la expresión génica asociada a la biosíntesis de SGs y el aumento del número de hojas en plantas de estevia. Por lo tanto, la elicitación controlada del cultivo de estevia podría utilizarse para mejorar el rendimiento de los glucósidos de esteviol con fines industriales.

Palabras clave: contenido de glucósidos de esteviol, eustres, elicitores, ruta metabólica.

ABSTRACT

Plants are sessile organisms that are constantly exposed to different environmental stimuli that might cause stress. As a defense mechanism to survive and continue their life cycle, these organisms modify their metabolism and might increase the production of specialized metabolites in response. The eustressors are factors that simulate the effect of environmental stress and can be of biotic or abiotic origin. Elicitors are biological factors that applied via foliar stimulate the defense system of plants and can increase the production of specialized metabolites. *Stevia rebaudiana* Bertoni is a perennial herb, native to Paraguay that has a sweetening power of up to 300 times more than sucrose, in addition to antihypertensive, anti-cryogenic, anti-inflammatory, anti-cancer properties, among others. The compounds responsible for these properties are steviol glycosides (SGs), which are metabolites derived from terpenes, synthesized via 2-C-methyl-D-erythrol-4-phosphate (MEP) mainly in the leaves. The aim of this research was to evaluate the effect of controlled elicitation using salicylic acid, chitosan and hydrogen peroxide on plant performance, steviol glycosides contents and gene expression-associated to SGs biosynthesis (*SrKA13H*, *SrUGT85C2*, *SrUGT74G1* and *SrUGT76G1*) in stevia cultivated under greenhouse conditions. Weekly applications of elicitors were foliarly sprayed during four weeks. Samples were collected 24 hours after the last elicitation. Morphological measurements were made and samples were lyophilized and processed to evaluate SGs content and the gene expression-associated. Results showed that all the evaluated elicitors (especially salicylic acid 0.1 mM) enhanced steviol glycosides content, which correlated with inducement of gene expression-associated to SGs biosynthesis and increase in leaf number in stevia. Thus, controlled elicitation of stevia cultivation might be used to improve the yield of steviol glycosides for industrial purposes.

Key words: steviol glycosides content, eustress, elicitors, metabolic pathway.

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la civilización, los alimentos dulces han sido muy importantes para el ser humano ya que estimulan el sentido del gusto asociándolo con una sensación de placer. Además del azúcar de mesa (sacarosa), a finales del siglo XIX fueron descubiertos diversos edulcorantes (compuestos naturales o sintéticos de sabor dulce), uno de los primeros compuestos es el *m*-nitro-anilina, el cual no es utilizado como edulcorante comercial, la sacarina, glucosa, sucrosa, ciclamato, aspartame, acesulfame, sucralosa, neotame y estevia (esteviosido y rebaudiosido A); entre otros.

En la actualidad el alto consumo de azúcar común entre la población mexicana, ha ocasionado numerosos problemas de salud, siendo México el país que ocupa el 6° lugar en consumo de azúcar a nivel mundial (OMS, 2015). Durante los últimos diez años, el mercado del azúcar ha mostrado un comportamiento cíclico, dando lugar a grandes fluctuaciones de precio en el mercado internacional (DOF, 2019). El consumo total de azúcar y edulcorantes en México es de 5.9 millones de toneladas por año, lo que equivale a que cada habitante consume aproximadamente 44 Kg. de azúcar anualmente (GOB, 2015). El consumo de azúcar se asocia con diversas patologías, según cifras oficiales, México se encuentra entre los países con mayores índices de obesidad en el mundo, tanto en adultos como en niños. En un comunicado emitido por el IMSS el 15 de octubre de 2008, se indica que México ocupa el 1er. lugar mundial en obesidad infantil y de acuerdo con el IMSS y la ENSANUT, ocupa el 2do. Lugar mundial con mayor número de personas con sobrepeso y obesidad. Así pues. 1 de cada 20 niñas y niños menores de 5 años y 1 de cada 3 entre los 6 y 19 años padece sobre peso u obesidad provocando que los niños puedan padecer enfermedades como la diabetes mellitus 2, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, desnutrición, aumento en los triglicéridos e incluso colesterol (UNICEF, 2019).

Recientemente ha aumentado el consumo de extracto de *Stevia rebaudiana* B. (Estevia o Stevia), debido a la importancia nutricional y farmacéutica atribuida a este edulcorante natural, además de que los edulcorantes sintéticos o artificiales han sido ligados a diversas enfermedades las cuales tienen síntomas como ansiedad, dolores de cabeza recurrentes, depresión, artritis, migraña, dolor muscular, fatiga crónica, potencial riesgo de cáncer, fenilcetonuria, entre otros. Este producto está siendo utilizado en la industria de alimentos y bebidas y ha sido reconocido por la Administración de alimentos y drogas (FDA por sus siglas en inglés) como seguro para su consumo, la ingesta diaria recomendada es de 4 mg/kg por día. Esta planta es de origen sudamericano y actualmente está siendo cultivada en Canadá, Estados Unidos, China, Corea, México entre otros países. El poder edulcorante es de 100-300 veces mayor que la sacarosa. Diversos estudios clínicos han demostrado que tiene propiedades antiinflamatorias, anticariogénicas, antihipertensivas, anticancerígenas, disminuye la glucosa en sangre, etc. Estevia produce metabolitos especializados llamados glucósidos de esteviol (SGs) que son diterpenoides tipo ent-kaureno, los cuales son acumulados principalmente en las hojas y extraídos mediante diversos métodos físico-químicos para producir un polvo blanco-amarillo.

Las plantas al ser organismos sésiles, son susceptibles a sufrir daño ambiental por los diversos factores a los cuales están expuestas (físicos, químicos y biológicos), esto provoca que se disparen mecanismos de defensa que involucran diversas moléculas de señalización para inducir la producción de metabolitos secundarios (fenoles, terpenos, etc.) que puedan proteger a los cultivos. Estos mecanismos pueden ser encendidos mediante la aplicación de factores de eustres (Factores modificadores del metabolismo) que pueden ser físicos, químicos o biológicos. Los factores de eustres de origen biológico reciben el nombre de elicitores y se consideran patrones moleculares de células completas, fracciones celulares o moléculas estables (ácido salicílico, peróxido de hidrógeno, quitosán, ácido jasmónico, entre otros. Los elicitores mimetizan el estrés que sufre la planta modificando la expresión génica induciendo o reprimiendo la síntesis de metabolitos.

Las investigaciones realizadas a *S. rebaudiana* se han enfocado en conocer las rutas de biosíntesis de esta planta y poder inducir la síntesis de SGs, utilizando diversas herramientas moleculares como silenciamiento génico, estudio de miRNAs, entre otros. Los resultados han mostrado la existencia de rutas alternativas para la biosíntesis de estos compuestos y la existencia de una relación estrecha con la biosíntesis de giberelina; sin embargo, estos trabajos han sido aislados. La aplicación de tratamientos de elicitación puede modificar la expresión génica en las plantas y ocasionar plasticidad morfológica como un mecanismo de adaptación al estrés, como se ha demostrado en trabajos publicados en el grupo de investigación de Ingeniería de Biosistemas con diversas especies vegetales (Chile, lechuga, tabaco, jitomate, etc.). Debido a lo anterior se considera un área de oportunidad, para proponer estrategias de cultivo y producción de la planta bajo condiciones controladas y lograr inducir la síntesis de los glucósidos de esteviol en las hojas, aplicando vía foliar elicitores (Ácido Salicílico, Peróxido de Hidrógeno y Quitosán) que pueden considerarse Factores Modificadores del Metabolismo (FMMs) los cuales simulan condiciones de estrés y estimulan el sistema de defensa preñdiendo una cascada de señalización.

II. ANTECEDENTES

2.1 Revisión de la literatura

Stevia rebaudiana Bertoni es una hierba perenne, perteneciente a la familia Asterácea (Chughtai *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015;). Es una planta nativa de la región de Amambay en el noroeste de Paraguay, en las zonas fronterizas de Argentina (SAGARPA, 2016). También conocida como Kaa-He-é o "hierba dulce", "yerba miel", "hoja caramelo" (Howlader *et al.*, 2016). Se ha incrementado su interés como fuente potencial de edulcorantes naturales no calóricos para usarse como posible sustituto de los edulcorantes sintéticos y también como medicina natural (Ferrazzano *et al.*, 2016; Modi *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2015). El extracto de las hojas ha sido utilizado para el tratamiento de la diabetes, el potencial cariogénico, la obesidad, la hipertensión y el cáncer (Ferrazzano *et al.*, 2016; Kumari & Kumar, 2017; Rezaie *et al.*, 2018). En el 2013, la superficie establecida a nivel nacional fue de 37 ha, en donde Nayarit mantiene la misma superficie del año anterior (24 ha), Quintana Roo sólo registra 10 ha, Yucatán en el 2012 contaba con una producción de 25 ha, bajando su producción hasta no contabilizar producción significativa en este año, se incorporan Chiapas y Veracruz con 2 y 1 ha, respectivamente. Hoy en día, la producción de esta planta es un cultivo agrícola importante a nivel Nacional y Mundial por los beneficios a la salud que se obtiene al consumirla, se han implementado diversos paquetes tecnológicos para su cultivo (SAGARPA, 2016). Actualmente se cultiva en varias regiones del mundo, incluyendo China, Brasil, Japón, Paraguay, Rusia, Indonesia, Estados Unidos, Tanzania, Canadá, Tailandia, Argentina y México debido a las aplicaciones industriales y medicinales que se le atribuyen (Álvarez-Robles *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2015).

Las plantas a lo largo de su evolución han desarrollado mecanismos de defensa que les dan una ventaja para su supervivencia, estos pueden ser categorizados como defensa pasiva y defensa activa (Huot *et al.*, 2014; Robayo & Gutiérrez, 2014). El mecanismo de defensa activa, se refiere al proceso de resistencia sistémica, que puede ser adquirido (ARS) o inducido (IRC) (Espinosa *et al.*, 2016; Robayo &

Gutiérrez, 2014). Estos pueden ser activados por diferentes condiciones ambientales que generan estrés (Mejía-Teniente *et al.*, 2013). Cuando esto ocurre la planta produce diferentes moléculas (Peróxido de Hidrógeno, Ácido Salicílico, etc.) que encienden una cascada de señalización en respuesta al estrés ambiental de la planta (García-Mier *et al.*, 2013; Garcia-Mier *et al.*, 2015; Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

Existen sustancias que pueden inducir la producción de metabolitos secundarios en plantas (compuestos fenólicos, flavonoides, etc.), llamadas elicitores (Factores Modificadores del Metabolismo), los cuales crean un efecto similar a las condiciones de estrés biótico y abiótico de las plantas disparando los sistemas bioquímicos de producción de metabolitos secundarios (metabolitos especializados) (Garcia-Mier *et al.*, 2015). Bajo condiciones de invernadero, se ha demostrado que se puede inducir la producción de metabolitos en *C. annuum* L., utilizando elicitores (peróxido de hidrógeno y xiloglucano) con lo cual se incrementan los niveles de capsiato presentes en las plantas (Zunun-Pérez *et al.*, 2017).

S. rebaudiana sintetiza diversos metabolitos especializados, entre ellos más de 30 glucósidos de esteviol (SGs) en sus hojas, en concentraciones variables (Soufi *et al.*, 2016; Pal *et al.*, 2015). Estos compuestos son responsables de las características de alto poder edulcorante y bajo contenido calórico. Los SGs son derivados glucosilados del alcohol esteárico diterpenoide y son aproximadamente 300 veces más dulces que el azúcar de mesa común (Karaköse *et al.*, 2011; Kumar & Kumar, 2013).

Las plantas son frecuentemente expuestas a diferentes tipos de estrés (físico, químico o biológico), lo cual activa su sistema de defensa activando cascadas de señalización y sobre produciendo metabolitos. En *S. rebaudiana* se ha evaluado el efecto del stress salino (Zeng *et al.*, 2013), la fertilización y el tiempo de cosecha (Pal *et al.*, 2015; Tavarini & Angelini, 2013), el cultivo de plantas bajo condiciones de estrés por frío utilizando ácido salicílico, peróxido de hidrógeno, 6-

benzilaminopurina y cloruro de calcio como elicitores, obteniendo un aumento en la cantidad de glucósidos de esteviol (Soufi *et al.*, 2016). Estos cambios pueden estar relacionados con modificaciones epigenéticas y 'memoria de estrés' que pueden ser heredados a su progenie (Avramova, 2015; Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

Se han identificado genes de regulación que influyen el flujo de carbono entre las rutas de glucósidos de esteviol y biosíntesis de giberelina (SrKAH13, SrUGT74G1, SrUGT76G1 SrUGT85C2) (Guleria & Yadav, 2013), también se han estudiado mecanismos de silenciamiento de genes mediante métodos de Ingeniería Genética, para evaluar el papel de microRNAs y el papel que juegan en la planta de estevia (Mandhan *et al.*, 2012). Hasta el momento no se ha estudiado a detalle estrategias que, mediante el manejo del metabolismo de la planta, se induzca el incremento en la producción de glucósidos de esteviol.

2.2 Antecedentes

2.2.1 Descripción *Stevia rebaudiana* (Bertoni)

Estevia [*Stevia rebaudiana* (BERTONI)] es una planta perene la cual acumula más del 25% al 30% de glucósidos de esteviol (SGs) principalmente en las hojas (Figura 1) (Hajjhashemi *et al.*, 2018). SGs son aproximadamente 300 veces más dulces que la azúcar común y son usados en muchos países como edulcorantes no calóricos (Kumar *et al.*, 2012). De origen paraguayo, es conocida por los nativos como “hoja dulce” *Kaa-He-é* y desde tiempos remotos ha sido utilizada como endulzante natural de bebidas y alimentos (Howlader *et al.*, 2016; Kolb *et al.*, 2001; Mohammadi, *et al.*, 2017; Serfaty *et al.*, 2013), su descubridor fue el botánico Antonio Bertoni en 1887 (Ruiz *et al.*, 2015).

La planta pertenece a la familia de las Asteráceas, la cual comprende aproximadamente 50,000 especies de hierbas perenes y arbustos (Cuadro 1). En su mayoría crecen a altitudes de 500-300 m en áreas montañosas semidesérticas, pero también pueden crecer en pastizales, bosques de matorrales y áreas subalpinas (Serfaty *et al.*, 2013). La superficie superior de las hojas es ligeramente pubescente glandular. El tallo es en la parte inferior pubescente débil y leñoso. Las flores son compuestas, rodeadas por un involucre de epicáliz y de color púrpura. El fruto es un aquenio dotado de un vilano veloso que facilita su transporte por el viento. Las plantas pueden alcanzar una altura de 65-80 cm (Marchyshyn *et al.*, 2018; Serfaty *et al.*, 2013).

Las hojas contienen glucósidos derivados del ent-kaureno y comprenden al esteviosido, rebaudiosidos A, B, C, D, E y F, y el dulcosido A. Las cantidades de estos glucósidos dependen de las condiciones de crecimiento de la planta de estevia (Chughtai *et al.*, 2019; Karaköse *et al.*, 2011).



a)



b)

Figura 1. *S. rebaudiana* B. a) Variedad Eirete, b) Variedad Morita II. UAQ Campus Amazcala. Elaboración propia, 2019.

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica *Stevia rebaudiana* Bertoni. Elaboración propia con información de (Rather *et al.*, 2019).

Reino	<i>Plantae (Angiospermae)</i>
Clase	<i>Magnoliopsida (Dicotyledonea)</i>
Grupo	<i>Monochlamydae</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae (Compositae)</i>
Subfamilia	<i>Asteroideae</i>
Tribu	<i>Eupatorieae</i>
Género	<i>Stevia</i>
Especie	<i>S. rebaudiana</i>
Nombre binomial	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni)
Sinónimo	<i>Eupatorium rebaudianum</i>

Las propiedades como edulcorante natural han sido mejor conocidos desde su uso en Japón. Utilizada en lugar de la sacarina en 1970, en este país se consume

ampliamente sobre todo en bebidas. A partir de 1970 - 1980 los extractos de esta planta se comercializaron en Norte América y Europa como “alimento saludable”, sin embargo, la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) no aprobó su uso como aditivo alimentario hasta 2007 (Carakostas *et al.*, 2008).

Se han reportado usos medicinales (además del poder edulcorante) ha sido utilizado para el tratamiento de diabetes, caries dental, obesidad, hipertensión y cáncer (Mandhan *et al.*, 2012). La explotación comercial de estevia ha aumentado significativamente desde 1970, cuando investigadores japoneses desarrollaron una serie de protocolos para la extracción y purificación de los compuestos edulcorantes presentes en la planta (Ceunen & Geus, 2013). El poder edulcorante de los extractos de estevia depende de las características genéticas (variedad), aunque diferentes cultivos con mejoras agronómicas han tenido éxito la variedad Morita II ha ganado relevancia por presentar un alto poder edulcorante de hasta 300 veces más que la sacarosa (Ceunen & Geus, 2013).

Además de los glucósidos de esteviol, en las raíces y hojas de la planta se encuentran fructooligosacáridos y polisacáridos que regulan el metabolismo de los lípidos y controlan el nivel de azúcar en la sangre. En los análisis realizados a esta planta se detectaron esteroides como el estigmasterol, beta-sitosterol, campesterol y daucosterol, así como glucósidos flavonoides incluidos los glucósidos de apigenina, quercetina, luteolina y kaempferol, alcaloides, clorofilas y xantofilas. También se detectó la presencia de ácido fólico, vitamina C y con excepción del triptófano todos los aminoácidos esenciales (Marchyshyn *et al.*, 2018).

2.2.2 Variedades

Stevia rebaudiana (Bertoni) es una planta herbácea perene, de la cual se conocen aproximadamente 230 especies (arbustos y subarbustos). De origen paraguayo los primeros cultivos se obtuvieron de plantas silvestres y se ha realizado mejoramiento por métodos de selección y entrecruzamiento (Yadav *et al.*, 2011). Los métodos de clonación han sido de los más utilizados para la reproducción de estevia (retoños, división de matas, acodo, y por esqueje), siendo el método por esqueje el que ha dado mejores resultados para la propagación de la planta. En años recientes se ha comenzado a utilizar la micropropagación. Al ser *S. rebaudiana* una planta alógama (reproducción sexual por fecundación cruzada), genera una gran diversidad en la progenie con respecto al aspecto, altura y envergadura, vida útil, época de floración y cantidad de Glucósidos de esteviol (SGs) (Cuadro 2) (Carrascal, 2016). Existe un especial interés por el desarrollo de nuevas variedades con alto contenido de SGs debido principalmente al aumento en el consume de los productos derivados de esta planta. Se busca aumentar el contenido de rebaudiosido-A y reduce el contenido de esteviosido, este último es un compuesto que produce un ligero resabio amargo en el paladar, que es indeseable en los productos alimenticios como bebidas carbonatadas, jugos, yogurt, entre otros. Varios tipos de plantas con grandes cantidades de glucósidos han sido patentados entre ellas: RSIT 94-1306, RSIT 94-75, RSIT 95-166-1 (Yadav *et al.*, 2011).

Cuadro 2. Variedades de *S. rebaudiana* y su contenido de Glucósidos de esteviol. Elaboración propia de acuerdo con información de (Carrascal, 2016; González-Chavira *et al.*, 2018; González *et al.*, 2014)

Variedad	Características	SGs
Criolla Silvestre	o Nativa de Paraguay, se ha cultivado y decantado por selección natural y es relativamente estable. Se puede propagar por semilla. Resistente a sequía. Altura media de 60 cm. Rendimiento medio de hojas de 1200 kg por hectárea por año.	12 a 14% en condiciones óptimas
Eirete o Ariete	Desarrollado por el Instituto Agronómico Nacional (IAN) de Paraguay en 2005. Denominado en patente como IAN/VC-142. Debe ser reproducido por esquejes para obtener mayor rendimiento en SGs. Tiene un ciclo más largo que la variedad criolla (de 10 a 12 días) y es de porte alto 1.20 m en diciembre-enero en Paraguay. El rendimiento de hoja por hectárea por año es de 3,200 -3,500.	10-19%
Morita I y II	Desarrollados por Toyoshige Morita y patentado en 1998, esta variedad tiene alto contenido de rebaudiosido A de gran pureza.	10-12%
JBB	Desarrollado por el laboratorio farmacéutico japonés Stevia JBB, fue creado para aumentar el rendimiento en presencia de antioxidantes en el vástago de la planta.	-----
Suweon 11	Es una planta que contiene muchas ramas (hasta 40), hojas grandes y gruesas de color verde oscuro, entrenudos cortos (en promedio 32), una altura de 1,3 m, mayor longevidad, resistencia a condiciones adversas, raíces más profundas, rebrote rápido, floración tardía.	12.2%

Dulcinea 777	Desarrollada en INTA Castelar por Manuel Concha Marcavillaca, (Marcavillaca MC I Cultivar Dulcinea). Contiene 11 % esteviolglucósidos.	11%
CMT Iguazú	Es la primera variedad de Stevia de polinización libre y la primera variedad protegida de la República Argentina.	-----

2.2.3 Requerimientos agroecológicos

La localización estratégica de México que involucra dentro de su territorio parte de los Trópicos (Húmedo y Seco), ofrece una gran ventaja para cultivar plantas de *S. rebaudiana* (Ramírez-Jaramillo & Lozano-Contreras, 2017). Esta planta es una especie originaria de la zona subtropical, semihúmeda con temperaturas extremas de -6 a 43°C, con promedio de 24 °C, no obstante, se reporta que prospera muy bien entre los 24 y 28°C, tiene una exigencia de humedad de alta y de manera continua. La distribución natural de este cultivo se observa en zonas donde las precipitaciones medias anuales son altas (1,400 mm a 1,600 mm). Esta planta no tolera periodos largos de sequía, de tal manera que en zonas en donde la precipitación anual sea inferior a los 1,400 mm es necesario la utilización de sistemas de irrigación. El porcentaje de humedad relativa debe ser menor de 85%. El fotoperiodo crítico para el desarrollo de estevia es de 13 horas, pero existe una gran variabilidad genética entre ecotipos. Se adapta bien a suelos con buen drenaje, siendo ideales para su cultivo los areno-arcillosos, francos y franco-arenosos (Herrera *et al.*, 2012; Ramírez-Jaramillo & Lozano-Contreras, 2017).

2.2.4 Glucósidos de esteviol (SGs)

La principal ventaja de los metabolitos especializados producidos por la planta de estevia es que son naturales, es decir, son productos no sintéticos o artificiales (desarrollados por síntesis química). Las hojas de estevia pueden ser utilizadas en fresco (mediante su uso directo en infusión) o deshidratadas, ambos tratamientos potencian la intensidad de dulzura. Las plantas de estevia producen un gran número de metabolitos secundarios o especializados, los cuales incluyen los glucósidos de esteviol (SGs), diterpenos, triterpenoides, esteroides, flavonoides y componentes grasos (Howlader *et al.*, 2016; Karaköse *et al.*, 2011).

Los SGs son un grupo de glucósidos de diterpeno, se han identificado más de 30 en las hojas de estevia. Estos diterpenos están caracterizados por un ent-t-kaurenoaglicona y una amplia variedad de patrones de glicosilación en las posiciones C-13 y C-19 (Devkota *et al.*, 2019). El esteviosido y rebaudiosido A son los principales compuestos y se presentan otros SGs en cantidades menores: esteviolbiosido, rebaudiosido B, C, D, E, F, dulcósido A y actualmente el rebaudiosido M que tiene gran importancia en la industria alimentaria por sus características sensoriales (Cuadro 3) (Behroozi *et al.*, 2017; Ceunen & Geus, 2013; Prakash *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2015).

Cuadro 3. Grupos R, formulas moleculares, pesos moleculares y potencia de los principales SGs presentes en *S. rebaudiana*. Elaboración propia de acuerdo con información de (Prakash *et al.*, 2014)

SGs	Grupos R-		Formula	Peso molecular	Potencia de dulzor
	R ₁	R ₂			
Rebaudiosido A	β-glc-	(β-glc) ₂ -β-glc-	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	967.01	200
Rebaudiosido B	H	(β-glc) ₂ -β-glc-	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	804.88	150
Rebaudiosido C	β-glc-	(β-glc,α-rha-) β-glc-	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	951.01	30
Rebaudiosido D	β-glc-β-glc-	(β-glc) ₂ -β-glc-	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	1129.15	221
Rebaudiosido E	β-glc-β-glc-	β-glc-β-glc-	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	967.01	174
Rebaudiosido F	β-glc-	(β-glc,β-xyl-)β-glc-	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	936.99	200
Rebaudiosido M	(β-glc) ₂ -β-glc-	(β-glc) ₂ -β-glc-	C ₅₆ H ₉₀ O ₃₃	1291.3	250
Esteviosido	β-glc-	β-glc-β-glc-	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	804.88	210
Esteviolbiosido	H	β-glc-β-glc-	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	642.73	90
Rubososido	β-glc-	β-glc-	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	642.73	114
Dulcósido A	β-glc-	,α-rha-β-glc-	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	788.87	30

Glc=glucosa; rha=ramnosa; xyl=xilosa

Como resultado de la dominancia del esteviosido, el extracto crudo obtenido del proceso de las hojas de estevia tiene características desagradables al paladar pues deja un resabio amargo. Los extractos con alta proporción de rebaudiosido A tienen un perfil de sabor más agradable. El rebaudiosido A es altamente soluble en agua facilitando su uso en alimentos (Hajihashemi & Geuns, 2017). El esteviosido y rebaudiosido A tienen múltiples ventajas como suplementos dietéticos. Son no metabolizables (no calóricos), no fermentables y no causan caries dental. Otro

beneficio notable es que su consumo es seguro para la salud y no tienen restricciones para personas que padecen diabetes (Behroozi *et al.*, 2017).

En 2007 el Comité Conjunto de Expertos FAO / OMS en Aditivos Alimentarios (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: JECFA por sus siglas en inglés) estableció las especificaciones para edulcorantes de glucósidos de esteviol, los cuales deben contener al menos 95% de los 7 principales compuestos de este tipo. La mayoría de los productos que se comercializan como glucósidos de esteviol consisten principalmente de esteviosido y rebaudiosido A (Figura 2). Los productos que contienen un alto nivel de rebaudiosido A son conocidos como **Rebiana** (Carakostas *et al.*, 2008; Chughtai *et al.*, 2019).

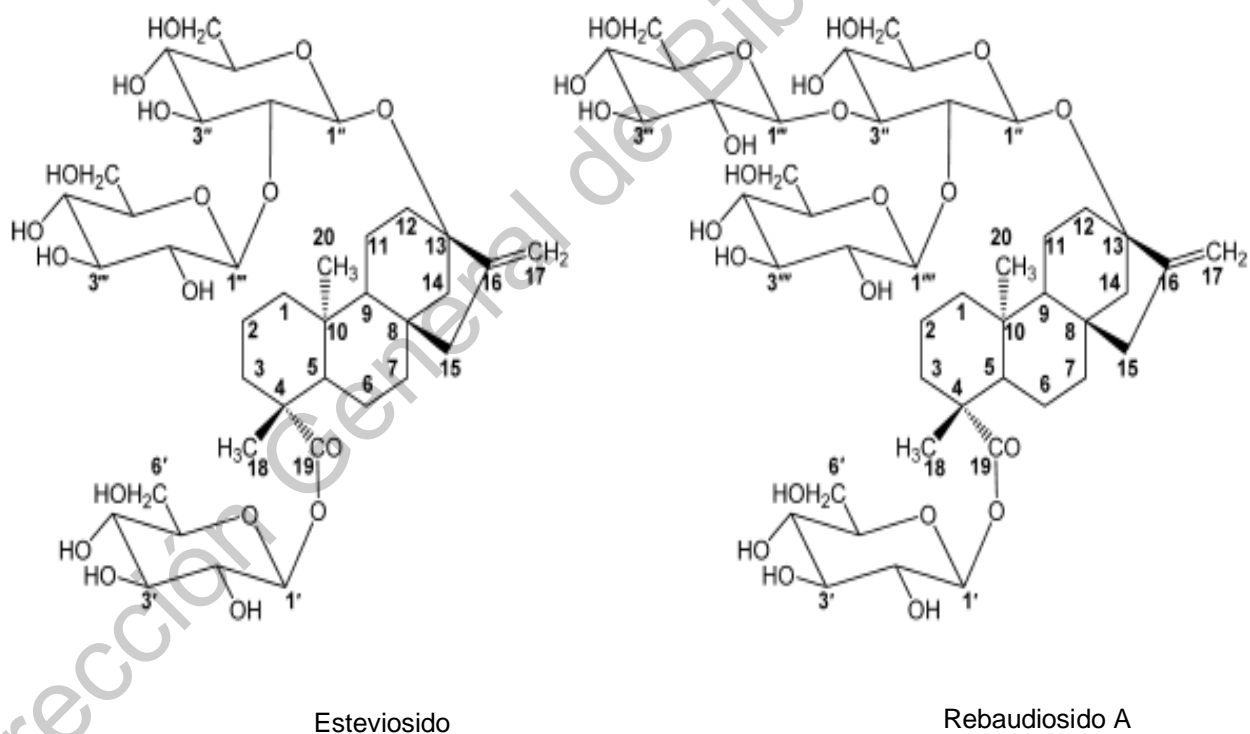


Figura 2. Estructura de glucósidos de esteviol (esteviosido y rebaudiosido A). Elaboración propia con información de (Tada *et al.*, 2012)

2.2.5 Ruta de biosíntesis de SGs

Los isoprenoides son metabolitos especializados de bajo peso molecular sintetizados por las plantas. *S. rebaudiana* B. acumula en el tejido foliar, aproximadamente un 20% (peso seco w/w) de SGs (terpenos isoprenoides) (Kumar *et al.*, 2012). Estos compuestos son de especial interés, pues exhiben propiedades antiinflamatorias, antirotavirus, inmunomoduladoras, anti-hipertensivas, anti-tumorales, anti-oxidantes, entre otras (Hajihashemi *et al.*, 2018; Kolb *et al.*, 2001).

La ruta del 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP) juega un rol central en la biosíntesis de los compuestos anteriormente mencionados. Las enzimas de esta ruta son consideradas potenciales marcadores para la prevención y tratamiento de enfermedades como la tuberculosis y la malaria (Guleria *et al.*, 2014; Kumar & Kumar, 2013). Experimentos usando glucosa marcada revelaron la implicación del 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP) plastidial, en la ruta de biosíntesis de esteviol. El primer paso involucra la condensación de piruvato y gliceraldehído 3- fosfato a 1-deoxi-D-Xilulosa-5-fosfato (DXP) catalizada por DXP sintasa, a continuación, una serie de reacciones ocurren hasta dar lugar a la formación de Isopentenildifosfato y Dimetilalildifosfato que son interconvertidos a Geranil-geranildifosfato (GGDP). En estevia, GGDP es convertido a esteviol por la acción consecutiva de cuatro enzimas. Diferentes SGs son formados por la glicosilación de esteviol por glucosiltransferasas específicas (GTs) (Figura 3) (Kumar *et al.*, 2012). En esta ruta la (*E*)-4-Hidroxi-3-Metilbut-2-Enidil difosfato reductasa (HDR) es una enzima clave en el último paso de la ruta MEP, la cual está implicada en el paso de la conversión de (*E*)-4-Hidroxi-3-Metilbut-2-Enidil difosfato a Geranilgeranil difosfato. Diferentes investigaciones sugieren una correlación entre la actividad de esta enzima y la síntesis de metabolitos especializados (Kumar *et al.*, 2012; Kumar & Kumar, 2013; Singh *et al.*, 2017).

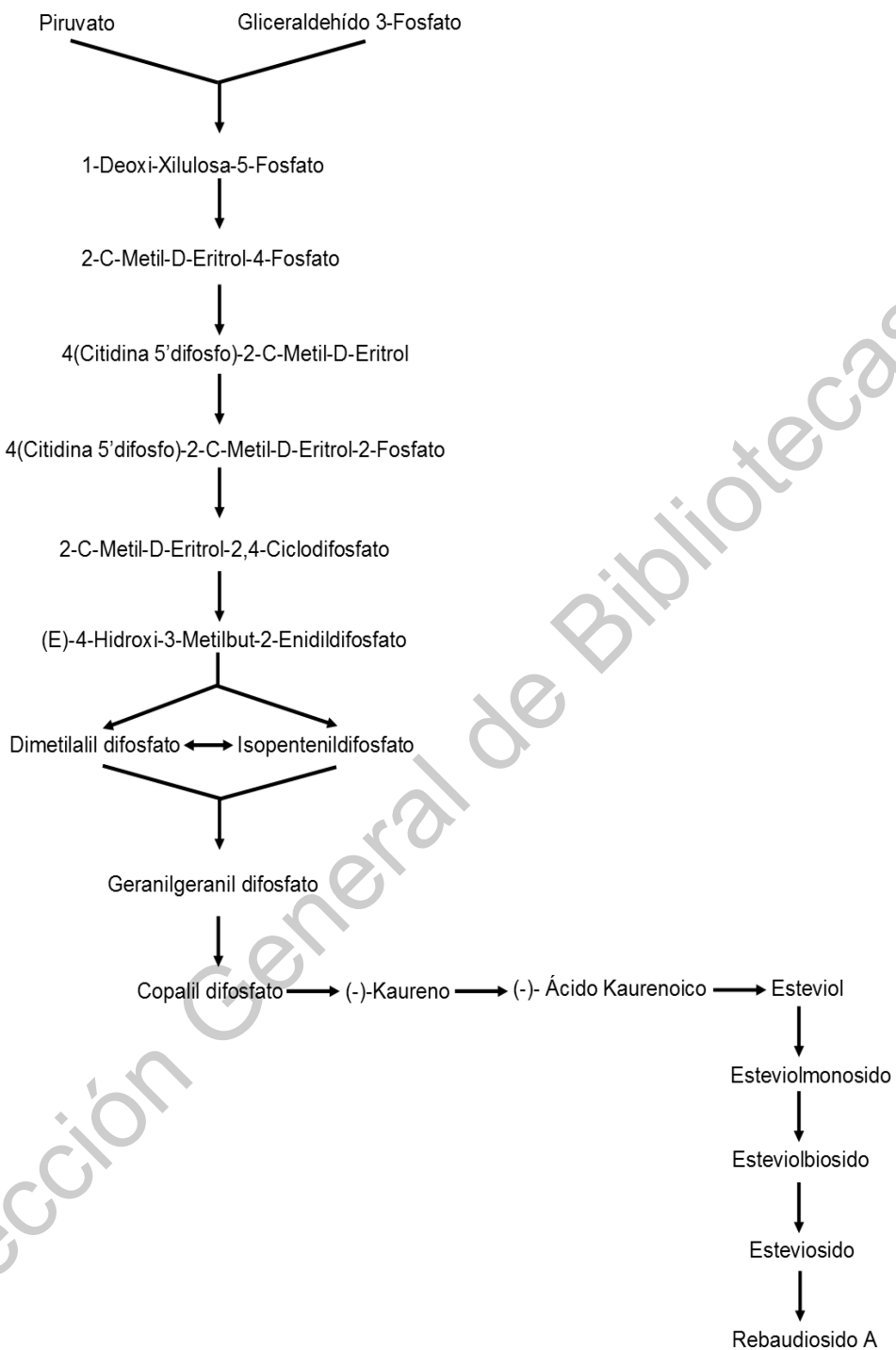


Figura 3. Diagrama esquemático de la ruta biosintética de SGs. Elaboración propia con información de (Kumar *et al.*, 2012).

A partir de la ruta MEP, los glucósidos de esteviol, que son producidos principalmente en las hojas de la planta de *S. rebaudiana*, se sintetizan en una ruta bioquímica que comprende ocho pasos consecutivos catalizados por enzimas altamente especializadas, de esta secuencia solo 5 pasos son considerados específicos para la biosíntesis de SGs (Figura 4). Las enzimas que codifican estos pasos son: *SrKA13H*, *SrUGT85C2*, *SrUGT74G1* y *SrUGT76G1*; los genes que codifican estas enzimas son considerados de gran importancia para la biosíntesis de los SGs. La biosíntesis de SGs tiene pasos en común con la ruta del ácido giberélico y su relación todavía no ha sido dilucidada (Guleria & Yadav, 2013). Dos enzimas tienen un rol central en este proceso, la deoxixilulosa-5-fosfato sintasa (DXS) que es la primera enzima de la ruta del 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP), y la ácido kaurenoico hidroxilasa (KAH). Ambas son un punto importante en la divergencia de la biosíntesis de SGs y las giberelinas (Lucho *et al.*, 2018).

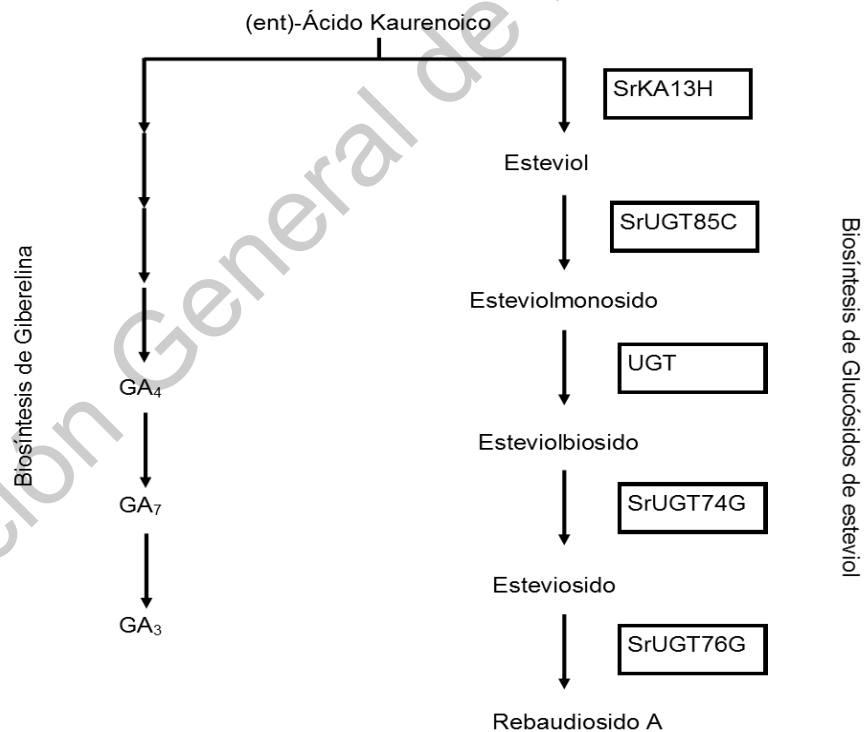


Figura 4. Ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol. Elaboración propia con información de (Guleria & Yadav, 2013).

Las giberelinas son hormonas endógenas de plantas que juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas, regulan las características morfológicas de las plantas como la elongación del hipocotilo, longitud del tallo, expansión foliar, etc. (Guleria & Yadav, 2013). En algunas plantas, la separación espacial de las glucosidasas de los glucósidos constituye un mecanismo de defensa importante contra varias plagas. Después de la disrupción celular ocasionada por ejemplo por insectos, la degradación enzimática libera compuestos de defensa activos en forma de glucósidos, permitiendo de este modo su función antihervívora. La acumulación de SGs es fuertemente afectada por la ontogénesis (procesos que sufren los seres vivos desde la fecundación hasta su plenitud y madurez), la cual es fuertemente influenciada por el fotoperíodo, además la longitud del día, genotipo, nutrientes, temperatura e irradiación tienen efecto sobre la producción de SGs. Existen muchos factores que pueden incrementar o disminuir el contenido de SGs, tanto bióticos como abióticos durante los diferentes estadios fenológicos de la planta (Ceunen & Geus, 2013; Karimi *et al.*, 2016; Tavarini & Angelini, 2013).

2.2.6 Extracción y purificación de SGs

Como se mencionó en párrafos anteriores, los principales componentes presentes en las hojas de la planta de *S. rebaudiana* son el esteviosido y el rebaudiosido A, estos representan un 90% del peso total de todos los SGs presentes en el área foliar. Además de estos SGs se encuentran presentes en cantidades menores el esteviolbiosido, rebaudiosido B, C, D, F, dulcósido A y rubusosido, la determinación por cromatografía es sumamente complicada debido principalmente a que la estructura de los SGs es muy similar y también porque el extracto acuoso de las hojas de estevia tiene muchas impurezas como: proteínas, resinas, ácidos orgánicos, pigmentos y lactonas sesquiterpénicas, así como otros componentes minoritarios (Lorenzo *et al.*, 2014; Martono *et al.*, 2018).

Actualmente existen diversos métodos de extracción y purificación de glucósidos de esteviol, debido a su importancia en la industria alimentaria, típicamente el proceso

involucra un proceso de extracción acuosa y la adición de agentes quelantes seguido por una cristalización, otro proceso es la extracción se realiza con agua seguida por centrifugación y un tratamiento con hidróxido de calcio, además se puede utilizar intercambio iónico para remover las impurezas del extracto de estevia y adicionar metanol, otro método consiste en utilizar adsorción polimérica o adsorción con zeolita de calcio, sin embargo estos métodos son altamente caros y consumen mucho tiempo. Además, el uso excesivo de solventes orgánicos puede causar daños a la salud, Lorenzo *et al.*, 2014 y Roy & De, 2015 proponen un método de extracción de los compuestos edulcorantes de estevia utilizando membranas de celulosa acetato p-falato (CAP por sus siglas en inglés) y poliacrilonitrilo con la cual obtuvieron un nivel muy alto de recuperación de glucósidos en comparación con otros métodos que utilizan ultrafiltración con membranas. Recientemente, además de las técnicas anteriormente mencionadas se han introducido metodologías para la extracción comercial de los SGs, estos métodos fueron optimizados con respecto a temperaturas, duración del proceso, estabilidad y cantidad de moléculas extraídas (Cuadro) (Ferrazzano *et al.*, 2016).

Cuadro 4. Métodos para extracción de SGs a partir de hojas secas de estevia. Elaboración propia de acuerdo con información de (Ferrazzano *et al.*, 2016)

Método de extracción	Problemas/ventajas/desventajas
Extracción con agua	Optimización en términos de pH, temperatura, presión, duración
Lixiviación acuosa	Consumo de tiempo y trabajo
Lixiviación etanólica	Más rápida que la lixiviación acuosa, manteniendo la misma recuperación de extracción
Extracción con fluidos supercríticos (SFE)	Bajo poder de solvatación para esteviosidos polares, necesario usar un co-solvente. Optimización en términos de presión y temperatura.
Extracción con fluidos presurizados (PFE)	Múltiples velocidades, bajo consumo de solventes, mejora la transferencia de masa e incrementa el poder de solvatación. Limitado a analitos térmicamente estables.
Extracción con agua caliente presurizada (PHWE)/ extracción con agua subcrítica	Extracción de compuesto no polares con agua, amigable con el medioambiente y con un beneficio

	económico alternativo al uso de solventes orgánicos peligrosos o dañinos.
Extracción asistida con microondas	Optimización en términos de solventes y su volumen. Extracción de compuestos de importancia comercial en menos tiempo, con menor cantidad de solventes y causando un menor daño al medio ambiente.
Extracción Soxhlet	Optimización en términos de tiempo y solventes
Maceración fría	Optimización en términos de tiempo y solventes

2.3 Sistema de defensa de plantas

2.3.1 Respuesta de defensa

Las plantas interactúan con diversos factores bióticos y abióticos tanto benéficos como antagónicos, lo cual les exige el desarrollo de respuestas adaptativas para integrar las diferentes señales que reciben. Esta complejidad está enmarcada en la gran diversidad de especies de plantas, insectos y microorganismos, incluyendo benéficos que interactúan y permiten mejorar el crecimiento y la nutrición vegetal, favorecen la tolerancia a estrés, el control de plagas y la polinización. Ante la multiplicidad de interacciones, las plantas presentan una amplia flexibilidad de respuestas frente a organismos benéficos y patógenos, con superposición de algunas señales activadas por la planta y respuestas adaptativas que se mueven entre la protección frente a los agresores y la obtención de beneficios, generándose una sofisticada red de señales (García-Mier *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2015; Huot *et al.*, 2014).

Un mecanismo de adaptación de plantas, es su habilidad de reconocer y responder rápidamente frente a un posible invasor mediante respuestas de defensa. En las respuestas de resistencia gen-gen, mediadas por hormonas como ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), las plantas presentan mecanismos de defensa mediante efectores, con producción de metabolitos, proteínas y acumulación de calosa y lignina (Bektas & Eulgem, 2015).

La respuesta de defensa, puede iniciarse por un reconocimiento gen-gen, que limita el crecimiento del organismo invasor y puede estar acompañada por la producción de ROS, necesarias para la respuesta hipersensible (HR), que permite la programación de muerte celular y le impide al invasor el acceso a nutrientes y agua. Esta resistencia mediada por genes *R* está asociada con la activación de la vía de señalización dependiente del SA que permite la expresión de proteínas relacionadas con patogénesis (PR), mientras que otras defensas de la planta están controladas por mecanismos que dependen de ET o de JA (García-Mier *et al.*, 2015; Espinas *et al.*, 2016).

Existen diversos mecanismos de defensa de las plantas, los cuales se encienden como protección a ataques de patógenos (hongos, bacterias o virus), daño por ataque de artrópodos herbívoros, daño físico o mecánico, exposición a fungicidas o algún agente químico, estrés salino, etc., y pueden darle una capacidad de adaptación y resistencia a subsecuentes ataques, esta capacidad de protección se dispersa a toda la planta y puede ser transmitida a la progenie o no, dentro de estos mecanismos de defensa se pueden mencionar los siguientes (Bektas & Eulgem, 2015):

- a) *Sistema de defensa de resistencia sistémica adquirida (RSA)*. Este mecanismo se enciende por efecto de la infección de un patógeno que causa una lesión necrótica, la cual produce una respuesta hipersensible (RH) que ocasiona el engrosamiento de las paredes celulares y la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Herrera-Vásquez *et al.*, 2015). En esta reacción el ácido salicílico desempeña un papel fundamental como una señal que causa la expresión de genes responsables de la resistencia (Herrera-Vásquez *et al.*, 2015). El SA se sintetiza por la vía del metabolismo fenilpropanoide y se acumula intracelularmente en un receptor específico o se une a la enzima catalasa. Cuando el SA se une a la catalasa bloque su acción, provocando estrés oxidativo a la planta ejercido por especies reactivas de oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Aplicando vía foliar SA o H_2O_2 se aumenta la cantidad de ROS y se induce la síntesis de proteínas

PR activando el RSA (García-Mier *et al.*, 2015; Gonzalez-Bosch, 2018; Stahl *et al.*, 2016).

- b) *Resistencia sistémica inducida (RSI)*. Recientemente se ha descubierto este mecanismo de defensa de la planta, el cual está relacionado con la interacción planta-patógeno inducido por rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta (PGPR). Estas bacterias (principalmente de la especie *Pseudomonas*) no causan daños visibles en el sistema de raíces de la planta. No causa acumulación de proteínas PR ni de SA, utiliza vías bioquímicas reguladas por el ácido jasmónico o jasmonatos (JA) y el etileno (Gonzalez-Bosch, 2018; Stahl *et al.*, 2016). Además de participar en el RSI los jasmonatos y sus precursores participan activamente en otras reacciones de defensa, por ejemplo, en la protección de las plantas ante el ataque de insectos (deGuzman *et al.*, 2019). En el caso de *S. rebaudiana* existen estudios que indican que la ruta de síntesis de glucósidos de esteviol se activa cuando la planta sensa el ataque de insectos y esto ocasiona un aumento en su producción en hoja, para evitar el consumo de las mismas y la pérdida de follaje (Martínez Cruz, 2015).

2.3.2 Elicitores

Las plantas producen diversos componentes químicos a través de procesos conocidos como metabolismo (primario y secundario). La síntesis de sustancias necesarias para la supervivencia de las células como polisacáridos, proteínas, lípidos, RNA y DNA se lleva a cabo durante el metabolismo primario usando aminoácidos, azúcares, ácidos grasos y nucleótidos. Los metabolitos secundarios o especializados, son activados solo durante una etapa particular del crecimiento y desarrollo, durante periodos de estrés de la planta (biótico o abiótico), por el uso de eustresores (**Factores modificadores del metabolismo**) o por señales moleculares (García-Mier *et al.*, 2013; Garcia-Mier *et al.*, 2015; Mejía-Teniente *et al.*, 2013; Mejía-Teniente *et al.*, 2010; Ramirez-Estrada *et al.*, 2016).

Los eustresores son factores de estrés de las plantas los cuales inducen la expresión genética diferencial (EGD) y con ello la síntesis de diversos metabolitos de interés, estos factores se pueden dividir de acuerdo a su naturaleza (Figura 5) (Vázquez-Hernández *et al.*, 2019a).

Los elicitores son moléculas estables de origen biológico (Factores modificadores del metabolismo), que pueden ser de origen endógeno (producidas por las plantas) o exógeno (aplicadas vía foliar o directamente en el sustrato o el riego) (Vázquez-Hernández *et al.*, 2019a), los cuales disparan los sistemas bioquímicos de las plantas incrementando la producción de metabolitos secundarios como respuesta del sistema de defensa de la planta, su efecto depende de la concentración y el tiempo de aplicación (García-Mier *et al.*, 2015; Hossain *et al.*, 2017; Tahmasi *et al.*, 2017).

Esta respuesta inicia de manera local en el momento de detectarse el elicitador y dependiendo del sistema de defensa disparado el señalizador puede amplificarse a toda la planta. Esta señalización está mediada principalmente por el ácido salicílico y el metil-salicilato los cuales generan una expresión de genes específicos (Robayo & Gutiérrez, 2014; Tahmasi *et al.*, 2017).

En años recientes la relación entre el consumo de frutas y vegetales y la salud ha sido el principal interés de un gran número de investigaciones las cuales involucran la identificación de componentes específicos en las plantas que promueven beneficios para la salud, todos ellos metabolitos secundarios (especializados) dentro de los cuales se incluyen los glucósidos de esteviol (García-Mier *et al.*, 2013).

En 2016, Soufi *et al.*, utilizaron diferentes moléculas de señalización (Ácido salicílico, 6-benzylaminopurina, cloruro de calcio y peróxido de hidrógeno) para inducir estrés en plantas de *S. rebaudiana*, durante condiciones de daño por frío. Encontraron por métodos analíticos que aplicando vía foliar estos FMMS afectaba la calidad y cantidad de SGs en plantas de *S. rebaudiana*, particularmente con

tratamientos de ácido salicílico en bajas concentraciones (0.5 mM). Además, en Tahmasi *et al.*, en 2017, realizó estudios con diferentes concentraciones de ácido salicílico para evaluar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de SGs, donde encontró que a bajas concentraciones 30 mg/L de ácido salicílico se induce la producción de los SGs.

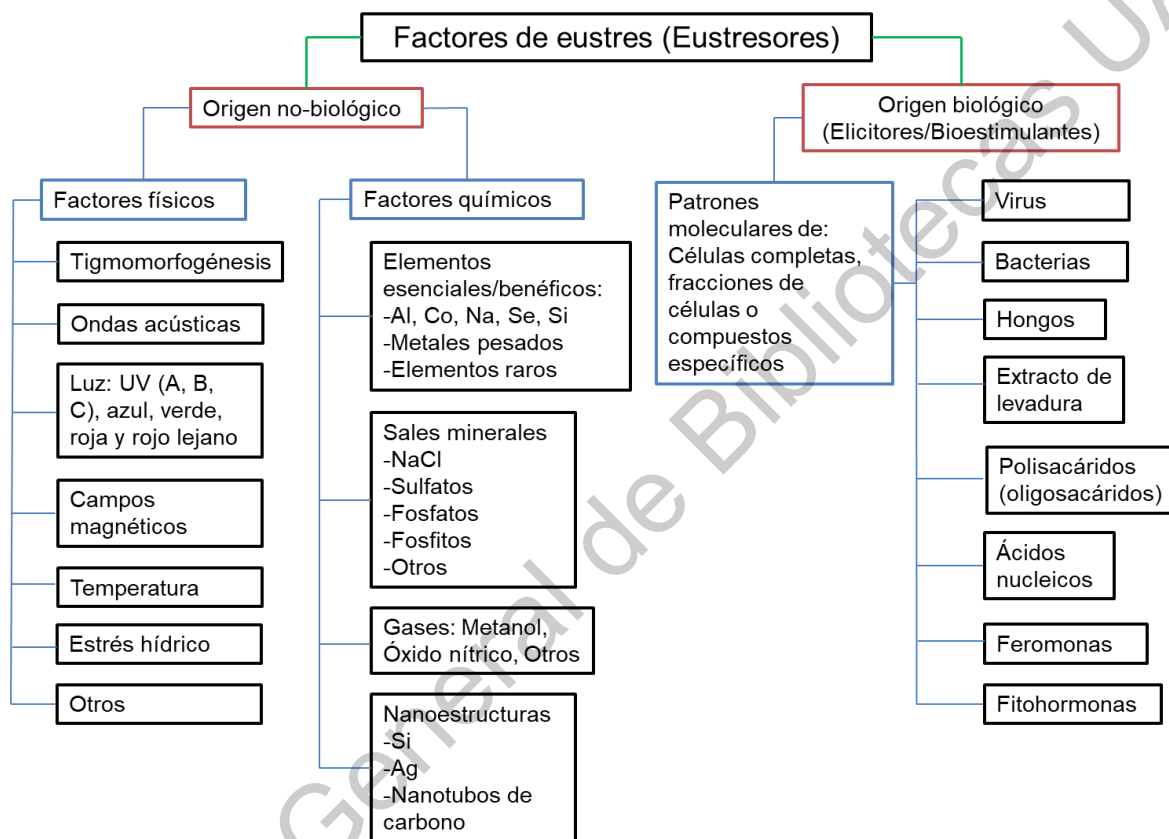


Figura 5. Clasificación de eustresores con base en su naturaleza. Elaboración propia con información de (Vázquez-Hernández *et al.*, 2019a).

2.3.3 Respuesta adaptativa al estrés

Cuando una planta ha sido sometida a algún tipo de estrés y después de responder disparando el sistema de defensa sistémica adquirida o inducida, existen otros mecanismos que permiten su evolución en posteriores generaciones, induciendo una expresión genética diferencial (EGD). La EGD puede ser determinada

cuantificando el nivel de metilación de las regiones CpG de la cromatina en las histonas o en el ADN (Avramova, 2015). El tipo, porcentaje y localización de la metilación del ADN provee la información genética de las rutas bioquímicas involucradas en la producción de metabolitos especializados y sus consecuencias funcionales y cambios morfológicos ocasionados por la exposición de las plantas a los elicitores (Bewick & Scmitz, 2017).

Con la finalidad de reprogramar la expresión genética diferencial asociada a la producción de metabolitos especializados, se pueden aplicar elicitores para activar o silenciar genes a nivel epigenético. La epigenética, es un término usado para definir el estudio de cambios heredables en la expresión y función génica que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia del ADN y que pueden ser observables como una respuesta morfológica, debido a que un mismo genotipo puede dar lugar a fenotipos alternativos (plasticidad fenotípica) (Basdeki *et al.*, 2019; Farnés *et al.*, 2019, Gallusci *et al.*, 2017). Una característica de este fenómeno, es que está influenciado por factores ambientales y sirve para controlar la regulación de la expresión de genes (Alonso *et al.*, 2019; Farnés *et al.*, 2019).

La metilación del ADN es un marcador epigenético conservado que tiene un rol importante en el desarrollo de vertebrados y plantas, el cuál ha sido reportado en diversos organismos (procariotas, hongos, etc.). Este mecanismo involucra cambios en el ADN sin modificación en la secuencia, pero con el potencial de ser heredado a posteriores generaciones por medio de división meiótica o mitosis (Avramova., 2015; Basdeki *et al.*, 2019; Lang *et al.*, 2015; Muanprasat *et al.*, 2013).

2.4 Hormesis

Como se menciona en el punto 2.2.2, las plantas han desarrollado un sistema de respuesta adaptativa al estrés, con la finalidad de continuar su ciclo de vida. Una gran cantidad de metabolitos secundarios son producidos por el sistema de defensa de la planta para adaptarse a los cambios en el ambiente que le provocan algún tipo de estrés (biótico o abiótico). Vargas-Hernandez *et al.*, en 2017, describen la hormesis como un fenómeno en el cual un estresor (ej. Toxinas, herbicidas, insectos, etc.), estimula la respuesta celular que incluye la producción de metabolitos para que las plantas establezcan respuestas adaptativas. Algunos de estos estresores de origen biótico (también llamados hormetinas), en ciertas dosis (baja concentración), pueden inducir la producción de metabolitos de interés (glucósidos de esteviol, compuestos polifenólicos, etc.) (Vazquez-Hernandez *et al.*, 2019b). Sin embargo, a medida que se incrementa la concentración de los estresores está puede llegar a ser toxica para el organismo causando daños significativos o incluso ocasionar la muerte del mismo (Figura 6.). La memoria implícita “priming” es un pre-acondicionamiento (una manifestación de hormesis), que ha sido ampliamente documentada en diferentes organismos (incluyendo plantas) y sugiere que la pre-exposición a dosis bajas de eustresores actúa como una protección biológica contra exposiciones a concentraciones masivas de estas sustancias. Los estudios de memoria implícita también sugieren que las especies reactivas de oxígeno (ROS), las especies reactivas de nitrógeno (RNS) y las especies reactivas de azufre (RSS) regulan los procesos de señalización y los mecanismos de defensa que disparan la tolerancia al estrés y tienen un rol central en la aclimatación de las plantas (Agathokleous *et al.*, 2019). La aplicación en un esquema controlado de los eustresores tiene un gran potencial para su uso en la industria agrícola para mejorar el rendimiento de los compuestos de interés en diversos cultivos.

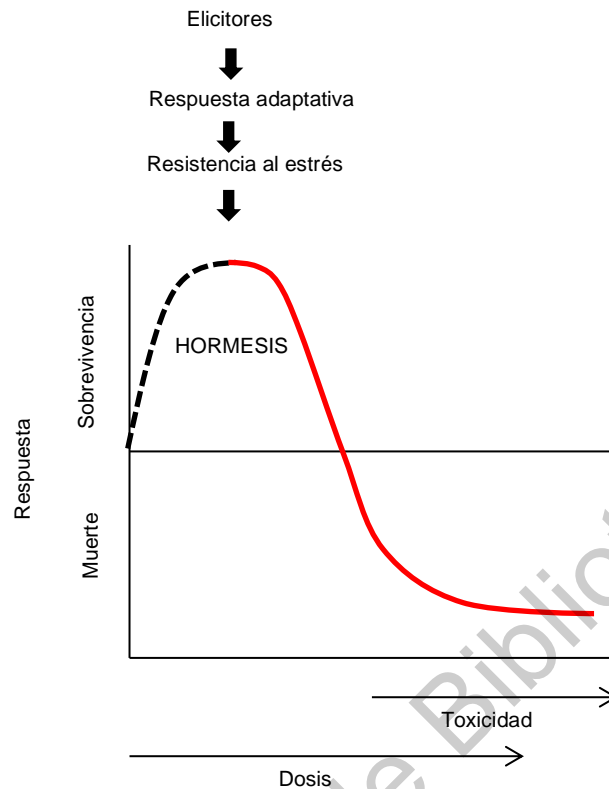


Figura 6. Diagrama de hormesis. Efecto dosis-respuesta de la aplicación de elicitores. Elaboración propia, 2020; con datos de Vargas-Hernandez *et al.* 2017.

2.5 Sistemas de producción

2.5.1 Cultivo a cielo abierto

S. rebaudiana ha sido cultivada con éxito en una amplia gama de condiciones climatológicas, prefiere clima cálido y húmedo. En las regiones de inviernos fríos, de heladas persistentes, se cultiva como planta anual, y se cosecha en otoño, al iniciarse la floración, que es la época en la que la planta presenta el mayor contenido de SGs. La plantación se realiza en primavera y su propagación puede ser por acodo y por retoños o hijuelos. Para obtener una mayor densidad de población mayor se puede utilizar la propagación sexual (semillas), por clonación (esqueje) o por micropropagación. El riego es fundamental y el contenido de SGs que presentan las plantas en su etapa madura varía de 2% (plantas silvestres) hasta el 19% (variedad *eirete*). Actualmente una de las variedades más comerciales es la Morita

II, la cual tiene alto contenido de rebaudiósido A y fue desarrollada por Morita Kagaku Kogyo (Carrascal, 2016; Rezaie *et al.*, 2018).

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) han diseñado un paquete agrotecnológico para el establecimiento y mantenimiento de plantas de estevia en apoyo a productores en México. Este paquete se ofrece a los agricultores como una alternativa de cultivos con alto valor comercial, los cuales son de fácil adaptación en zonas tropicales, subtropicales y del centro-sur de nuestro país en donde las condiciones climáticas favorecen su producción (Ramírez-Jaramillo & Lozano-Contreras, 2017).

2.5.2 Cultivo bajo condiciones de invernadero

Un invernadero es una construcción agrícola con una cubierta traslúcida que tiene por objetivo reproducir o simular condiciones climáticas adecuadas para el crecimiento y desarrollo de plantas de cultivo establecidas en su interior, con cierta independencia de medio exterior. Los invernaderos permiten modificar y controlar de forma más eficiente los principales factores ambientales que intervienen en el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales (altas y bajas temperaturas, granizadas, vientos, lluvias, energía luminosa, etc.). Además, los invernaderos modernos son acondicionados para proveer de sustrato, ventilación, aireación, aporte de CO₂, riegos, fertilización e inocuidad a los cultivos (Juarez Lopez *et al.*, 2011).

Lozano Contreras & Ramirez Jaramillo, 2018 y Vázquez-Baxcajay *et al.*, 2014, proponen un sistema de propagación de plantas de estevia por reproducción asexual bajo condiciones de invernadero, el cual demostró que la propagación por esquejes en un sistema controlado es favorable utilizando una concentración de 50:50 peatmoss y perlita con esquejes de tipo apical para la promoción del sistema radicular obteniendo una longitud promedio de 10cm, con un porcentaje de

supervivencia del 100%, con 14 hojas en promedio en cada esqueje y altura de la plántula de 15 cm (Oviedo-Pereira *et al.*, 2015).

El cultivo bajo condiciones de invernadero es ideal para un manejo controlado de las plantas con un alto valor comercial, como es el caso de *S. rebaudiana*, debido a que con la variación de la época de siembra, la densidad de las plantas y los factores ambientales como la radiación solar, precipitación pluvial y los cambios en la temperatura en los cultivos a cielo abierto se puede ver afectada la expresión morfológica y fisiológica de las plantas, ya que estos factores modifican los procesos de fotosíntesis, transpiración, alargamiento celular, crecimiento y competencia entre especies que pueden provocar pérdida del cultivo o características no deseables en las plantas (menor número de hojas, plantas con tallos altos y bajo contenido de SGs, etc.) (Orozco *et al.*, 2011; Oviedo-Pereira *et al.*, 2015).

Dirección General de Biotecnología UAQ

III. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis

La aplicación de elicitors (peróxido de hidrógeno, ácido salicílico y Quitosán) en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, modifica la expresión de los genes *SrKA13H*, *SrUGT74G1*, *SrUGT76G1* y *SrUGT85C2* que intervienen en la ruta de biosíntesis de los glucósidos de esteviol (SGS), los cuales están relacionados con cambios morfológicos de la planta.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Caracterizar los cambios en la producción de glucósidos de esteviol (SGs), expresión de genes y morfología de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni tratadas con elicitores, cultivadas bajo invernadero.

4.1.1 Objetivos Particulares

- Establecer un cultivo de plantas de estevia en condiciones de invernadero para controlar las condiciones de crecimiento de las plantas y posteriormente realizar los tratamientos de elicitación.
- Determinar los niveles de Glucósidos de esteviol en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni tratadas con elicitores.
- Valorar la expresión genética (genes *SrKA13H*, *SrUGT85C2*, *SrUGT74G1* y *SrUGT76G1*) asociada a los cambios morfológicos y bioquímicos encontrados en las plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

V. METODOLOGÍA

5.1 Ubicación del área de experimentación.

El experimento se llevó a cabo en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro Campus Amazcala en el laboratorio de Biología Molecular (A4) a cargo del Dr. Ramón G. Guevara González, en el invernadero de plántula y en el invernadero Holandés Tipo Español. El poblado de Amazcala (Figura 7) pertenece al municipio del Marqués, Qro., se localiza en el sector Suroeste del estado, entre los 20° 31' y 20° 58' de latitud Norte. Su longitud se encuentra entre los 100° 24' del Oeste a 1850 m sobre el nivel del mar. Colinda al Oeste con el municipio de Querétaro, al Norte con el estado de Guanajuato, el Este con el municipio de Colón, y al Sur con los municipios de Huimilpan y Pedro Escobedo. La temperatura media oscila entre los 18 °C y los 24 °C, con un clima predominante subtropical, templado semiseco.

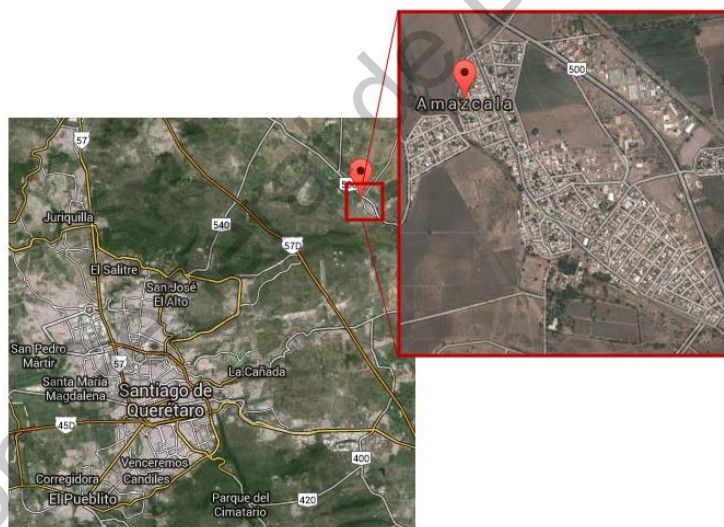


Figura 7. Ubicación de la UAQ Campus Amazcala. Amazcala, municipio de El Marqués, estado de Querétaro. Elaboración propia con información de Google maps 2019.

5.2 Aplicación de elicitores en cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni bajo invernadero.

En la figura 8, se muestra la línea de tiempo de la realización del experimento, en la cual se puede observar de forma gráfica la secuencia de protocolos y tiempos en los cuales realizaron las aplicaciones de elicitores y se tomaron muestras.

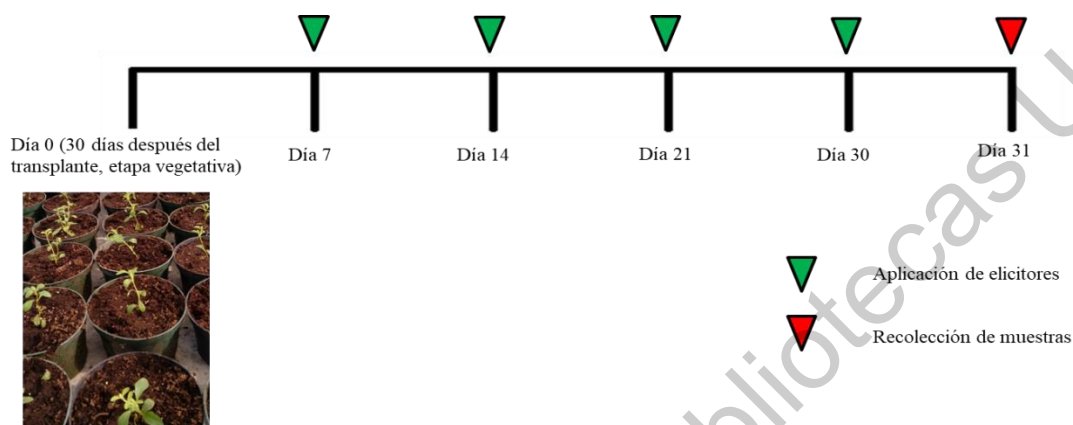


Figura 8. Línea de tiempo para la aplicación de elicitores. Elaboración propia, 2019.

5.3 Material biológico y condiciones de crecimiento

Se utilizó un total de 60 plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni variedad Morita II, las cuales fueron adquiridas a la Ing. Adriana Morales propietaria de un invernadero ubicado en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, México (Vitaplant). Las plántulas fueron cultivadas a partir de semilla certificada producida en Paraguay en 2008 y reproducida en México un crecimiento de 1 mes y una altura de 10-12 cm con 10-15 hojas verdaderas (Figura 9) (Lozano Contreras & Ramírez Jaramillo, 2018; Ramírez-Jaramillo & Lozano-Contreras 2017).



Figura 9. Plántulas de *S. rebaudiana* var. Morita II. Elaboración propia, 2019.

5.4 Especificaciones del invernadero

Las plantas de *S. rebaudiana* var. Morita II fueron establecidas en el invernadero de plántula de la UAQ Campus Amazcala. Este se encuentra ubicado al poniente de las instalaciones, detrás del edificio de Laboratorios (Figura 10a y 10b). Este invernadero consta de una superficie de 64 m² (8 m de Largo x 8 m de Ancho), cuenta con extractor de aire y ventilación natural, está construido con plástico blanco tricapa de 800 galgas, piso de cemento. Es ideal para producción de plántula (actualmente se produce plántula de lechuga, chile, pepino, jitomate entre otros) y mantiene las condiciones de humedad y temperatura requeridas por este cultivo (80% min., 26-28°C). Durante el experimento llevado a cabo en noviembre de 2016, la temperatura interna del invernadero fue de un máximo 23.2°C y mínima de 3.6°C con un promedio de 13°C (Garcia-Mier *et al.*, 2015; Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

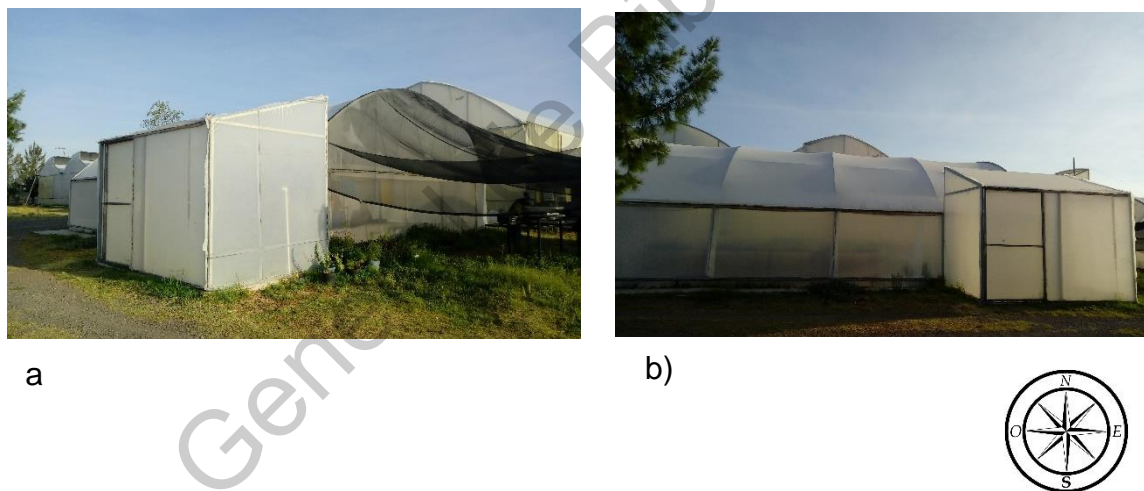


Figura 10. a) Vista frontal y b) lateral del invernadero para producción de plántula. UAQ Campus Amazcala. Elaboración propia, 2019.

5.5 Sistema de riego

El sistema de riego utilizado en el invernadero fue manual (con regadera), se realizó por las mañanas antes de las 9:00 a.m. y después de las 5:00 pm para la mejor absorción de los nutrientes. Después de la aspersion del riego con la solución nutritiva de Steiner, se realizó un segundo riego con agua sin nutrición (Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

5.6 Manejo del cultivo

Para el cultivo de las plantas de *Stevia rebaudiana* var. Morita II, se utilizó un diseño de distribución en bloques completamente al azar. Al inicio del cultivo las plantas recién adquiridas fueron desinfectadas con una solución de sulfato de cobre 2g/l, cabe mencionar que el sulfato de cobre es comúnmente usado en plantas, es considerado no dañino y no interfiere significativamente con el metabolismo de las plantas. Además, se aplicó un insecticida orgánico (Azanim 3% CE, marca BLOKRONE) aplicada en una concentración de 250ml/100 l de H₂O para asegurar la inocuidad del cultivar y evitar la generación de resultados falsos-positivos (Lozano Contreras & Ramírez Jaramillo, 2018; Ramírez-Jaramillo & Lozano-Contreras, 2017).

El sustrato utilizado como soporte de la planta fue peat moss-perlita (50:50); con la finalidad de tener una buena aireación y mantener la humedad del sustrato. Se colocó en macetas de 1 L de volumen. La nutrición del cultivo fue con solución Steiner al 50% con conductividad eléctrica de 1.5 dS cm⁻¹ y pH de 5.5 durante cuatro semanas (Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

5.7 Tratamientos de elicitación

Después de 30 días de trasplante de las plántulas (plántulas con 15 - 20 hojas verdaderas), se prepararon las soluciones stock y diluciones como se menciona a continuación y como se aplicaron foliarmente mediante spray a punto de rocío una vez al día (8 a.m.) en la parte aérea de la planta, incluyendo el meristemo apical,

usando aproximadamente un volumen de 10 mL por planta, durante las cuatro semanas que duro el experimento. Los elicitores aplicados y sus concentraciones se muestran en el Cuadro 3, se utilizó agua destilada (H₂O₂) como control (Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

Cuadro 5. Nomenclatura para el análisis de los tratamientos de elicitación. Elaboración propia con información de (Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

Tratamiento	Elicitor	Concentración mM
TC	Agua destilada	
T1	Ácido salicílico (SA)	0.1
T2	Ácido salicílico (SA)	1
T3	Ácido salicílico (SA)	6.7
T4	Quitósán (CH)	15
T5	Quitósán (CH)	1000
T6	Quitósán (CH)	1500
T7	Peróxido de Hidrógeno(H ₂ O ₂)	2
T8	Peróxido de Hidrógeno(H ₂ O ₂)	20
T9	Peróxido de Hidrógeno(H ₂ O ₂)	200

5.7.1 Ácido salicílico (AS)

Se preparó una solución stock de AS a 0.02 M preparando 0.2762 g de AS sólido (Mca. J.T. Baker 0300-01 A.C.S) en un aforo de 100 mL de agua destilada. A partir de esta solución se preparan las concentraciones para elicitación de 0.1 mM, 6.7 mM y 10 mM, de acuerdo a trabajos previos reportados por Garcia-Mier *et al.*, 2015 y Mejía-Teniente *et al.*, 2013.

5.7.2 Quitósan (CH)

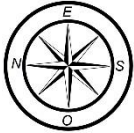
El quitósán empleado para la elicitación de plantas de estevia, es derivado de quitina de camarón, tiene 668.229798 g/mol de peso molecular, con grado des-acetilación del 91.81%. Se preparó una solución stock de 4000 mg/mL y a partir de ella se realizaron diluciones para obtener las concentraciones de 10 mg/mL (15 mM), 670 mg/mL (1000 mM) y 1000 mg/mL (1500 mM) (Garcia-Mier *et al.*, 2015; Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

5.7.3 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Se utilizó una solución de peróxido de hidrógeno grado reactivo al 50% con peso molecular de 34.01 g/mol de la marca Golden Bell con una densidad de 1.20 g/L, a partir de la cual se preparó una solución stock con una concentración 1 M y posteriormente se diluyó para obtener las soluciones de elicitación a una concentración de 2 mM, 20 mM y 200 mM (García-Mier *et al.*, 2015; Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

5.8 Diseño del experimento

Las plantas fueron distribuidas en el invernadero tanto de plántula como en el invernadero tipo español en un diseño de Bloques Completamente al azar (Reyes, 1997), como se muestra en la Figura 11, con los elicitores y las concentraciones indicadas en la Cuadro 4. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se compararon mediante un ANOVA (Fisher), seguido por una prueba de comparación de medias de Tukey ($p = 0.05$) con un nivel de significancia de 0.05% utilizando el programa Graph Pad Graphics 6.0 y STATGRAPHICS Centurion XV.II, Windows 10 versión (García-Mier *et al.*, 2015).



T1p1	T2C3 p3	T3C2 p6	T3C3 p6	T4p1	T1p4	T2C3 p6	T3p4	T5p1	T2p2
T3C2 p1	T4p6	T3C3 p5	T3p3	T2p1	T3C3 p3	T2p6	T4p3	T3C1 p6	T3C2 p3
T4p6	T1p3	T4p4	T3C1 p5	T5p6	T2C3 p4	T5p2	T5p3	T3C3 p1	T4p4
T1p2	T4p2	T2p5	T5p4	T2C3 p5	T3C3 p2	T4p5	T4p2	T1p5	T3p5
T3C1 p1	T4p5	T3C2 p5	T3C1 p2	T3p2	T2p4	T2C3 p2	T1C3 p1	T3C1 p4	T3C2 p4
T2p3	T1p6	T5p5	T3C3 p4	T4p3	T3C1 p3	T4p1	T3C2 p2	T2C3 p1	T3p6

Figura 11. Diseño del experimento (T1, T2, T3, T4: Tratamientos, C1, C2, C3: concentraciones de los elicitores, p1, p2, p3, p4, p5 y p6: Número de planta) (Modificado de Reyes, 1997). *S. rebaudiana* var. Morita II. Elaboración propia, 2019.

Cuadro 6. Elictores aplicados vía foliar en plantas de *S. rebaudiana*. Elaboración propia con información de (Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

TRATAMIENTO	ELICITOR	CONCENTRACIÓN		
		C1	C2	C3
T1	AC. SALICILICO (SA)	0.1 mM	1.0 mM	6.7 mM
T2	PERÓXIDO DE HIDROGENO (H ₂ O ₂)	2 mM	20 mM	200 mM
T3	QUITOSAN (QN)	15 mM	1000 mM	1500mM
T4	CONTROL	Agua destilada	Agua destilada	Agua destilada

5.8.1 Distribución de las plantas de estevia en el invernadero

En la Figura 12 se muestra en color rojo las líneas de cultivo de plantas de estevia, la densidad de plantación fue de nueve plantas por m^2 en el invernadero de plántula, las cuales están ubicadas al este del invernadero para disminuir variaciones de radiación solar, distribuidas de forma aleatoria según el diseño del experimento (Vázquez-Baxcajay *et al.*, 2014).

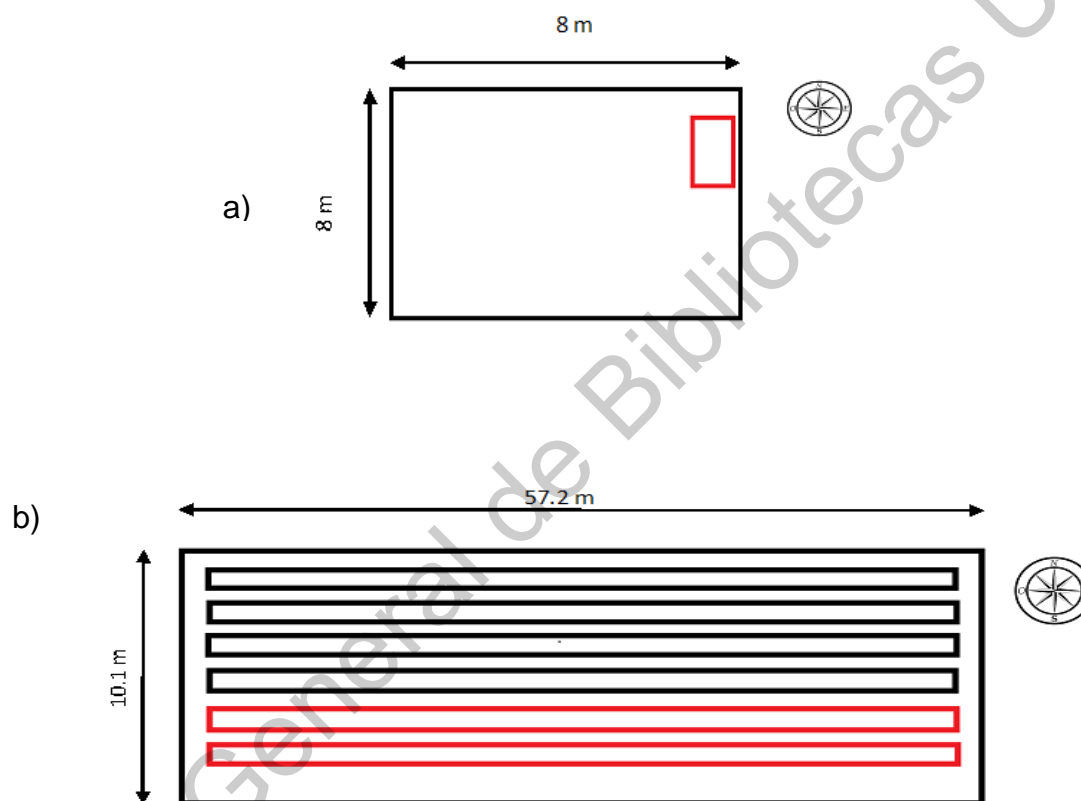


Figura 12. Diagrama de distribución de plantas de estevia en el invernadero de plántula.

Elaboración propia, 2019.

5.9 Recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas 24 horas después de la última elicitación en la cuarta semana. La cantidad de muestra tomada fue de 10-15 hojas verdaderas por planta aproximadamente 1500 mg en peso fresco. Las hojas fueron tomadas completamente al azar de la base, la parte media y la parte alta de la planta. Fueron

congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para los posteriores análisis (Mejía-Teniente *et al.*, 2013). Para la determinación del contenido de SGs las muestras fueron liofilizadas en el laboratorio de la Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez en la UAQ Campus Aeropuerto, estas muestras fueron pulverizadas y tamizadas para realizar el protocolo correspondiente a la evaluación por cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC) acoplada a un analizador de tipo cuádruplo-tiempo de vuelo (QTOF). Para el análisis de la expresión génica asociada a la biosíntesis de SGs se utilizaron las muestras congeladas en nitrógeno líquido y se procedió a realizar la extracción de RNA, conversión a cDNA y el análisis por RT-qPCR.

5.10 Determinación los niveles de Glucósidos de esteviol en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

El perfil de SGs se evaluó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC) acoplada a un analizador de tipo cuádruplo-tiempo de vuelo (QTOF) con una interfase de ionización por electropulverización (ESI) de presión atmosférica (Vion, Waters Co, MA, EE. UU.). La columna utilizada fue una Acquity BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 μm) a 35°C . El gradiente de elución se realizó con un sistema binario que consistía en (A) 0,1% de ácido fórmico en agua y (B) 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo. El gradiente se aplicó a un caudal de $0,4\text{ ml min}^{-1}$: 0 min, 5% de B; 22 min, 95% de B, durante 5 min, seguido de un paso de reequilibrio durante 3 min. El volumen de inyección fue de $2\ \mu\text{L}$ y la temperatura de la muestra se ajustó a 10°C . La adquisición de datos se realizó utilizando el modo de ionización negativa MSE de alta definición con un rango de masa de 50-2000 Da. Las condiciones de la espectrometría de masas fueron las siguientes: temperatura de la fuente, 120°C ; gas de desolvatación (N_2), 800 L h^{-1} a 450°C ; gas de cono (N_2), 50 L h^{-1} ; tensión de cono, 40 V; voltaje capilar, 3.5 kV; baja energía de colisión, 5 eV; Alta energía de colisión, 15–45 eV. Se usó leucina-encefalina (50 pg ml^{-1}) como masa de bloqueo a 10 ml min^{-1} . Las identidades de los picos se establecieron analizando su masa exacta (confirmación de la composición elemental con $<10\text{ mg kg}^{-1}$ de error de

masa), patrón de fragmentos y distribución de isótopos de iones moleculares en comparación con Pubchem y ChemSpider. La adquisición de datos se realizó con el Sistema de Información Científica UNIFI (Waters Co). Los SGs evaluados fueron: rebaudiosido A, rebaudiosido B / esteviosido (iso-reb B), rebaudiosido C, rebaudiosido D, rebaudiosido E, esteviolbiosido / (iso-rubososido), rebaudiosido F, dulcósido A. Los datos se expresaron como mg SGs g-1 de peso seco (Rodríguez-González *et al.*, 2018).

5.11 Valoración de la expresión genética

Con la finalidad de observar el patrón de expresión genética de los genes involucrados en el flujo de carbono de la biosíntesis de glucósidos de esteviol se realizó el siguiente protocolo. Las muestras (50-100 mg en peso fresco) se recolectaron 24 horas después de la elicitación en la cuarta semana. Las hojas se tomaron completamente al azar de la base, la parte media y superior de la planta y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se liofilizaron (Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

5.11.1 Extracción y purificación de ARN.

Se llevó a cabo utilizando el kit de minipreparación de ARN Zol Research Brand Direct-zol (BioAdvanced Systems Co.) (Anexo 1). Después de comprobar la integridad del ARN y de cuantificar utilizando un espectrofotómetro de longitud de onda múltiple (Brand spectrophotometer marca Hoch DR6000), se procedió a la síntesis de la primera cadena del ADNc. La síntesis de ADNc se realizó utilizando el kit de síntesis de ADNc de termocientífica Maxima para el kit RTqPCR (BioAdvanced Systems Co.) (Anexo 2). El ADNc se cuantificó por espectrofotometría en un espectrofotómetro de longitud de onda múltiple (marca Hoch modelo DR6000) y se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis (Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

5.11.2 RT-PCRs

Los conjuntos de oligonucleótidos para la evaluación de la expresión génica asociada a la biosíntesis de SGs se muestran en el Cuadro 5 (Guleria & Yadav, 2013; Hajhashemi & Geuns, 2017), estos fueron diseñados por el laboratorio T4 Oligo (Manufacturado por ADN Sintético SAPI de CV). Utilizando RT-PCR punto final se estandarizaron las condiciones de amplificación de los oligonucleótidos iniciadores que amplifican las secuencias específicas de los genes involucrados en la biosíntesis de los SGs. Se utilizó un Kit conteniendo taq polimerasa y un PCR mix de la marca thermoscientific (Anexo 3), utilizando un gradiente de temperatura de 55 a 65 °C (Figura 13) en un termociclador marca BIO-RAD modelo C1000 y las bandas de amplificación correspondientes al tamaño molecular de cada oligonucleótido fue comprobada mediante un gel de agarosa al 2% (Anexo 4).

Cuadro 7. Secuencias de oligonucleótidos específicos para los genes implicados en la síntesis de glucósidos de esteviol en *S. rebaudiana*, condiciones de alineación y tamaño de banda esperado.

Elaboración propia con información de (Guleria & Yadav, 2013; Hajhashemi & Geuns, 2017).

Secuencia de oligonucleótidos	Condiciones de alineación	Tamaño molecular
<i>SrKA13H</i> F: CTTCCAATCGACGTCCCAG R: CGAGGTATCATGACCCG	58°C, 30 s	255 pb
<i>SrUGT85C2</i> F: CCCGCTGGACTGGAGC R: GGGCCGATGGTGTAAATG	56°C, 30 s	183 pb
<i>SrUGT74G1</i> F: CATGAACTGGTTAGACGATAAG R: TTATTACTCCTCTTTCCTCCTC	55°C, 1 min.	249 pb
<i>SrUGT76G1</i> F: ATCTGTTGCTGACAGTCTTAAC R: TAACATACAGTACCGAACTTGG	55°C, 1min.	189 pb
<i>β-ACTINA</i> F: AGCAACTGGGATGACATGGAA R: GGAGCGACACGAAGTTCATTG	55°C, 1min.	65 pb

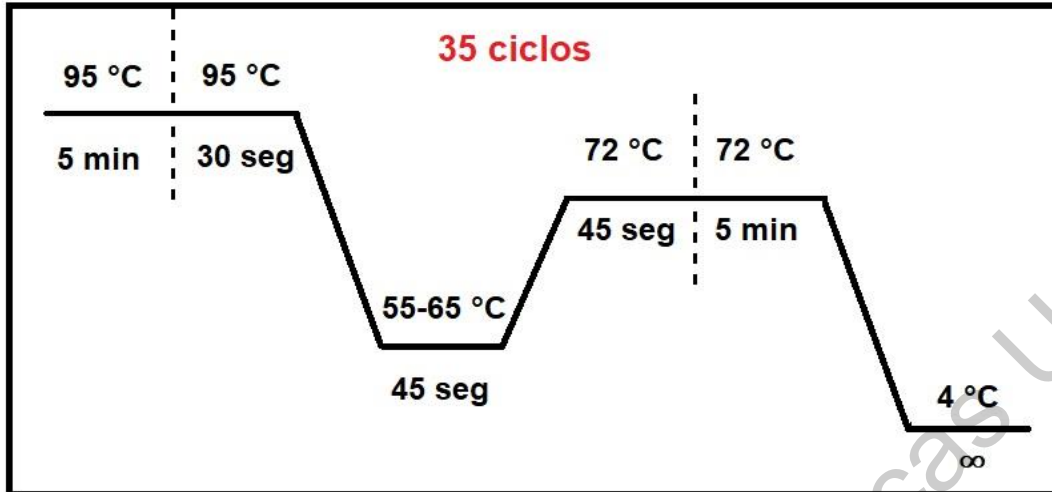


Figura 13. Programa para RT-PCR punto final. Elaboración propia, 2019.

5.11.3 RT-qPCR

Para validar los resultados obtenidos en la estandarización de los oligonucleótidos con el protocolo para RT-PCR y tomando en cuenta que la cuantificación en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa es altamente sensible y precisa, se diseñaron las condiciones cuantitativas de la qRT-PCR que consistieron en 40 ciclos, temperatura de alineación de 56°C con un programa de termociclado que se muestra en la Figura 14 (Guevara Figueroa, 2015).

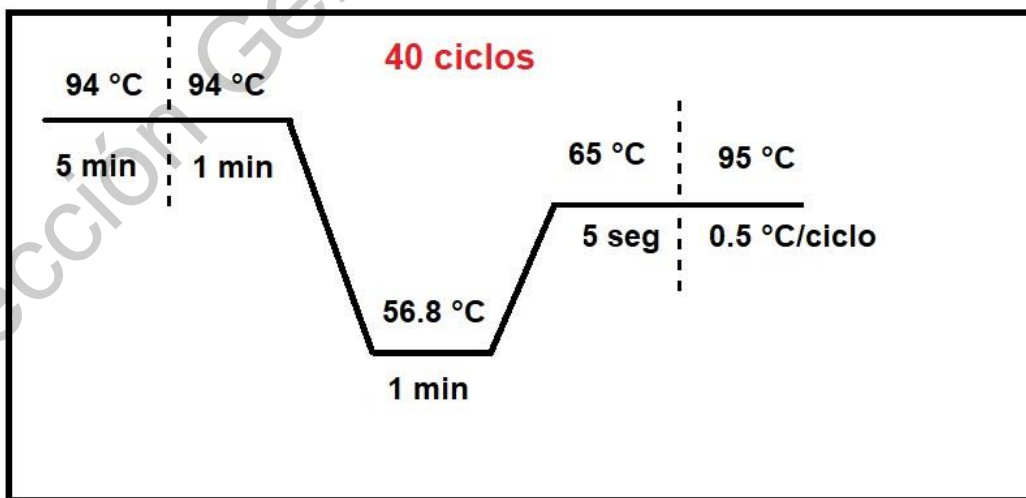


Figura 14. Programa estandarizado para RT-qPCR. Elaboración propia, 2019.

El protocolo se realizó utilizando como gen constitutivo de referencia (*housekeeping*) el gen de la β -actina para la estandarización y normalización de los resultados de acuerdo a lo reportado por (Hajihashemi *et al.*, en 2013; Hajihashemi & Geuns, 2017). Las muestras de cada tratamiento se analizaron por triplicado con su control respectivo en un diseño de placa de 96 reacciones en un arreglo mostrado en la Figura 15, utilizando la mezcla SyberGreen como fluoróforo en un equipo para cuantificar por RT-qPCR (marca BIO-RAD C1000) y los resultados se evaluaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, 2001).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B1	B2	B3	H.K T1	H.K T1	HK T1	H.K T2	H.K T2	HK T2	H.K T2	H.K T2	HK T2
B	H.K T3	H.K T3	HK T3	H.K T4	H.K T4	HK T4	H.K T5	H.K T5	HK T5	H.K T6	H.K T6	HK T6
C	H.K T7	H.K T7	HK T7	H.K T8	H.K T8	HK T8	H.K T8	H.K T8	HK T8	H.K T9	H.K T9	HK T9
D	H.K TC	H.K TC	HK TC									
E												
F												
G												
H												

Figura 15. Placa para reacciones de RT-qPCR. Ordenamiento para carga de reacciones: Blancos (B1, B2, B3) y del gen constitutivo de β -actina (HK). Elaboración propia, 2019.

5.12 Medición de variables morfológicas

La medición de las variables morfológicas se realizó 24 horas después de la última elicitación y antes de la recolección de las muestras. Se midió el Índice de área foliar, diámetro basal de tallo, altura de la planta y el número de flores por planta según la metodología propuesta por (Mejía-Teniente *et al.*, 2013). Se realizaron al finalizar las cuatro semanas del experimento usando un vernier digital (Mutitoyo Absolute) para medir diámetro de tallo y un flexómetro para medir altura de la planta.

5.13 Elaboración de protocolo para reproducción asexual de plantas de estevia

Para la elaboración del protocolo de reproducción asexual de plantas de estevia por medio de esquejes, se utilizaron 10 plantas madres proporcionadas por el Dr. Mario González Chavira del INIFAP campus Celaya. Las plantas fueron colocadas en bolsas blancas de doble capa con capacidad de 10 L, utilizando como sustrato peat moss:perlita:materia orgánica (composta) con una relación de 1:1:1 y establecidas en el invernadero (Temperatura promedio: 26 ± 2 °C y Humedad relativa: 70 ± 5 %) (Figura 16) (González-Chavira *et al.*, 2018).

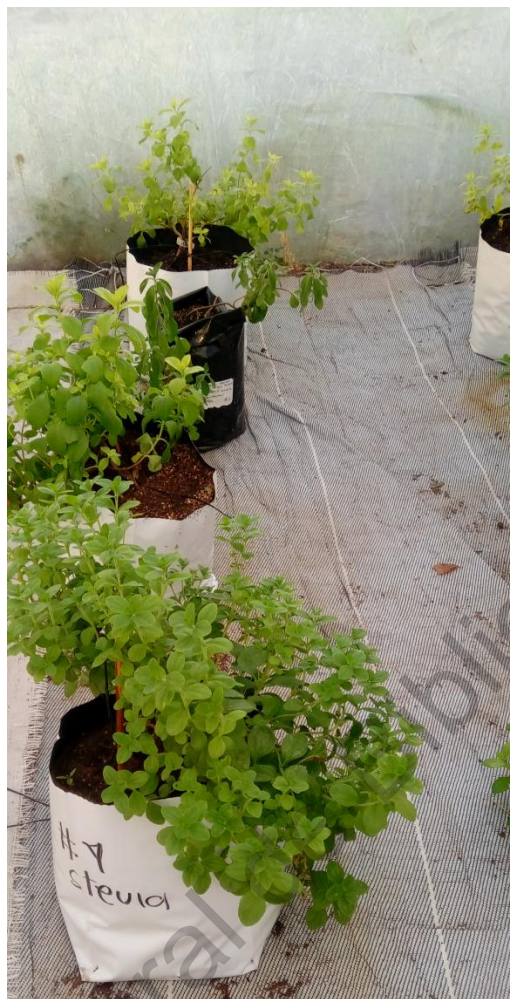


Figura 16. Plantas madre de estevia (*s. rebaudiana* B. var. Morita II) para reproducción asexual.
Elaboración propia, 2019.

El esquejado se realizó cada semana, se tomaron brotes laterales de una longitud no mayor a 10 cm, el corte fue hecho longitudinalmente con un bisturí y colocados inmediatamente en una solución de enraizador comercial durante 8-10 minutos (Proroot®), posteriormente se colocaron en macetas individuales utilizando como sustrato peat moss:perlita:materia orgánica (composta) con una relación de 1:1:1, se mantuvieron con riego constante de nutrición con solución Steiner 50 %, en un microclima manteniendo una temperatura de 26 ± 2 °C y 70 ± 5 % de humedad relativa (Lozano Contreras & Ramirez Jaramillo, 2018).

5.14 Cambios en la metilación de las secuencias CpG-ADN asociados al tratamiento con elicitores

El material utilizado para este experimento fueron 30 plántulas de *S. rebaudiana* var. Eirete las cuales se distribuyeron en el invernadero tipo español de la Facultad de Ingeniería de la UAQ Campus Amazcala ($29^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ} \text{C}$, $70\% \pm 5\%$ de humedad relativa y un fotoperiodo correspondiente a ciclos de 12: 12 luz: oscuridad). El sustrato utilizado fue Tezontle, con un tamaño de grano de 0.2 mm y 2 mm (50/50); con la finalidad de tener una buena aireación y mantener la humedad del sustrato. Cuando las plantas tuvieron de 5-10 hojas verdaderas, se colocaron en bolsas bicapa blancas de 10 L de capacidad. La nutrición del cultivo se realizó utilizando una solución Steiner al 50% con una conductividad eléctrica de 1.5 dS cm^{-1} y un pH de 5.5. Después de 30 días del trasplante, las plantas de estevia fueron elicidadas vía foliar con un aspersor en el punto de rocío una vez al día en la parte aérea de la planta, incluido el meristemo apical, utilizando 10 ml de H_2O_2 200 mM por planta. Se utilizó agua destilada como control. La elicitación se realizó semanalmente durante cuatro semanas y la recolección de muestras de hojas fue completamente al azar de la base, la parte media y superior de las plantas 24 horas después de la última aplicación (Figura 17). El diseño experimental fue bloques completamente al azar y las muestras se evaluaron por triplicado (Cárdenas-Manríquez *et al.*, 2016; Herrera *et al.*, 2012; Mejía-Teniente *et al.*, 2013; Vazquez-Hernandez *et al.*, 2019b).

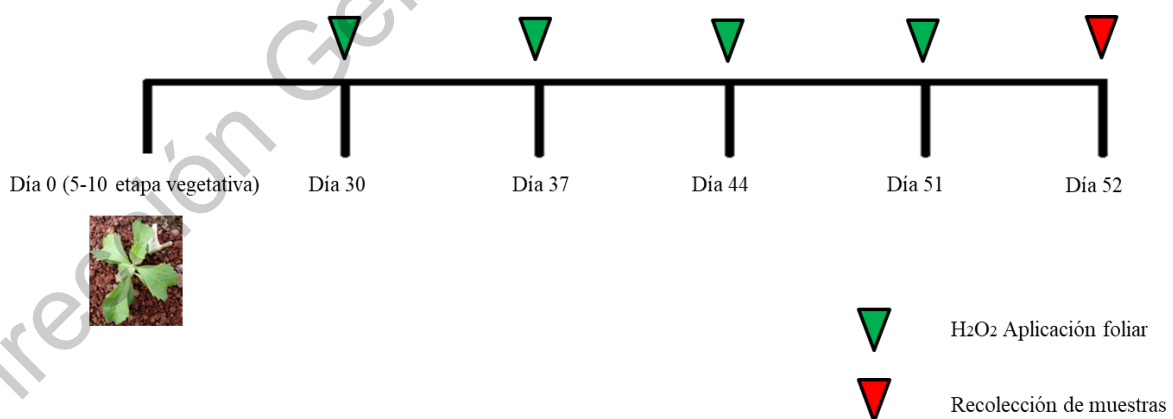


Figura 17. Línea de tiempo de la aplicación de elicitores a plantas de *S. rebaudiana* var. Eirete. Elaboración propia, 2019.

5.14.1 Extracción de ADN y análisis de metilación CpG-ADN.

La extracción de ADN de las plantas de estevia, se realizó de acuerdo con el protocolo CTAB (Doyle, 1991). Las muestras se recolectaron 24 horas después de la última elicitación, se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 ° C hasta su análisis. El ADN obtenido se suspendió en agua desionizada estéril y se conservó a -20 ° C (Mejía-Teniente *et al.*, 2013; Vega-Muñoz *et al.*, 2018). Para el análisis de metilación de las secuencias de CpG-ADN, se utilizó el kit 5-mC DNA ELISA (ZYMO RESEARCH CORP). Esta metodología exclusivamente cuantifica 5-metilcitosina (dinucleótido CpG) en muestras de ADN utilizando un anticuerpo monoclonal (Anti-5-Metilcitosina) (Vega-Muñoz *et al.*, 2018). Después de la reacción antígeno-anticuerpo, cada muestra se cuantificó mediante espectrofotometría (espectrofotómetro modelo Thermo Scientific MULTISKAN GO), los datos obtenidos se analizaron utilizando una constante de ajuste de 3.41 comparada con el 5% de mC de *Arabidopsis thaliana*.

5.15 Evaluación del efecto hormético en plantas de estevia, aplicando ácido salicílico.

El experimento se realizó en las instalaciones del Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops, ubicado en Theodor Echtermeyer Weg 1, D-14979, Großbeeren, Germany, durante la estancia doctoral con fecha de: 1 agosto 2019-31 de octubre 2019, supervisado por el PhD. Dietmar Schwartz.

1. Material biológico. Se utilizaron 100 plantas de *S. rebaudiana* Bertoni var. Morita II), obtenidas a partir de esquejes. Las plantas fueron producidas por la empresa Naturland (Blumenschule Sabine Friesch ubicada en Ausburger strasse 62. 86956 Schongau. Germany) y se recibieron en sustrato peat moss, con una edad fenológica de 1 mes de obtenido el esqueje y una altura de 10-12 cm con 5-8 hojas verdaderas. Las plantas fueron inmediatamente trasplantadas a macetas de 1 L utilizando como sustrato peat moss – perlita 50:50 y nutrición con solución Steiner al 50% con una conductividad eléctrica de 1.5 dS cm⁻¹ y un pH de 5.5 (Vazquez-Hernandez *et al.*, 2019b).

2. Establecimiento de experimentos. Las plantas de estevia fueron distribuidas en bloques completamente al azar dentro de un invernadero. La temperatura promedio del invernadero fue de $26^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa del 70%, el fotoperiodo correspondió a la luz natural de 12:12 ciclos luz-oscuridad, de acuerdo con Vazquez-Hernandez *et al.*, 2019b.

3. Tratamientos de elicitación. Después de quince días después del trasplante, las plantas de estevia se rociaron foliarmente hasta el punto de rocío una vez al día en la parte aérea de la planta, incluido el meristemo apical (usando 10 ml por planta) durante cuatro semanas con SA a una concentración de 0.05 mM, 0.1 mM, 0.5mM, 1 mM, 3 mM, 5 mM, 6.7 mM y 10 mM y se utilizó agua destilada como control. Las muestras fueron recolectadas 24 horas después de la aplicación de los elicitores en la cuarta semana (10-15 hojas por planta, aproximadamente 1500 mg en peso fresco). Las hojas se tomaron al azar de la base, la parte media y superior de la planta, se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se liofilizaron (Vazquez-Hernandez *et al.*, 2019b).

4. Cambios en la morfología de las plantas de *S. rebaudiana*. Los cambios fueron evaluados 24 horas después de la aplicación de los elicitores en la cuarta semana del experimento, se midieron: número de hojas, diámetro basal del tallo con un vernier digital (absoluto de Mutitoyo) y la altura de la planta con un flexómetro (Mejía-Teniente *et al.*, 2013).

5. Análisis de expresión génica. Las muestras fueron liofilizadas, fueron molidas y se tomaron de 50-100 mg para la extracción de ARN y la conversión a cDNA (4.11.1). Posteriormente se realizó el análisis de la expresión genética mediante RT-qPCR como se indicó en el punto 4.11.2.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cultivo de plantas de *S. rebaudiana*

De acuerdo a la metodología propuesta y con base en los objetivos tanto general como específico se estableció el cultivo de *Stevia rebaudiana* cv. Morita II. Se recibieron las 60 plantas provenientes de la Ciudad de Cuernavaca, Morelos en muy buenas condiciones. Estas plantas fueron desinfectadas y puestas en cuarentena. Posteriormente se trasladaron al invernadero de plántula (Figura 18).



Figura 18. Plantas de *S. rebaudiana* Morita II. a) Recepción de plantas. b) Trasplante a peat moss: perlita (50:50) y establecimiento en el invernadero de plántula. Elaboración propia, 2019.

6.2 Aplicación de elicitores

Los tratamientos se realizaron 30 días después del trasplante, utilizando agua destilada como control negativo. Se utilizaron 10 ml de elicitor por planta, que fueron aplicadas vía foliar a la parte aérea incluyendo el meristemo apical. Las muestras fueron colectadas 24 horas después de la elicitación en la cuarta semana de tratamiento (Figura 19).



Figura 19. Aplicación de elicitors vía foliar a plantas de estevia. Elaboración propia, 2019.

6.3 Recolección de muestras

Se realizó la recolección de las muestras tal y como se indica en el apartado 4.4 del capítulo de Materiales y Metodología, se recolectaron aproximadamente 1500 mg de hojas verdaderas de cada una de las plantas de estevia, las cuales fueron colocadas en tubos falcón de 15 ml inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido a -80°C y almacenadas a la misma temperatura (Figura 20). Después de realizada la colecta, para los análisis de cuantificación de SGs, las muestras fueron liofilizadas en la UAQ Campus Aeropuerto, en una liofilizadora marca LABCONCO modelo Freezone 10 (Figura 21), ya liofilizadas fueron pulverizadas y tamizadas (Figura 22).



Figura 20. Colecta de muestras después de la elicitación. Elaboración propia, 2019.

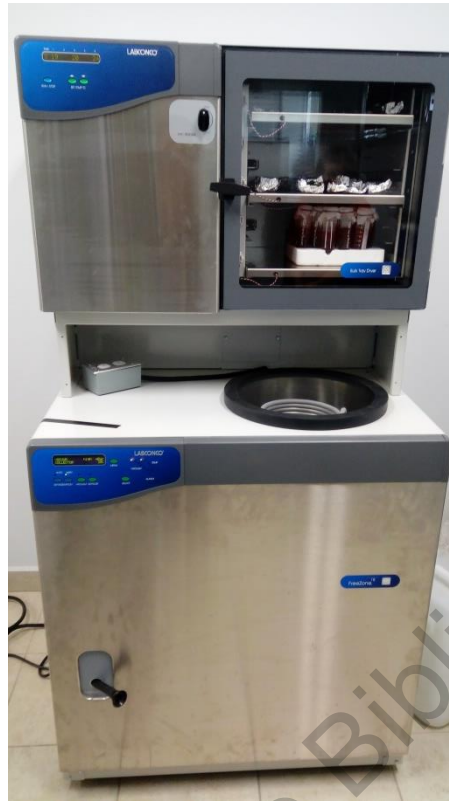


Figura 21. Liofilizadora LABCONCO modelo Freezone 10. UAQ Campus Aeropuerto. Elaboración propia, 2019.

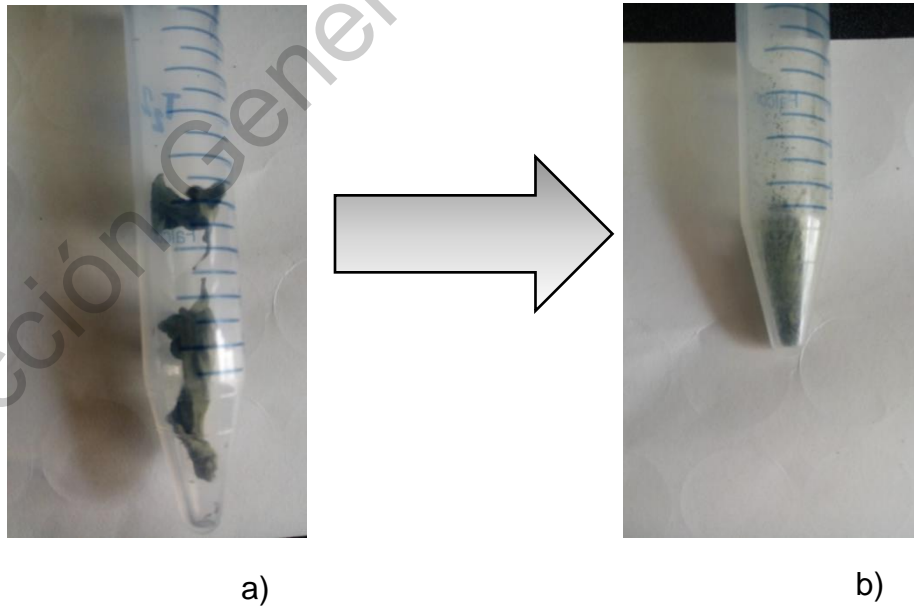


Figura 22. Muestra de estevia. a) liofilizada, b) pulverizada. Elaboración propia, 2019.

6.4 Determinación del contenido de glucósidos de esteviol

Los tratamientos con elicitores aplicados a plantas de estevia, mostraron un incremento significativo comparado con el control (Tabla 1). El tratamiento con el cual se observó un mayor incremento fue el ácido salicílico 0.1 mM, el cual aumento 1.39 veces el contenido de rebaudiosido A, 2.42 veces el rebaudiosido B/esteviosido (iso-reb B) y 1.37 veces el nivel de rebaudiosido C, además de aumentar todos los glucósidos de esteviol cuantificados. Esto concuerda con lo reportado por (Soufi *et al.*, 2016) donde menciona que el ácido salicílico induce la tolerancia a estrés por frío e incrementa el contenido de glucósidos de esteviol.

Tabla 1. Cuantificación SGs en hojas de estevia cuantificadas en mg de SGs por g de muestra seca.

Elicitor	Reb A	Reb B/ Estev	Reb C	Reb D	Reb E	StevBio (Rub)	Reb F	Dulcosido A
AGUA DESTILADA	52.47	49.88	39.73	2.64	1.25	31.63	14.18	0.41
SA 0.1 mM	73.40	120.99	54.44	4.88	2.39	32.62	23.82	0.66
SA 1 mM	53.98	74.13	42.04	2.70	1.41	30.84	15.34	0.69
SA 6.7 mM	65.23	120.02	47.19	4.98	1.76	32.61	20.45	1.05
CH 15 mM	57.03	78.13	48.40	3.29	1.62	37.22	18.95	0.88
CH 1000 mM	50.79	65.03	42.57	3.08	1.28	37.12	14.74	0.71
CH 1500 mM	32.69	18.74	17.07	0.61	0.32	21.44	4.10	0.28
H ₂ O ₂ 2 mM	55.97	103.08	41.30	2.64	1.26	34.26	14.55	0.66
H ₂ O ₂ 20 mM	51.59	77.15	42.35	2.67	1.46	39.55	15.43	0.72
H ₂ O ₂ 200 mM	58.21	91.67	45.34	3.57	1.61	37.62	17.64	0.63

Los resultados obtenidos muestran que el ácido salicílico y el peróxido de hidrógeno incrementan significativamente la cantidad de reb B/esteviosido (iso-reb B) en hojas de estevia comparadas contra el control. Estos resultados muestran claramente que los elicitores aplicados vía foliar disparan el mecanismo de defensa de las plantas e inducen la producción de metabolitos de interés, lo cual concuerda con lo reportado por Javed *et al.*, en 2018, el cual menciona que aplicando diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno a cultivo de tejidos de plantas de estevia se incrementa la cantidad de SGs (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de SGs en estevia, reportado como mg de glucósido de esteviol por gramo de muestra seca.

Tratamiento	Reb A mg g ⁻¹ hoja seca	Reb B/Stev-iso mg g ⁻¹ hoja seca	Reb C mg g ⁻¹ hoja seca
Agua destilada	52.47±0.006 ^d	49.88±0.005 ^b	39.73±0.009 ^b
SA 0.1 mM	73.40±0.006 ^j	120.99±0.012 ^j	54.44±0.018 ^j
SA 1 mM	53.98±0.006 ^e	74.13±0.008 ^d	42.04±0.012 ^d
SA 6.7 mM	65.23±0.060 ⁱ	120.02±0.015 ^j	47.19±0.012 ^h
CH 15 mM	57.03±0.006 ^g	78.13±0.012 ^f	48.40±0.006 ⁱ
CH 1000mM	50.79±0.006 ^b	65.03±0.005 ^c	42.57±0.009 ^f
CH 1500 mM	32.69±0.006 ^a	18.74±0.005 ^a	17.07±0.018 ^a
H ₂ O ₂ 2 mM	55.97±0.009 ^f	103.08±0.008 ^h	41.30±0.021 ^c
H ₂ O ₂ 20 mM	51.59±0.018 ^c	77.15±0.012 ^e	42.35±0.012 ^e
H ₂ O ₂ 200 mM	58.21±0.009 ^h	91.67±0.012 ^g	45.34±0.009 ^g

6.5 Dinámica de la expresión genética de plantas de estevia, aplicando elicitores

Los SGs son producidos principalmente en las hojas de estevia y almacenados en las vacuolas. Su precursor en la ruta bioquímica del MEP es una unidad de isopreno (5-C) proveniente de la MEP plastidal y de la vía MVA citosólica. Estos compuestos son sintetizados en ocho pasos consecutivos y catalizados por enzimas altamente especializadas, en esta ruta solo cinco pasos son considerados específicos para la biosíntesis de los SGs (Ceunen & Geus, 2013; Guleria & Yadav, 2013; Singh *et al.*, 2017). La ruta bioquímica de los SGs está regulada por la etapa fenológica de la planta, donde la producción de SGs se incrementa en la fase vegetativa y disminuye en la fase de floración.

En el trabajo de Singh *et al.*, en 2017 se publicó que los genes relacionados con la biosíntesis de SG fueron sobre regulados en la fase vegetativa; sin embargo, en la investigación realizada por ellos, los experimentos fueron hechos en plántulas *in vitro*, y en el presente trabajo, las plantas de estevia se cultivaron dentro de un invernadero a partir de plántulas obtenidas de semillas certificadas, lo que puede explicar de debido al origen y tipo de cultivo existen variaciones de los resultados obtenidos en este proyecto. Los resultados obtenidos con respecto a la expresión

relativa génica asociada a la biosíntesis de SGs se muestra en la Figura 23. Se observó que el tratamiento SA 0.1 mM mostró la expresión relativa génica más alta en todos los tratamientos (Figura 23). En general, la expresión génica involucrada en la síntesis de SGs se modificó con el uso de los elicitores evaluados en este estudio (Figura 23). Como se muestra en la Figura 23, CH a 1000 mM sobrerregula la expresión de *SrUGT85C2*, pero a la disminuyo la expresión de *SrUGT76G1*, disminuyendo la producción de rebaudiosido A. Además de CH a 1000 mM sobrerregulo la expresión de *SrUGT74G1*, aumentando la producción de esteviosido y rebaudiosido C. El efecto de CH a 1500 mM reprimió significativamente la expresión del gen *SrKAH13*. Además, la expresión de *SrUGT76G1* y *SrUGT85C2* también se reprimió considerablemente, lo que causó una reducción significativa de la cantidad de SGs (Figuras 23, 24 y Tabla 2). Además, la expresión de *SrUGT85C2* se reguló significativamente con la aplicación de H₂O₂ a 20 mM (Figura 24c). Estos resultados sugieren un fuerte control transcripcional de la producción de SGs por parte de los elicitores evaluados en el presente estudio, similar al reportado por las aplicaciones de giberelinas en plantas de estevia (Hajihashemi & Geuns, 2017). El hecho de que la morfología de las plantas de estevia se vio significativamente afectada por los tratamientos aplicados en este experimento, sugiere que la homeostasis de fitohormonas de estas plantas (es decir, el contenido de giberelinas) no se vio afectada significativamente, lo que mejoró el aumento del contenido de SGs. Es probable que el contenido de giberelinas (no fueron analizadas en este proyecto, pero con base en estudios previos como el de Hajihashemi & Geuns, en 2017), aumenten significativamente en algunos tratamientos como H₂O₂ 200 mM, basado en el aumento de la altura de la planta.

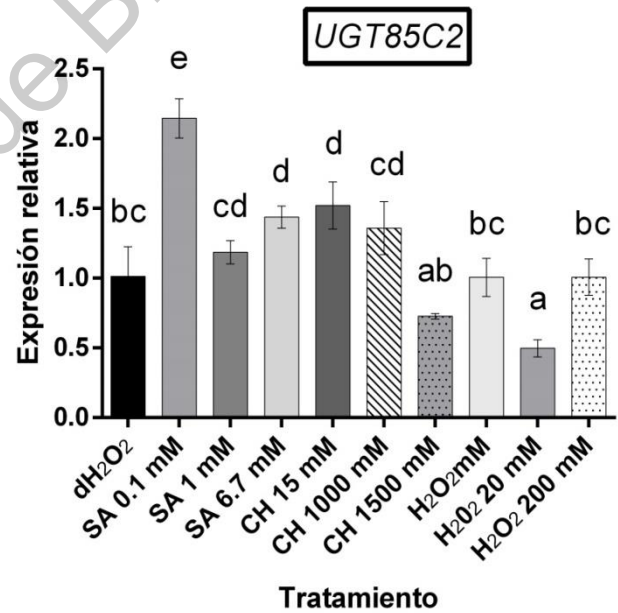
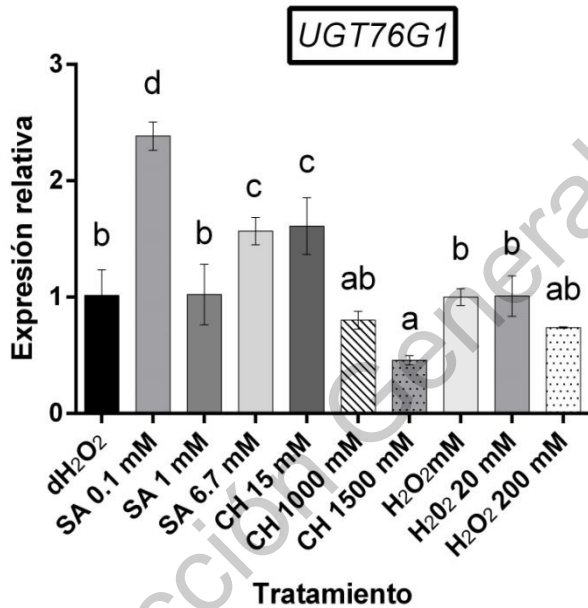
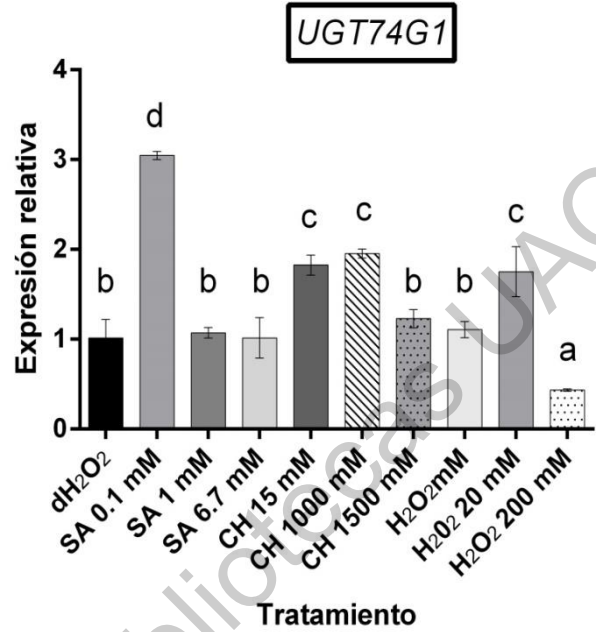
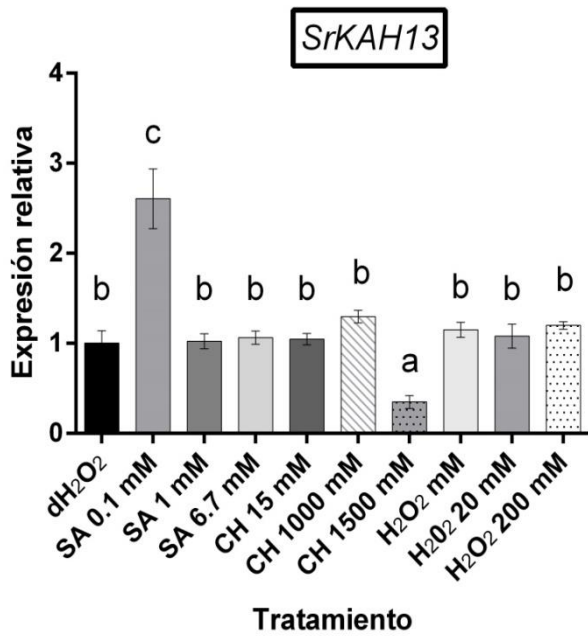


Figura 23. Expresión génica. Expresión relativa de genes involucrados en la producción de glucósidos de esteviol en plantas de *S. rebaudiana* var. Morita II. Elictores aplicados: dH₂O₂ (agua destilada), SA (ácido salicílico), CH (quitosán), H₂O₂ (peróxido de hidrógeno). Las letras indican una diferencia significativa entre los tratamientos según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p = 0.05$). Elaboración propia, 2019.

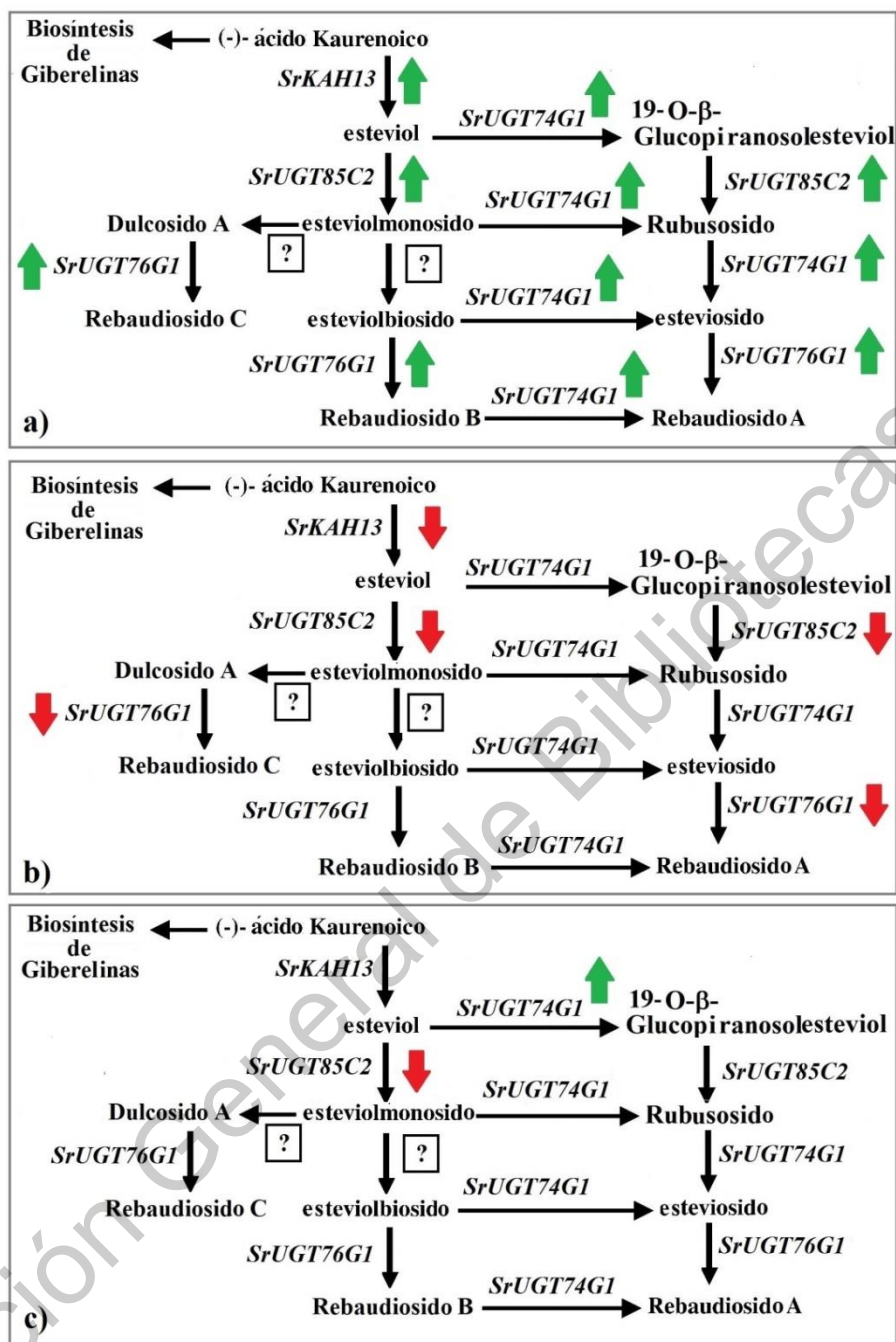


Figura 24. Dinámica de la expresión génica. Resumen de los cambios en la expresión génica en la vía biosintética de los glucósidos de esteviol- MEP, con aplicación de elicitores. La descripción en cada panel corresponde a: a) SA (0.1 mM), b) CH (1500 mM), c) H₂O₂ (20 mM). Simbología. Las flechas verdes indican la sobrerregulación y las flechas rojas indican la represión en la regulación de los genes? Indica genes desconocidos. Se muestran los tratamientos con diferencia significativa de expresión génica y contenido de SGs. Elaboración propia, 2019.

6.6 Cambios en la morfología de la planta después de los tratamientos de elicitación

Después de las aplicaciones de SA, CH y H₂O₂, las plantas de estevia se evaluaron en términos de diámetro del tallo, altura y número de hojas (Tabla 3). Con respecto al número de hojas, el tratamiento con SA 0,1 mM tuvo un incremento de 3.4 veces la cantidad de hojas, seguido de SA a 1 mM (2.88 veces), CH a 1000 mM (2.77 veces), CH a 15 mM (2,63 veces), CH a 1500 mM (2.55 veces) en comparación con las plantas control (Tabla 3). Se observó un efecto significativo de la elicitación sobre el diámetro del tallo con H₂O₂ a 2 mM (aumentó 1.48 veces) y con H₂O₂ a 200 mM (aumentó 1.7 veces) en comparación con el control (Tabla 3). Además, la altura de la planta aumentó significativamente con H₂O₂ a 200 mM (Tabla 3). La estimación del área foliar que comparó el tratamiento con la mayor diferencia significativa en el número de hojas (SA 0.1 mM) y las plantas de control mostró diferencia significativa (Figura 25). (Soufi *et al.*, 2016) en 2016, publicó una evaluación de los cambios morfológicos de las plantas de estevia provocados con SA, H₂O₂ y CaCl₂ (a concentraciones de 0,5, 10 y 10 mM respectivamente), sus resultados mostraron un aumento en el número de hojas, obteniendo hasta 1.56 veces más hojas por planta con la aplicación de SA, esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, de manera interesante en ese artículo, los autores mostraron un aumento en el número de hojas incluso con SA 1 mM lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este Proyecto. Usando CH, el número máximo de hojas en las plantas elicidadas aumentó 2.77 veces en comparación con el control, lo que concuerda con los resultados obtenidos por (Bayraktar *et al.*, 2016), que menciona que, utilizando una suplementación con CH en plantas de estevia, se obtiene un aumento en el número de hojas por explante. Estos autores evaluaron concentraciones de CH de 50, 100 y 200 μM en plantas cultivadas in vitro. Debido a los resultados obtenidos en este experimento, se puede concluir que SA 0.1 mM y CH (15, 1000 y 1500 mM) tienen una función bioestimulante en la planta de estevia.

Tabla 3. Cambios morfológicos en plantas de estevia, aplicando elicitores. Las letras indican una diferencia significativa entre los tratamientos según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p = 0.05$).

Elicitor	No. de hojas	Diám. de tallo (mm)	Altura (mm)
Agua Destilada	12.00 ± 0.57 ^a	1.35 ± 0.06 ^a	124.27 ± 11.50 ^a
SA 0.1 mM	41.67 ± 1.76 ^e	1.56 ± 0.21 ^{ab}	166.30 ± 20.13 ^a
SA 1 mM	34.00 ± 0.57 ^{de}	1.38 ± 0.22 ^a	111.79 ± 9.92 ^a
SA 6.7 mM	13.33 ± 1.45 ^a	1.30 ± 0.07 ^a	139.49 ± 12.93 ^{ab}
CH 15 mM	31.67 ± 2.33 ^{cde}	1.87 ± 0.22 ^{ab}	111.61 ± 14.01 ^{ab}
CH 1000mM	33.33 ± 6.38 ^{cde}	1.54 ± 0.11 ^a	132.79 ± 14.03 ^{ab}
CH 1500 mM	30.67 ± 5.60 ^{bcde}	1.80 ± 0.22 ^{ab}	128.66 ± 15.17 ^{ab}
H ₂ O ₂ 2 mM	18.33 ± 2.90 ^{abc}	2.01 ± 0.06 ^{ab}	141.74 ± 12.63 ^{ab}
H ₂ O ₂ 20 mM	18.67 ± 1.20 ^{abcd}	1.44 ± 0.08 ^a	106.69 ± 2.25 ^{ab}
H ₂ O ₂ 200 mM	15.67 ± 1.20 ^{ab}	2.31 ± 0.02 ^b	183.44 ± 10.68 ^b



a)



b)

Figura 25. Morfología de plantas de estevia al término del experimento. a) Control (agua destilada), b) SA 0.1 mM. Elaboración propia, 2019.

6.7. Correlación de variables de respuesta en función de los tratamientos de elicitación

Se realizó el análisis de correlación multivariada de respuesta a los tratamientos de elicitación aplicados a plantas de estevia (*S. rebaudiana* cv. Morita II) (Tabla 4 y Figura 26). Todas las rutas bioquímicas de biosíntesis tienen pasos críticos o limitantes y esos pasos son muy regulados, responden de manera muy rápida a los estímulos ambientales, los pasos que no son críticos no tienen una alta regulación, por lo cual al hacer el análisis de la expresión génica no se observan cambios significativos ante factores ambientales que modifiquen su morfología o el contenido de SGs. En el caso de la biosíntesis de SGs el gen con mayor regulación es el *SrKAH13*, que es clave en la síntesis de SGs y giberelinas como lo menciona (Singh *et al.*, 2017) como se observó en la Tabla 5.4 y en la Figura 5.4, este gen tiene una alta correlación con la expresión relativa del gen *SrUGT76* (0.8007) y la producción de rebaudiosido A (0.08256), que a su vez correlaciona con la producción de esteviosido-reb B (0.9232) y rebaudiosido C (0.9334).

Tabla 4. Correlación multivariada de respuesta a los tratamientos de elicitación.

	<i>SRKAH13</i>	<i>UGT74</i>	<i>UGT76</i>	<i>UGT85</i>	REB A	ESTEV.	REB C	No. HOJAS	DIAM. TALLO	ALTURA
<i>SRKAH13</i>	1.0000	0.7121	0.8007	0.7736	0.8256	0.6883	0.7589	0.4172	-0.0805	0.4941
<i>UGT74</i>	0.7121	1.0000	0.6831	0.6140	0.3690	0.2338	0.3707	0.7213	-0.2852	-0.0442
<i>UGT76</i>	0.8007	0.6831	1.0000	0.8388	0.8469	0.7098	0.7492	0.3513	-0.2668	0.1827
<i>UGT85</i>	0.7736	0.6140	0.8388	1.0000	0.7466	0.5787	0.6570	0.5456	-0.1236	0.3672
REB A	0.8256	0.3690	0.8469	0.7466	1.0000	0.9232	0.9334	0.0489	-0.1095	0.4454
ESTEV.	0.6883	0.2338	0.7098	0.5787	0.9232	1.0000	0.8368	-0.0591	0.0166	0.4588
REB C	0.7589	0.3707	0.7492	0.6570	0.9334	0.8368	1.0000	0.0588	-0.0953	0.2728
No. HOJAS	0.4172	0.7213	0.3513	0.5456	0.0489	-0.0591	0.0588	1.0000	-0.0566	-0.0555
DIAM. TALLO	-0.0805	-0.2852	-0.2668	-0.1236	-0.1095	0.0166	-0.0953	-0.0566	1.0000	0.5443
ALTURA	0.4941	-0.0442	0.1827	0.3672	0.4454	0.4588	0.2728	-0.0555	0.5443	1.0000

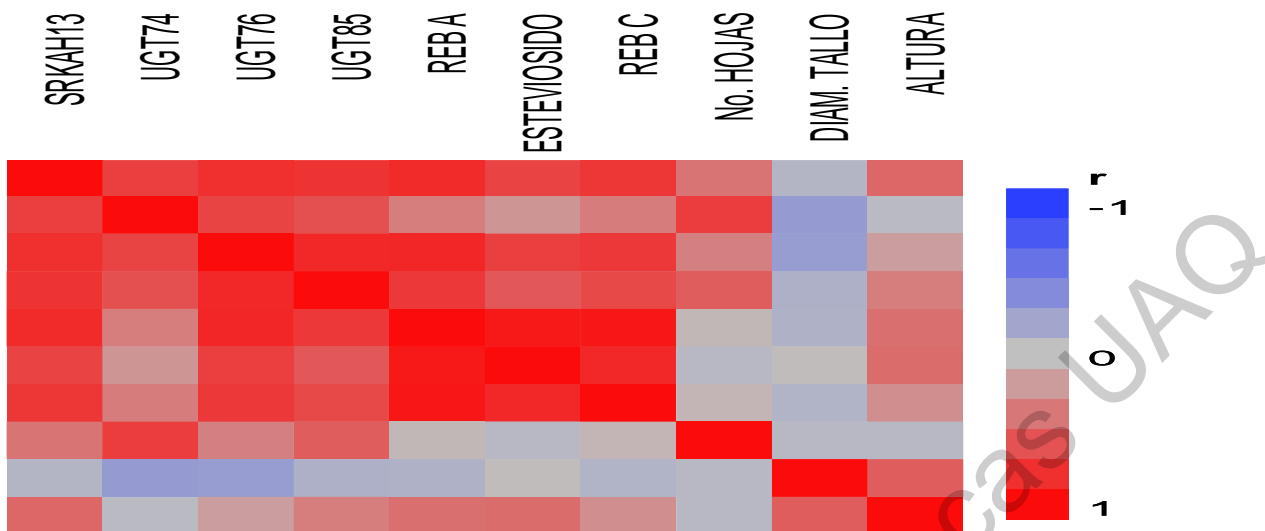


Figura 26. Heatmap X-Y de la correlación multivariada de respuesta a los tratamientos de elicitación. JMP 7.0. Elaboración propia, 2019.

6.8 Protocolo para reproducción asexual de plantas de estevia

De acuerdo a lo publicado por Lozano Contreras & Ramirez Jaramillo en 2018, se desarrolló un protocolo para reproducción asexual de las plantas de estevia por medio de esquejado de plantas madre. Este protocolo incluyó el uso de un enraizador comercial (Proroot®) para incrementar la formación de raíces y promover la obtención de plántulas (Figura 27).



Figura 27. Esquema del protocolo de reproducción asexual de plantas de estevia. Elaboración propia, 2019.

A partir de 10 plantas madres proporcionadas por INIFAP campus Bajío. Se obtuvo un 95 % de viabilidad de los esquejes y se obtuvieron 120 plantas a dos meses de iniciado el esquejado de las plantas madre, las cuales fueron cultivadas bajo condiciones de invernadero y utilizadas para posteriores experimentos (Figura 28).



Figura 28. Plantas obtenidas a partir del protocolo de esquejado. Elaboración propia, 2019.

6.9 Análisis de los cambios en la metilación de las secuencias CpG-ADN asociados al tratamiento con elicitores

6.9.1 Cambios en los niveles de metilación CpG-ADN

En las plantas de estevia, se observó que la aplicación de H_2O_2 en una concentración de 200 mM, disminuyó significativamente el porcentaje de 5-mC (Figura 29). En 2019, Farnés *et al.*, 2019 publicó que la metilación del ADN no es al azar y que varía dependiendo del tejido, de la etapa fenológica y la exposición al estrés ambiental, en estevia, el tratamiento con elicitores se realizó en plantas con 15-20 hojas verdaderas y el porcentaje de metilación disminuyó en un 21.81%, aunque no existen reportes que indiquen que porcentaje metilación puede ser fundamental para la adaptación y supervivencia en el medio ambiente de las plantas, esta investigación puede ser la base para conocer el efecto epigenético en estevia.

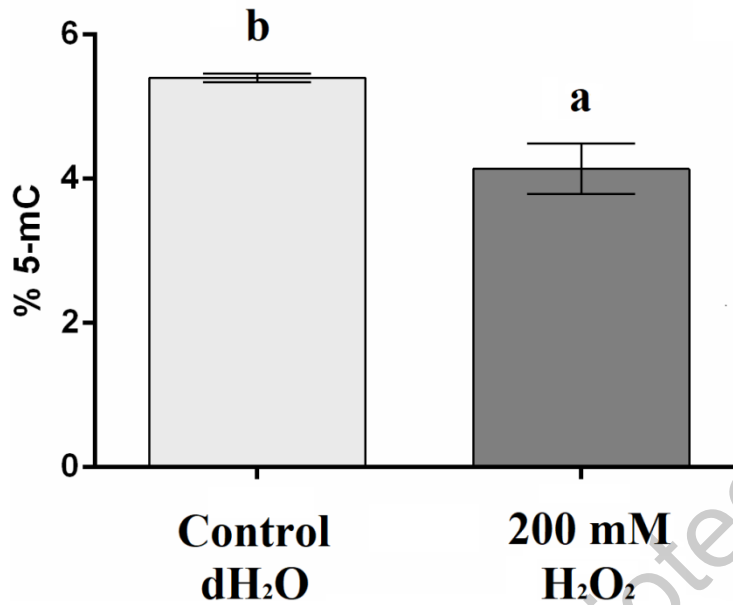


Figura 29. Porcentaje de metilación en plantas elicidadas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2 a 200 mM). Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$). Elaboración propia, 2019.

6.9.2 Respuesta morfológica de las plantas a los tratamientos de elicitación

Los resultados del tratamiento de elicitación con H_2O_2 a 200 mM a las plantas de estevia mostraron un incremento significativo en la altura (57.89 %) y en el número de hojas (40 %). Sin embargo, el diámetro de tallo mostró una disminución del 37.5 % (Tabla 5). Esto concuerda con lo publicado por Lele *et al.*, en 2018, donde explica que la exposición de las plantas al estrés del medio ambiente, induce la metilación del ADN lo cual provoca la plasticidad fenotípica que tiene un papel muy importante en la adaptación de los organismos a las condiciones de su hábitat.

Tabla 5. Respuesta morfológica a los tratamientos de elicitación de las plantas de estevia (*Stevia rebaudiana*).

Respuesta morfológica		
<i>Stevia rebaudiana</i>	Control	200 mM H₂O₂
Altura (cm)	95±3.180 ^a	150±2.603 ^b
Diám. de tallo (mm)	8±0.3305 ^a	5±0.1618 ^b
Número de hojas	250±9.018 ^a	350±10.40 ^b

* Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p=0.05$) y todos los datos incluyen \pm SEM.

6.10 Evaluación del estado hormético de plantas de estevia aplicando ácido salicílico

Según Vargas-Hernandez *et al.*, en 2017, la hormesis se puede definir como una respuesta bifásica en la cual la aplicación de eustresores en bajas dosis puede estimular el sistema de defensa de las plantas incrementando la producción de metabolitos especializados y de forma contraria, altas dosis de eustresores puede inhibir o incluso ser tóxico. Los cambios ocasionados en los organismos en condiciones de estrés, con la aplicación de bajas dosis de eustresores expresan fenotipos alterados, adaptados a los cambios medioambientales (plasticidad). Diversos estudios han documentado el uso de compuestos de origen biótico llamados elicitores que, aplicados vía foliar, inducen la respuesta de defensa de las plantas (SA, CH, H₂O₂, CaCl₂, entre otros) incrementando la producción de metabolitos especializados incluyendo los glucósidos de esteviol en plantas de *S. rebaudiana* B. (Soufi *et al.*, 2016; Vargas-Hernandez *et al.*, 2017; Vazquez-Hernandez *et al.*, 2019b).

6.10.1 Dinámica de la expresión genética de plantas de estevia, aplicando ácido salicílico

En el experimento realizado en la estancia doctoral, los resultados mostraron que no existen diferencias significativas en la expresión relativa de los genes, entre los tratamientos aplicados a las plantas de estevia comparados con el control (Figura 30). A diferencia del experimento realizado en las instalaciones de la UAQ campus

Amazcala utilizando como elicitores SA, CH y H₂O₂ donde se observó una sobreexpresión de los genes con el tratamiento de SA 0.1 mM. Los tratamientos con SA a 6.7mM y 10mM no pudieron ser evaluados debido al efecto toxico de los elicitores en estas plantas, pues tuvieron un daño irreversible y un porcentaje de mortalidad del 100% por lo cual no se pudo obtener material para su procesamiento.

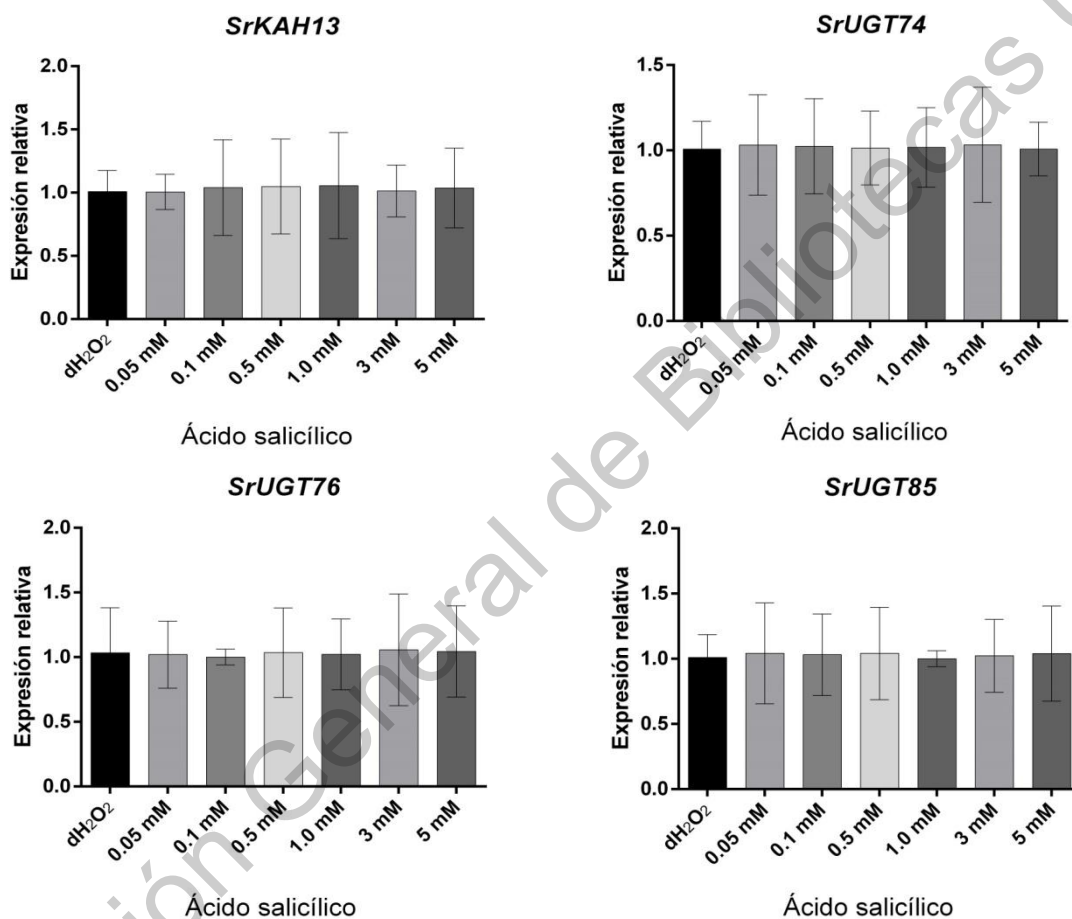


Figura 30. Expresión génica con aplicación de ácido salicílico. Expresión relativa de genes involucrados en la producción de glucósidos de esteviol en plantas de *S. rebaudiana* var. Morita II. Elicitores aplicados: dH₂O₂ (agua destilada), SA (ácido salicílico). Las letras indican una diferencia significativa entre los tratamientos según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p = 0.05$). Elaboración propia, 2020.

6.10.2 Cambios en la morfología de la planta después de los tratamientos con ácido salicílico

Como puede observarse en la Figura 31 y 32 los cambios en la morfología de las plantas de estevia que fueron utilizadas en este experimento tuvieron diferencias significativas comparadas con el control. El tratamiento con SA 0.05 mM ocasiono plantas con una mayor altura y diámetro de tallo, pero con número de hojas sin diferencia con el control. El tratamiento con SA 0.1 mM produjo plantas con una altura sin diferencia con el control, con diámetro mayor y un número de hojas significativamente diferente al control. Los tratamientos con SA a 0.5 mM y 1.0 mM se comportaron de manera muy parecida al control. A partir el tratamiento con SA 3 mM las plantas presentaron daño foliar a partir de la segunda semana de las aplicaciones y en la cuarta semana el daño fue letal, con el tratamiento de 5 mM, 6.7 mM y 10 mM las plantas presentaron 70. 80 y 100% de muerte respectivamente. El efecto hormético mostrado por el ácido salicílico concuerda con lo reportado en trabajos previos de Singh *et al.*, 2017 y Vazquez-Hernandez *et al.*, 2019b, en los cuales se muestra que, a bajas concentraciones de este elicitor, actúa como bioestimulante induciendo la producción de glucósidos de esteviol y modificando la morfología de la planta, dando como resultado plantas de mayor altura, diámetro y número de hojas, comparado con el control.

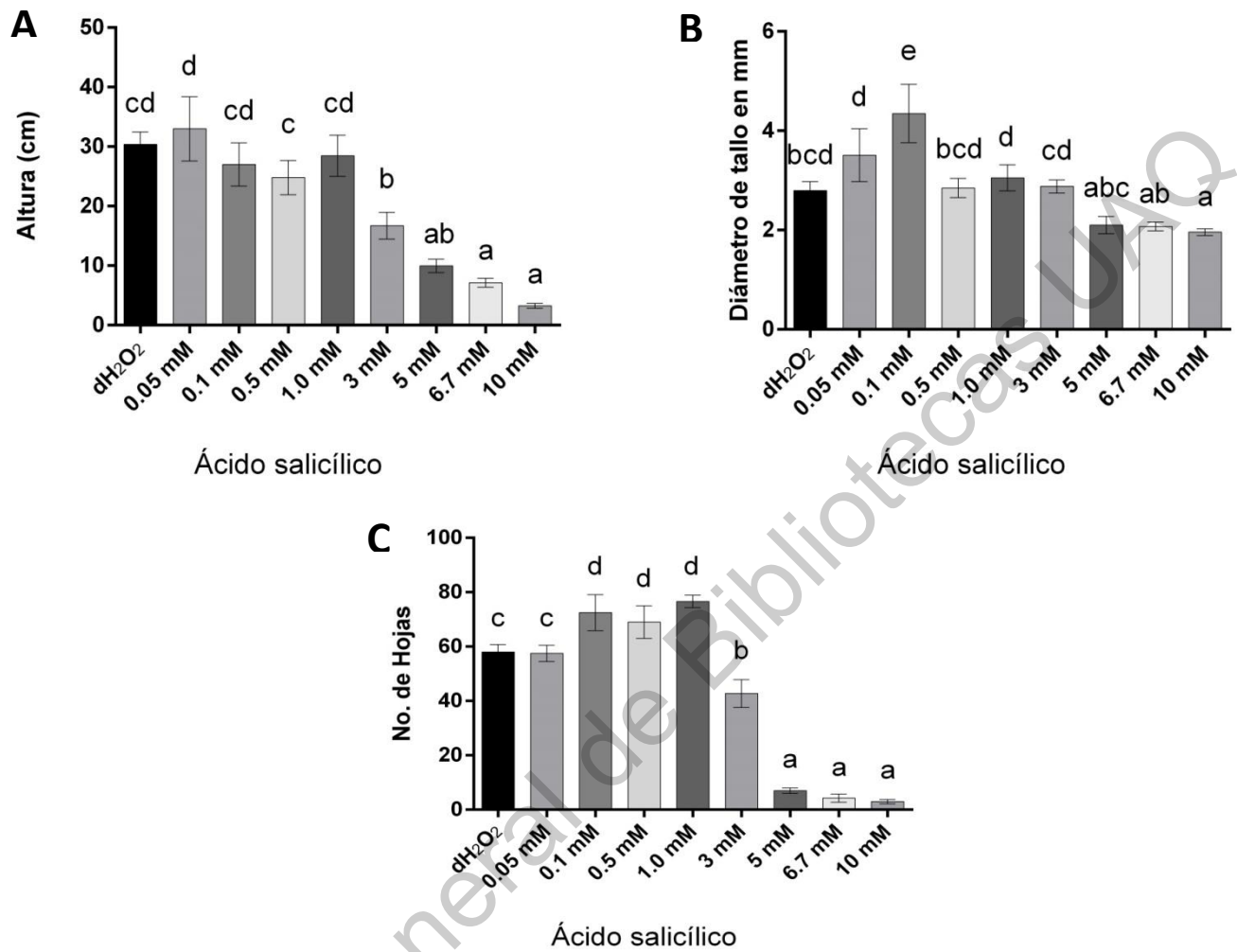


Figura 31. Cambios morfológicos en plantas de estevia, aplicando elicitores. Las letras indican una diferencia significativa entre los tratamientos según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p = 0.05$). Elaboración propia, 2020.

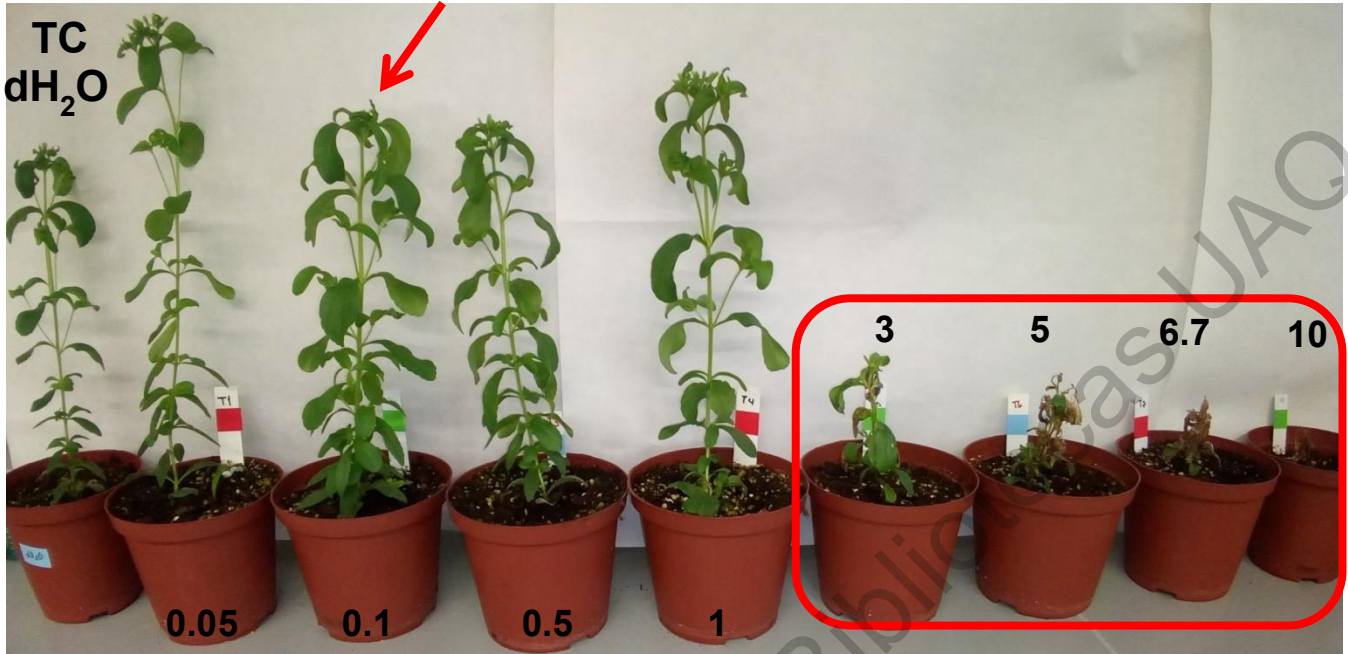


Figura 32. Hormesis de estevia. Efecto dosis-respuesta en plantas de estevia con la aplicación de ácido salicílico (Concentraciones en mM). Elaboración propia, 2020.

VII. CONCLUSION

Con la aplicación vía foliar de Peróxido de Hidrógeno, Quitosán y Ácido Salicílico, en concentraciones que ocasionen Eustres se induce la producción de los SGs, además de la sobreexpresión de los genes involucrados en la ruta bioquímica de flujo de carbono para la producción de glucósidos de estevioli.

Los resultados mostraron un incremento significativo de la expresión relativa de los genes *SrKA13H*, *SrUGT85C2* y *SrUGT74G1* en las plantas tratadas con elicitores, comparadas contra el control y el mejor resultado se obtuvo con el tratamiento de ácido salicílico (0.1 mM) el cual también modifica favorablemente la morfología de la planta, por lo cual se observa que puede tener una función de bioestimulante.

VIII. REFERENCIAS

Agathokleous, E., Kitao, M., & Calabrese, E. J. (2019). Hormesis: A compelling platform for sophisticated plant science. *Trends in plant science*

Alonso, C., Ramos-Cruz, D., & Becker, C. (2019). The role of plant epigenetics in biotic interactions. *New Phytologist*, 221(2), 731-737.

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

Avramova, Z. (2015). Transcriptional 'memory' of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *The Plant Journal*, 83(1), 149-159.

Basdeki, L., & Hagidimitriou, M. (2019). The Role of DNA Methylation in Perennial Plants. *Notulae Scientia Biologicae*, 11(1), 1-11.

Bayraktar, M., Naziri, E., Akgun, I.H., Karabey, F., Ilhan, E., Akyol, B., Bedir, E., Gurel, A., 2016. Elicitor induced stevioside production, in vitro shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 127, 289-300.

Behroozi, P., Baghizadeh, A., Saei, A., & Kharazmi, S. (2017). Quantitative analysis of uridine diphosphate glycosyltransferase UGT85C2, UGT74G1 and UGT76G1 genes expression in *Stevia rebaudiana* under different irrigations. *Russian journal of plant physiology*, 64(1), 67-72.

Bektas, Y., & Eulgem, T. (2015). Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in plant science*, 5, 804.

Bewick, A. J., & Schmitz, R. J. (2017). Gene body DNA methylation in plants. *Current opinion in plant biology*, 36, 103-110.

Carakostas, M. C., Curry, L. L., Boileau, A. C., & Brusick, D. J. (2008). Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), S1-S10.

Cardenas-Manríquez, G., Vega-Muñoz, I., Villagómez-Aranda, A. L., León-Galvan, M. F., Cruz-Hernandez, A., Torres-Pacheco, I., ... & Guevara-Gonzalez, R. G. (2016). Proteomic and metabolomic profiles in transgenic tobacco (*N. tabacum xanthi nc*) to CchGLP from *Capsicum chinense* BG-3821 resistant to biotic and abiotic stresses. *Environmental and experimental botany*, 130, 33-41.

Carrascal, R. H. (2016). *Manual de cultivo de la stevia para agricultores* (No. Bajados de internet/2015). Asociacion Española de la *Stevia Rebaudiana*.

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

Chughtai, M. F. J., Pasha, I., Butt, M. S., & Asghar, M. (2019). Biochemical & nutritional attributes of *Stevia rebaudiana* grown in Pakistan. *Progress in Nutrition*, 21(2-S).

Devkota, K. P., Charan, R. D., Priedemann, C., Donovan, R., Snyder, T. M., Ramirez, C., . . . Prakash, I. (2019). Five New Ent-Atisene Glycosides From *Stevia rebaudiana*. *Natural Product Communications*, 14(7), 1934578X19862651.

deGuzman, R. R., Midmore, D. J., & Walsh, K. B. (2019). Do Steviol Glycosides Provide Ecological Fitness to *Stevia rebaudiana* through Impact on Dietary Preference of Plant Pests and Herbivores?. *Journal of natural products*.

Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293). Springer, Berlin, Heidelberg.

Espinas, N. A., Saze, H., & Saijo, Y. (2016). Epigenetic control of defense signaling and priming in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 1201.

Farnés, C. P., Aparicio, A., & Albaladejo, R. G. (2019). Una aproximación a la ecología epigenética en plantas. *Revista Ecosistemas*, 28(2), 69-74.

Ferrazzano, G. F., Cantile, T., Alcidi, B., Coda, M., Ingenito, A., Zarrelli, A., . . . Pollio, A. (2016). *Stevia rebaudiana* Bertoni a non cariogenic sweetener? A review. *Molecules*, 21(1), 38.

Gallusci, P., Dai, Z., Génard, M., Gauffretau, A., Leblanc-Fournier, N., Richard-Molard, C., ... & Brunel-Muguet, S. (2017). Epigenetics for plant improvement: current knowledge and modeling avenues. *Trends in plant science*, 22(7), 610-623.

Gao, Q.-M., Zhu, S., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in plant science*, 6, 228.

García-Mier, L., Guevara-González, R. G., Mondragón-Olguín, V. M., del Rocío Verduzco-Cuellar, B., & Torres-Pacheco, I. (2013). Agriculture and bioactives: achieving both crop yield and phytochemicals. *International journal of molecular sciences*, 14(2), 4203-4222.

García-Mier, L., Jiménez-García, S. N., Guevara-González, R. G., Feregrino-Pérez, A. A., Contreras-Medina, L. M., & Torres-Pacheco, I. (2015). Elicitor mixtures significantly increase bioactive compounds, antioxidant activity, and quality parameters in sweet bell pepper. *Journal of Chemistry*, 2015.

Gonzalez-Bosch, C. (2018). Priming plant resistance by activation of redox-sensitive genes. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 171-180.

González-Chavira, M. M., Estefania-Ojeda, S., Pons-Hernández, J. L., Guevara-González, R. G., & Maldonado, S. H. G. (2018). Cambios en el contenido de compuestos fenólicos, esteviosidos y nivel de metilación en *Stevia rebaudiana* elicitada. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(7), 1435-1446.

González, C., Tapia, M. S., Pérez, E., Dornier, M., & Morel, G. (2014). Caracterización de cultivares de *Stevia rebaudiana* Bertoni de diferentes procedencias. *Bioagro*, 26(2), 79-88.

Guevara Figueroa, T. (2015). Estudio molecular del efecto de la temperatura de almacenamiento pre-siembra en el perfil transcriptómico de ajo (*Allium sativum* L.) CV.coreano. (Doctoral dissertation).

Guleria, P., & Yadav, S. K. (2013). Agrobacterium mediated transient gene silencing (AMTS) in *Stevia rebaudiana*: insights into steviol glycoside biosynthesis pathway. *Plos One*, 8(9), e74731.

Guleria, P., Masand, S., & Yadav, S. K. (2014). Overexpression of SrUGT85C2 from *Stevia* reduced growth and yield of transgenic *Arabidopsis* by influencing plastidial MEP pathway. *Gene*, 539(2), 250-257.

Hajhashemi, S., Geuns, J.M., Ehsanpour, A.A., 2013. Gene transcription of steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni under polyethylene glycol, paclobutrazol and gibberellic acid treatments in vitro. *Acta physiologiae plantarum* 35, 2009-2014.

Hajhashemi, S., & Geuns, J. M. (2017). Steviol glycosides correlation to genes transcription revealed in gibberellin and paclobutrazol-treated *Stevia rebaudiana*. *Journal of plant biochemistry and biotechnology*, 26(4), 387-394.

Hajhashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J. M., Djalovic, I., & Siddique, K. H. (2018). Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana*. *Frontiers in plant science*, 9.

Herrera, F., Gómez, R., González, C., 2012. El cultivo de Stevia (*Stevia rebaudiana*) Bertoni en condiciones agroambientales de Nayarit, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Folleto Técnico.

Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., & Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in plant science*, 6, 171.

Hossain, M. F., Islam, M. T., Islam, M. A., & Akhtar, S. (2017). Cultivation and uses of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): a review. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 17(4), 12745-12757.

Howlader, M. M. S., Ahmed, S. R., Kubra, K., & Bhuiyan, M. K. H. (2016). Biochemical and phytochemical evaluation of *Stevia rebaudiana*. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 2(1), 121-130.

Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular plant*, 7(8), 1267-1287.

Javed, R., Yücesan, B., Gurel, E., 2018. Hydrogen peroxide-induced steviol glycosides accumulation and enhancement of antioxidant activities in leaf tissues of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Tech* 20, 100-104.

Juarez Lopez, P., Bugarin Montoya, R., Castro Brindis, R., Sanchez Monteon, A. L., Cruz Crespo, E., Juarez Rosete, C., ... & Balois Morales, R. (2011). Estructuras utilizadas en la agricultura protegida.

Karaköse, H., Jaiswal, R., & Kuhnert, N. (2011). Characterization and quantification of hydroxycinnamate derivatives in *Stevia rebaudiana* leaves by LC-MS n. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(18), 10143-10150.

Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Pompeiano, A., ... & Angelini, L. G. (2016). The positive role of steviol glycosides in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under drought stress condition. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 150(6), 1323-1331.

Kim, M. J., Jin, J., Zheng, J., Wong, L., Chua, N.-H., & Jang, I.-C. (2015). Comparative transcriptomics unravel biochemical specialization of leaf tissues of *Stevia* for diterpenoid production. *Plant physiology*, 169(4), 2462-2480.

Kolb, N., Herrera, J. L., Ferreyra, D. J., & Uliana, R. F. (2001). Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: improved HPLC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4538-4541.

Kumar, H., Kaul, K., Bajpai-Gupta, S., Kaul, V. K., & Kumar, S. (2012). A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene*, 492(1), 276-284.

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

Kumari, N., & Kumar, S. (2017). Chemistry and analytical techniques for entkaurene-glycosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni-A review. *Journal of Applied and Natural Science*, 9(4), 2114-2126.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods* 25, 402-408.

Lorenzo, C., Serrano-Díaz, J., Plaza, M., Quintanilla, C., Alonso, G.L., 2014. Fast methodology of analysing major steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food chemistry* 157, 518-523.

Lang, Z., Lei, M., Wang, X., Tang, K., Miki, D., Zhang, H., ... & Yan, J. (2015). The methyl-CpG-binding protein MBD7 facilitates active DNA demethylation to limit DNA hyper-methylation and transcriptional gene silencing. *Molecular cell*, 57(6), 971-983.

Lele, L., Ning, D., Cuiping, P., Xiao, G., & Weihua, G. (2018). Genetic and epigenetic variations associated with adaptation to heterogeneous habitat conditions in a deciduous shrub. *Ecology and evolution*, 8(5), 2594-2606.

Lozano Contreras, M. G., & Ramírez Jaramillo, G. (2018). Propagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni con enraizadores biológicos.

Lucho, S. R., do Amaral, M. N., Benitez, L. C., Milech, C., Kleinowski, A. M., Bianchi, V. J., & Braga, E. J. B. (2018). Validation of reference genes for RT-qPCR studies in *Stevia rebaudiana* in response to elicitor agents. *Physiology and molecular biology of plants*, 24(5), 767-779.

Mandhan, V., Kaur, J., & Singh, K. (2012). smRNAome profiling to identify conserved and novel microRNAs in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC plant biology*, 12(1), 197.

Marchyshyn, S., Hudz, N., Dakhym, I., Husak, L., & Demydyak, O. (2018). HPLC analysis of phenolic compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves.

Martínez Cruz, M. (2015). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una revisión. *Cultivos tropicales*, 36, 5-15.

Martono, Y., Rohman, A., Riyanto, S., & Martono, S. (2018). *Analysis Study of Stevioside and Rebaudioside A from Stevia rebaudiana Bertoni by Normal Phase SPE and RP-HPLC*. Paper presented at the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.

Mejía-Teniente, L., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M. M., Ocampo-Velazquez, R. V., Herrera-Ruiz, G., Chapa-Oliver, A. M., & Guevara-González, R. G. (2010). Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology*, 9(54), 9155-9162.

Mejía-Teniente, L., Durán-Flores, F. d. D., Chapa-Oliver, A. M., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernández, A., González-Chavira, M. M., . . . Guevara-González, R. G. (2013). Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 10178-10196.

Modi, A. R., Raj, S., Kanani, P., Patel, A., & Narayanan, S. (2014). Analysis of differentially expressed genes involved in stevioside biosynthesis in cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni treated with steviol as an immediate precursor. *Journal of plant growth regulation*, 33(3), 481-488.

Mohammadi, A. H., Zarghami, R., Kashani, A., Sharifabad, H. H., & Mohammadi, G. N. (2017). Effect of Different Hormonal Treatment on *Stevia* (*rebaudiana* Bertoni) Micro-propagation. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 20(9), 457-464.

Muanprasat, C., Sirianant, L., Sawasvirojwong, S., Homvisasevongsa, S., Suksamrarn, A., & Chatsudthipong, V. (2013). Activation of AMP-activated protein kinase by a plant-derived dihydroisosteviol in human intestinal epithelial cell. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, b12-00711.

Orozco, A. J., Tatis, H. A., & Leguízamo, A. C. (2011). Estabilidad fenotípica y densidades de planta de genotipos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) en la región Caribe de Colombia. *Acta Agronómica*, 60(2), 165-175.

Oviedo-Pereira, D., Alvarenga Venutolo, S., Lozano, S. E., Sepúlveda Jiménez, G., & Rodríguez Monroy, M. (2015). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un cultivo promisorio para México. *BioTecnología*, 19(2).

Pal, P. K., Kumar, R., Guleria, V., Mahajan, M., Prasad, R., Pathania, V., ... & Singh, R. D. (2015). Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC plant biology*, 15(1), 67.

Prakash, I., Ma, G., Bunders, C., Charan, R., Ramirez, C., Devkota, K., & Snyder, T. (2017). A novel diterpene glycoside with nine glucose units from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Biomolecules*, 7(1), 10.

Prakash, I., Markosyan, A., & Bunders, C. (2014). Development of next generation stevia sweetener: Rebaudioside M. *Foods*, 3(1), 162-175.

Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R., & Palazon, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2), 182.

Ramírez-Jaramillo, G., & Lozano-Contreras, M. G. (2017). LA PRODUCCIÓN DE *Stevia rebaudiana* Bertoni EN MÉXICO. Guía para autores AGRO.

Rather, A. H., Singh, S., Suhail, B., & Patel, G. (2019). Stevia (Meethi Patti) as an alternative form of sugar. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(2), 453-457.

Reyes Castañeda, P. (1997). *Diseño de experimentos aplicados* (No. 311.21/R456). Trillas. México. MX.

Rezaie, S., Dehestani-Ardakani, M., & Kamali, K. (2018). A new protocol for direct regeneration of stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) by tissue culture techniques. *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, 1(2), 97-104.

Robayo, M. Y. D., & Gutiérrez, M. C. (2014). Mecanismos de resistencia sistémica en plantas. *Acta Iguazu*, 3(2), 1-19.

Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I. F., Castaño-Tostado, E., Amaya-Llano, S., Rodríguez-García, M. E., & Reynoso-Camacho, R. (2018). Improvement of physico-chemical properties and phenolic compounds bioavailability by concentrating dietary fiber of peach (*Prunus persica*) juice by-product. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(8), 3109-3118..

Roy, A., & De, S. (2015). Resistance-in-series model for flux decline and optimal conditions of Stevia extract during ultrafiltration using novel CAP-PAN blend membranes. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 489-499.

Ruiz, J. C. R., Ordoñez, Y. B. M., Basto, Á. M., & Campos, M. R. S. (2015). Antioxidant capacity of leaf extracts from two *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. *Nutricion hospitalaria*, 31(3), 1163-1170.

Serfaty, M., Ibdah, M., Fischer, R., Chaimovitch, D., Saranga, Y., & Dudai, N. (2013). Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. *Industrial crops and products*, 50, 731-736.

Singh, G., Singh, G., Singh, P., Parmar, R., Paul, N., Vashist, R., Swarnkar, M.K., Kumar, A., Singh, S., Singh, A.K., 2017. Molecular dissection of transcriptional reprogramming of steviol glycosides synthesis in leaf tissue during developmental phase transitions in *Stevia rebaudiana* Bert. *Scientific reports* 7, 11835.

Soufi, S., D'Urso, G., Pizza, C., Rezgui, S., Bettaieb, T., & Montoro, P. (2016). Steviol glycosides targeted analysis in leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) from plants cultivated under chilling stress conditions. *Food chemistry*, 190, 572-580.

Stahl, E., Bellwon, P., Huber, S., Schlaeppli, K., Bernsdorff, F., Vallat-Michel, A., . . . Zeier, J. (2016). Regulatory and functional aspects of indolic metabolism in plant systemic acquired resistance. *Molecular plant*, 9(5), 662-681.

Tada, A., Takahashi, K., Ishizuki, K., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., ... & Akiyama, H. (2012). Absolute quantitation of stevioside and rebaudioside A in commercial standards by quantitative NMR. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, c12-00736.

Tahmasi, S., Garoosi, G., Ahmadi, J., & Farjaminezhad, R. (2017). Effect of salicylic acid on stevioside and rebaudioside A production and transcription of biosynthetic genes in in vitro culture of *Stevia rebaudiana*. *Iranian Journal of genetics and plant breeding*, 6(2), 1-8.

Tavarini, S., & Angelini, L. G. (2013). *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(9), 2121-2129.

Vargas-Hernandez, M., Macias-Bobadilla, I., Guevara-Gonzalez, R.G., Romero-Gomez, S.d.J., Rico-Garcia, E., Ocampo-Velazquez, R.V., Alvarez-Arquieta, L.d.L., Torres-Pacheco, I., 2017. Plant hormesis management with biostimulants of biotic origin in agriculture. *Frontiers in plant science* 8, 1762.

Vázquez-Baxcajay, L., Robledo-Paz, A., Muratalla-Lúa, A., & Conde-Martínez, V. (2014). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y detección de steviósidos. *Bioagro*, 26(1), 49-56.

Vázquez-Hernández, M. C., Parola-Contreras, I., Montoya-Gómez, L. M., Torres-Pacheco, I., Schwarz, D., & Guevara-González, R. G. (2019a). Eustressors: Chemical and physical stress factors used to enhance vegetables production. *Scientia Horticulturae*, 250, 223-229.

Vazquez-Hernandez, C., Feregrino-Perez, A. A., Perez-Ramirez, I., Ocampo-Velazquez, R. V., Rico-García, E., Torres-Pacheco, I., & Guevara-Gonzalez, R. G. (2019). Controlled elicitation increases steviol glycosides (SGs) content and gene expression-associated to biosynthesis of SGs in *Stevia rebaudiana* B. cv. Morita II. *Industrial Crops and Products*, 139, 111479.

Vega-Muñoz, I., Feregrino-Pérez, A. A., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (2018). Exogenous fragmented DNA acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) inducing changes in CpG DNA methylation and defence-related responses in *Lactuca sativa*. *Functional Plant Biology*, 45(10), 1065-1072.

Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D., & Ahuja, P. S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(1), 1-27.

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

Zeng, J., Chen, A., Li, D., Yi, B., & Wu, W. (2013). Effects of salt stress on the growth, physiological responses, and glycoside contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(24), 5720-5726.

Zunun-Pérez, A., Guevara-Figueroa, T., Jimenez-Garcia, S., Feregrino-Pérez, A., Gautier, F., & Guevara-González, R. (2017). Effect of foliar application of salicylic acid, hydrogen peroxide and a xyloglucan oligosaccharide on capsiate content and gene expression associated with capsinoids synthesis in *Capsicum annum* L. *Journal of biosciences*, 42(2), 245-250.

OMS, 2015. Recuperado de:

www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugar_intake_information_note_es.pdf

GOB, 2015. Recuperado de:

www.gob.mx/cms/uploads/attachment/data/file/61947/Panorama_Agroalimentario_Az_car_2015.pdf

UNICEF, 2019. Recuperado de: www.unicef.org/mexico/salud-y-nutrición

DOF, 2019. Recuperado de:

http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5343244&fecha=02/05/2014

SAGARPA, 2016. Recuperado de: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/en-mexico-la-stevia-conquista-el...>

IX. ANEXOS

ANEXO 1. PROTOCOLO: EXTRACCIÓN RNA método Trizol PURIFICACIÓN RNA KIT ZYMO RESEARCH DIRECT ZOL RNA MINIPREP

1. Moler 50-100 mg aproximadamente de tejido vegetal en un mortero con nitrógeno líquido y colocar en un tubo Eppendorf de 1.5 ml
2. Añadir 600 μ L de Trizol o Tri Reagent o un reagente similar acido-guanidin-fenol
3. Homogenizar mediante vortex e incubar a Temperatura ambiente por 5 min
4. Agregar 200 μ L de cloroformo y agitar vigorosamente por 15 segundos
5. Incubar a Temperatura ambiente 2-3min.
6. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min a 4°C
7. Transferir la fase incolora a un nuevo tubo Eppendorf
8. Adicionar un volumen igual de etanol 95% (o isopropanol frío)
9. Mezclar por pipeteo y trasferir la mezcla a la columna del Kit Zymo-Spin IIC Column . Colocar dentro de un tubo colector y centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto
10. Descartar el filtrado (Flow-Through)
11. Añadir 400 μ L RNA Wash Buffer del Kit dentro de la columna y centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto
12. En un tubo libre de RNasa (Tubo Eppendorf o tubo para PCR, dependiendo del número de reacciones), preparar la siguiente mezcla 5 μ L de DNasa I, 75 μ L DNA Digestion Buffer y mezcle cuidadosamente por pipeteo (Por cada reacción). Hecha la mezcla adicione directamente a la matriz de la columna.
13. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
14. Adicionar 400 μ L de Direct-zol RNA PreWash a la columna y centrifugue a 13000 rpm por 1 minuto. Descarte el filtrado y repita este paso.
15. Adicionar 700 μ L de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugar por 2 minutos a 13000 rpm para asegurar la completa remoción del buffer de lavado .Transferir cuidadosamente dentro de un tubo libre de RNasa.

16. Para eluir el RNA obtenido, añadir 50 μ L de agua libre de DNasa/RNasa (agua de ampolleta) directamente a la matriz de la columna y centrifugar.
17. Almacenar a -70°C .
18. Se verifica la calidad del RNA extraído. Se corren las muestras en un gel de agarosa desnaturalizante al 1.2%.
19. Este gel se prepara con 25 ml de agua-DEPC estéril + 0.36 g de agarosa.
20. Fundir la agarosa (dejar enfriar a 50°C). Una vez "tibio", agregar 2.5 mL de MOPS 10X y 0.75 ml de formaldehído 37%.
21. Se utiliza como buffer de corrida MOPS 1X y se visualiza en el fotodocumentador.
22. Cuantificar por espectrofotometría para conocer la concentración del RNA obtenido.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ANEXO 2. PROTOCOLO: Síntesis de cDNA

KIT FIRST STRAND cDNA SYNTHESIS

THERMO SCIENTIFIC MAXIMA FIRST STRAND FOR RT-qRTPCR cat. #K1641

1. Añadir a un tubo estéril libre de RNasa (Tubo para PCR) los siguientes reactivos

REACTIVO	CANTIDAD
5X Reaction Mix	4 μ L
Maxima Enzyme Mix	2 μ L
Templado de RNA	500 ng
Agua libre de nucleasas	Cantidad restante para ajustar a 20 μ L
Volumen total de la reacción	20 μ L

2. Mezclar suavemente (La enzima es muy sensible a daño mecánico)
3. Incubar por 10 minutos a 25 °C
4. Mantener a 50°C por 15 minutos
*Para cantidades de RNA mayores a 1 μ g prolongar el tiempo de reacción a 30 min
5. Terminar la reacción calentando por 5 minutos a 85°C
6. Se puede almacenar a -20°C por una semana o a -70°C por 1 año aproximadamente
7. Del paso 3 al paso 5 se realizan en el termociclador el cual tiene grabado el programa de síntesis de cDNA con el nombre **MAXIMA MIX**.

ANEXO 3. PROTOCOLO: PCR PUNTO FINAL

THERMO SCIENTIFIC DREAM TAQ DNA POLYMERASA

1. En un tubo para PCR preparar prepara la siguiente reacción

NOTA: Mantener todos los reactivos y muestras en hielo, así como el tubo de PCR donde se prepara la reacción. La enzima es muy sensible a daño por calor y daño mecánico por lo cual se debe tener extremada precaución en el manejo.

REACTIVO	CANTIDAD
Buffer 10X Dreamtaq	1.25 μ L
dNTPs MIX	0.25 μ L
Oligo F	0.25 μ L
Oligo R	0.25 μ L
Templado DNA o cDNA	0.5 μ L
Dream Taq Polymerasa	0.0625 ml
Agua estéril libre de DNAsa (ampolleta)	9.9375 μ L
Volumen Final de Rxn	12.5 μ L

2. A continuación se coloca en el termociclador a la temperatura de alineación de los Oligos siguiendo la siguiente rampa

	TEMPERATURA °C	TIEMPO	NUMERO DE CICLOS
Desnaturalización inicial	95	1-3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	25-40
Alineación	Tm-5	30 s	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5-15 min	1
Mantenimiento de la Rxn	4	∞	

NOTA: Las condiciones pueden variar de acuerdo a los Oligos y a la muestra.

3. Terminada la Reacción se corren las muestras en un gel de agarosa al 1.2% utilizando como buffer de corrida TAE 1X y se visualiza en el fotodocumentador

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ANEXO 4. PROTOCOLO: PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA 1.2% PARA DNA/cDNA

1. Pesar 300 mg de agarosa y colocar en un matraz Erlenmeyer de 250 ml
2. Agregar 25 ml de TAE 1X
3. Disolver calentando el matraz en el horno de microondas en 3-4 ciclos de 30 segundos cada uno
4. Vaciar en el peine previamente colocado en la base nivelada y dejar a temperatura ambiente hasta que se enfríe el gel
5. Colocar el gel en la cámara de electroforesis y agregar Buffer de corrida (TAE 1X) hasta la línea máxima de llenado
6. En un papel parafilm colocar 2 μ L de gelred + 2 μ L de buffer de carga+ 5 μ L de muestra
7. Mezclar por pipeteo con micropipeta
8. Cargar la mezcla en cada pozo según el número de muestras
9. Colocar la tapa y la fuente de poder
10. Condiciones de corrida: 75V, 60 minutos
11. Encender la fuente de poder
12. Terminado el tiempo de corrida apagar la fuente de poder
13. Sacar de la cámara de electroforesis el gel con la base y quitar el exceso de buffer colocando el gel en vertical sobre una sanita o toalla absorbente
14. Visualizar en el fotodocumentador

ANEXO 5. PROTOCOLO: Análisis de la expresión genética relativa por qRTPCR

Termociclador: C100 Touch Thermal Cycler Marca BIORAD CFX96 Real Time System

1. Antes de comenzar a realizar el procedimiento es recomendable haber realizado PCR punto final de los oligos y las muestras que se requieren cuantificar por qRTPCR, además del gradiente de temperatura de los oligonucleótidos de los genes de interés para conocer las condiciones adecuadas de amplificación (Temperatura y número de ciclos). Debido a que los artículos publicados de donde tomamos las secuencias y se mandan hacer los oligonucleótidos en muchas ocasiones tienen diferencia en la temperatura de amplificación y los ciclos, esto por la diferencia en los equipos u otras situaciones.
2. Para lograr una cuantificación con el menor error estadístico posible, se realiza primeramente la preparación de los oligos de trabajo en soluciones a una concentración de $10\mu\text{M}$ y la cuantificación de los cDNA ($100\text{ ng}/\mu\text{L}$) de las muestras de los tratamientos a analizar (preferentemente solo tratamientos contrastantes, debido a que el número de reacciones se multiplica exponencialmente), es recomendable antes de comenzar el análisis evaluar correctamente el número de reacciones a analizar.
3. Por cada gen se utilizarán 9 reacciones con un tratamiento Control (preferentemente una muestra que sabemos que va a amplificar), esto para conocer la relación de oligonucleótidos (F-R) que nos da una mejor amplificación y la menor formación de dímeros.
4. Las reacciones para cada gen se preparan en mezclas de la siguiente forma

GEN 1

Matrices de concentración Oligos (volumen de reacción 10 μ L)

	M1 150/150	M2 300/150	M3 900/150	M4 150/300	M5 300/300	M6 900/300	M7 150/900	M8 300/900	M9 900/900
SYBER mix (μ L)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Oligo F (μ L)	0.15	0.3	0.9	0.15	0.3	0.9	0.15	0.3	0.9
Oligo R (μ L)	0.15	0.15	0.15	0.3	0.3	0.3	0.9	0.9	0.9
cDNA (100ng/ μ L)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
H ₂ O (μ L)	2.7	2.55	1.95	2.55	2.4	1.8	1.95	1.8	1.2

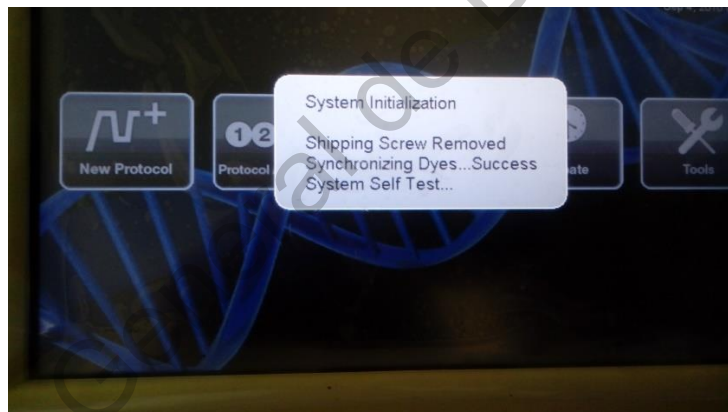
5. Las muestras de cada mezcla, se cargan en las placas por duplicado con su respectivo blanco también por duplicado por cada gen como se muestra a continuación:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M1B1	M1B2	M1.1	M1.2	M2B1	M2B2	M2.1	M2.2	M3B1	M3B2	M3.1	M3.2
B	M4B1	M4B2	M4.1	M4.2	M5B1	M5B2	M5.1	M5.2	M6B1	M6B2	M6.1	M6.2
C	M7B1	M7B2	M7.1	M7.2	M8B1	M8B2	M8.1	M8.2	M9B1	M9B2	M9.1	M9.2
D												
E												
F												
G												
H												

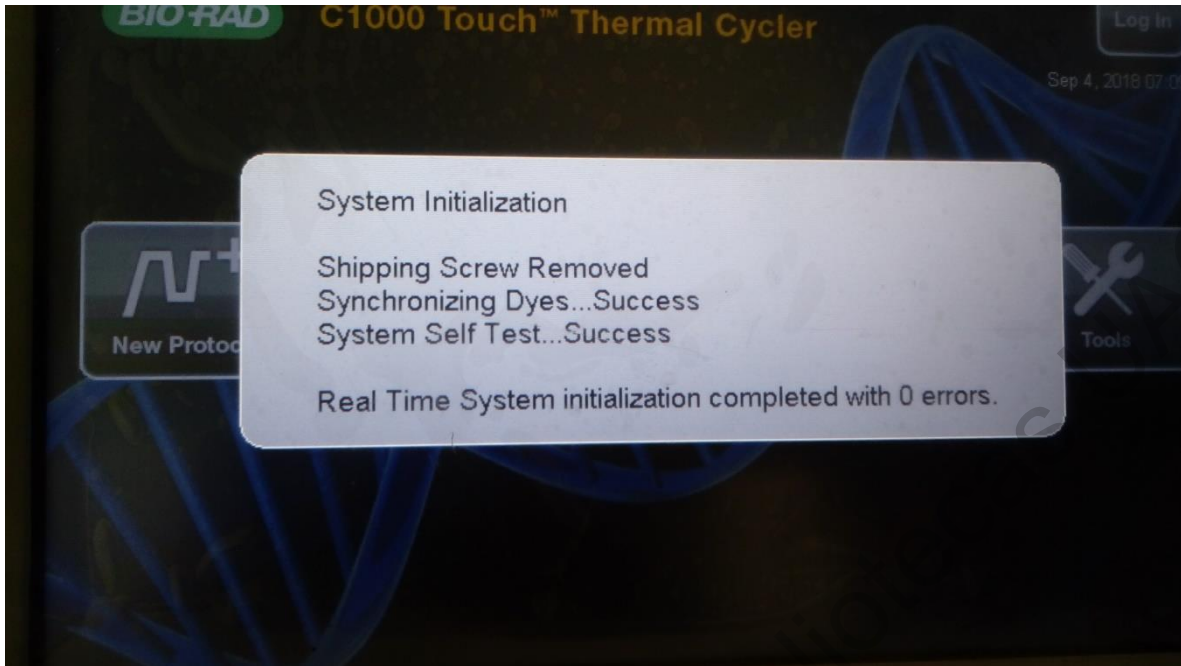
} Gen 1

6. Se pueden realizar mezclas de oligos en tubos para PCR dependiendo de la cantidad de matrices a realizar y se hacen por cuatriplicado (duplicado de blancos y duplicado de muestras)
7. Las condiciones de amplificación de los genes son particulares de cada uno al igual que el número de ciclos y el programa de amplificación y cuantificación se diseña con base en estos datos.

8. Se cargan las reacciones en las placas de reacción para el lector de qRT-PCR de acuerdo al siguiente diseño. M1B1 (Mezcla 1 Blanco 1), M1B2 (Mezcla 1 Blanco 2), M1.1 (Mezcla 1 Muestra 1), M1.2 (Mezcla 1 Muestra 2)
9. El fluoróforo (Sybergreen Mix) es altamente reactivo y fotosensible por lo cual se recomienda que sea el último en agregarse a la reacción, se evite su manipuleo mecánico y se trabaje en la mayor oscuridad posible. Después de colocadas las reacciones en la placa esta se debe cubrir con papel aluminio y llevar al termociclador para tiempo real para proceder a llevar a cabo el programa.
10. El termociclador para tiempo real se mantiene desconectado por la variación en los picos de electricidad en el campus por lo cual se debe conectar cuando se va a usar, en la parte posterior tiene el botón de encendido y al momento de prenderlo aparecerá las siguientes instrucciones en pantalla touch

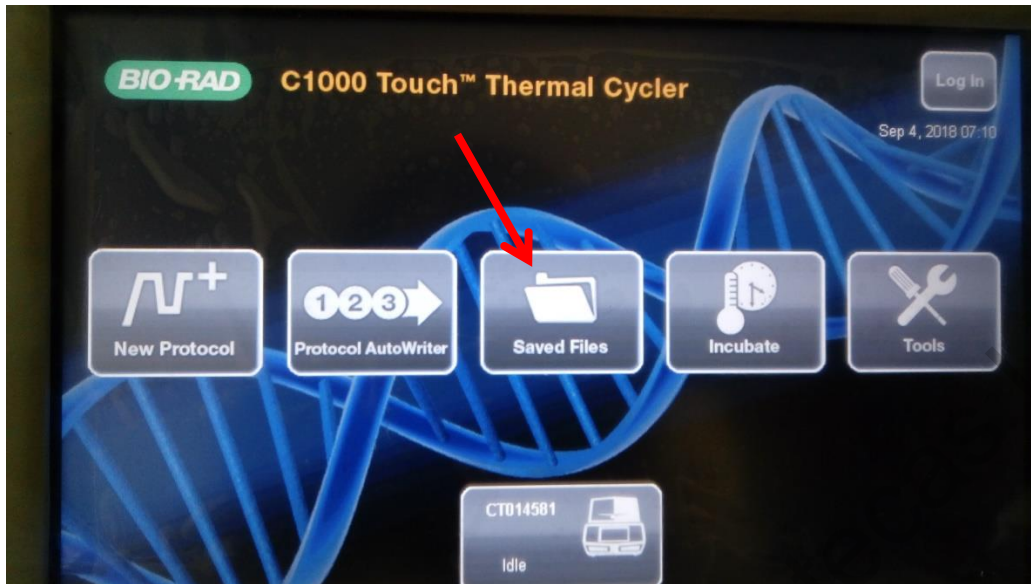


Estas instrucciones las realiza automáticamente el equipo para seguridad del sistema y para calibración del mismo. No mover ni abrir la tapa. Al término de la instrucción deberá aparecer en pantalla lo siguiente:

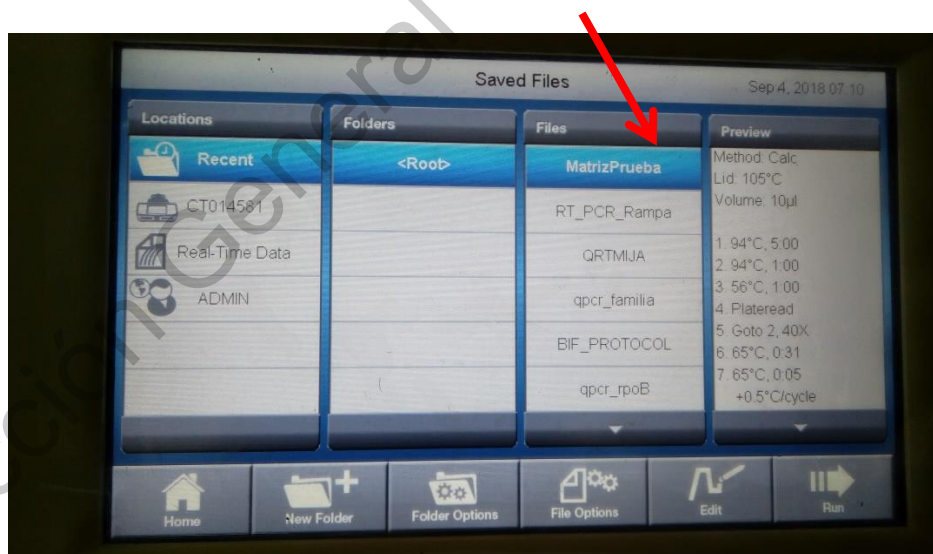


En este momento podemos abrir la tapa del Lector de qPCR solo presionando el botón gris del frente que se encuentra ubicado por encima de la pantalla touch. NO FORZAR el botón de apertura y cierre del equipo, esto es muy importante ni para abrir ni para cerrar solo se presiona una vez, se coloca la placa la cual calza perfectamente en el lector ubicando la celda A1 en la parte superior izquierda.

NOTA: Se debe cerrar cuidadosamente el equipo presionando nuevamente el botón de apertura y cierre, NO FORZAR la tapa cae automáticamente. En la pantalla si ya se tiene guardado el programa se puede editar y modificar o se puede crear uno nuevo.

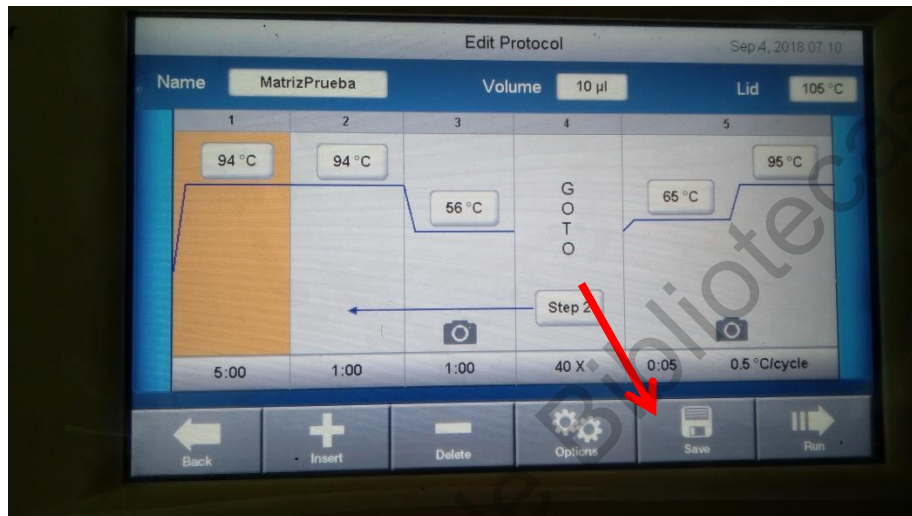


En la carpeta <Root> se encuentra el archivo MatrizPrueba este programa es para cuantificar los qRTPCR de acuerdo a la temperatura y condiciones de los oligos y muestras de Ma. Cristina Vázquez Hernández, se puede editar y guardar con las condiciones de cada muestra a analizar.



Se edita tocando la pantalla en la sección que se quiera modificar y al final se le da un toque en el icono Save. Revisamos que los datos estén correctos y presionamos RUN. El tiempo del programa dependerá del número de ciclos que establezcamos y las condiciones de los oligos utilizados. Cabe mencionar que podemos modificar

la temperatura de cada línea horizontal de la placa es decir con este equipo se puede realizar fácilmente gradientes de temperaturas o adecuar la temperatura de amplificación de cada oligonucleótido siempre y cuando modifiquemos por línea horizontal.



11. Al terminar el programa el equipo se detendrá automáticamente y aparecerá en la pantalla en lugar del icono SAVE el icono EXPORT, a un lado de la pantalla se encuentra una entrada USB en la cual colocamos una memoria USB de preferencia nueva o de la cual estemos seguros no tenga virus, se deja al menos 10 segundos para que el equipo reconozca la memoria y se presiona el icono EXPORT. El equipo genera un archivo en diferentes extensiones ej. Excel 2003 y Excel 2007 con los datos de la placa y la cuantificación de cada reacción los cuales se analizan utilizando la metodología descrita por Livak & Schmittgen en 2001.