



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Bacterias endófitas promueven la biosíntesis de glucósidos de
esteviol, compuestos fenólicos y flavonoides en *Stevia*
rebaudiana Bertoni**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

PRESENTA:

Dumas Gabriel Oviedo Pereira

DIRECTOR:

Dr. Mario Rodríguez Monroy



Yautepec de Zaragoza, Morelos, Julio 2022



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-13
REP 2017

*ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS*

Ciudad de México de del

El Colegio de Profesores de Posgrado de en su Sesión
(Unidad Académica)

No. celebrada el día del mes de conoció la solicitud presentada por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Oviedo	Apellido Materno:	Pereira	Nombre (s):	Dumas Gabriel
-------------------	--------	-------------------	---------	-------------	---------------

Número de registro:

del Programa Académico de Posgrado:

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Objetivo general del trabajo de tesis:

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director: 2° Director:

No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director de Tesis

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Aspirante

Dumas Gabriel Oviedo Pereira

Presidente del Colegio

Dra. Gabriela Trejo Tapia



SEP IPN
CENTRO DE DESARROLLO
DE PRODUCTOS BIOTICOS
YAUTEPEC MOR



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14
REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec siendo las 9:00 horas del día 13 del mes Junio del 2022 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos para examinar la tesis titulada:

Bacterias endófitas promueven la biosíntesis de glucósidos de esteviol, compuestos fenólicos y flavonoides en *Stevia rebaudiana* Bertoni

el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Oviedo	Apellido Materno:	Pereira	Nombre (s):	Dumas Gabriel
-------------------	--------	-------------------	---------	-------------	---------------

Número de registro: A 1 8 0 1 2 2

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: Doctorado en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 11 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después de esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo SI NO **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: La similitud se encuentra en párrafos que fueron referenciados a las citas de trabajos publicados.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

El trabajo revisado cumple con las características de originalidad y rigor científico de una tesis de Doctorado.

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Director de Tesis
Nombre completo y firma

Dra. Silvia Evangelista Lozano

Nombre completo y firma

Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez

Nombre completo y firma

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala

Nombre completo y firma

Dra. Melina López Meyer

Nombre completo y firma

Dra. Gabriela Trejo Tapia

Nombre completo y firma
SEP IPN
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS
YAUTEPEC MOR



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA PARA DIFUSIÓN

En la Ciudad de México el día 30 del mes de Junio del año 2022, el (la) que suscribe **Dumas Gabriel Oviedo Pereira** alumno(a) del programa **Doctorado en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos** con número de registro **A180222**, adscrito(a) al **Centro de Desarrollo de Productos Bióticos** manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de **Dr. Mario Rodríguez Monroy** y cede los derechos del trabajo intitulado **Bacterias endófitas promueven la biosíntesis de glucósidos de esteviol, compuestos fenólicos y flavonoides en *Stevia rebaudiana* Bertoni**, al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expresado del autor y/o director(es). Este puede ser obtenido escribiendo a las siguiente(s) dirección(es) de correo. **_doviedop1500@alumno.ipn.mx_**. Si el permiso se otorga, al usuario deberá dar agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.

Dumas Oviedo Pereira

Dumas Gabriel Oviedo Pereira

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Mario Rodríguez Monroy. Para la realización de los estudios se contó con el apoyo económico de la beca CONACyT (702975), la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores y Beca tesis. Esta investigación conto con el financiamiento económico del proyecto de la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN (20180427, 20195064, 20200699, 20210733, 202200672).

DEDICATORIA

A mi familia, A la vida

A mis padres, Margarita Pereira, Martha Oviedo y Gabriel Oviedo, por cada palabra de aliento y apoyo para emprender el viaje de mi vida, por inculcarme que los sueños se luchan y se cumplen, por su amor incondicional.

A mis herman@s y sobrín@s, que se han convertido en mi motivación para seguir adelante, especialmente a mi primohermano José F, por siempre ser parte de la aventura, por el amor infinito.

A mi abuela Neila Rosa (QEPD), porque en mi camino siempre has estado tu. A mi abuelo José Francisco, Pachito, por cada motivación, por enseñarnos a insistir, resistir, y nunca desistir.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las becas otorgadas para realizar mis estudios de Doctorado.

Especial agradecimiento al Dr. Mario Rodríguez Monroy por estos ocho años de aprendizajes durante mi formación académica y personal. Por el apoyo incondicional para siempre mejorar, impulsarme a seguir adelante y dar lo mejor de mi parte. Gracias infinitas por las oportunidades y consejos para lograr mis objetivos profesionales y personales.

A la Dra. Gabriela Sepúlveda, Dra. Silvia Evangelista, Dra. Alma Leticia y Dra. Melina López, por cada valiosos comentario y conocimiento brindado para mejorar el trabajo de tesis, así como la disposición para resolver dudas en el área experimental.

Quiero agradecerle a la Dra. Alma Angélica y a Ian, por estos años de amistad, por las charlas tendidas y la confianza de permitirme sentirme como en familia, y estar incondicionalmente.

A la Maestra Sandra, años de colaboración, de consejos, y de mucho cariño desinteresado, agradezco a su familia por tan fraternal recibimiento desde mi llegada a México.

A Adán por su amistad sincera, por los partidos de futbol, y por siempre estar para los que necesitaba; y también a su familia tan especial, gracias por acogerme como parte de la familia, por los viajes y aventuras por todo México, por la gran amistad y cariño incondicional.

A mis roomies y amigos, Diego y Caro,

Diego, el papo, gracias por la amistad tan especial, por todos estos años compartiendo juntos toda esta gran experiencia, por todos los consejos, las ayudas en el laboratorio, por siempre estar a disposición, y por esas buenas fiestas.

Caro de mi corazón, te agradezco aguantarme todos estos años, por ser tan especial, estar al pendiente, cuidarme en la salud y la enfermedad, por cada aventura, por ser un apoyo siempre para mí, por escucharme cuando lo necesité, por regañarme cuando era necesario, por ser parte de mi vida, gracias.

Quiero agradecerle a alguien muy especial en mi vida, Luisa F, cabecita, tu amor incondicional hacia a mi ha sido de gran valor, tu apoyo, tus consejos, y tu preocupación para que todo este bien, gracias por estos años compartidos, por las aventuras, risas, abrazos con mucho amor, por estar en los momentos más difíciles y los más felices, gracias por hacer mi existencia más brillante.

Gracias a todas y cada una de las personas y amigos de CeProBi que hicieron mi experiencia en México como única y especial, por la disposición para ayudar, por la amabilidad y siempre tener una buena energía, gratitud por todos.

ÍNDICE

ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE CUADROS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Características morfológicas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	3
2.2 Composición química de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	4
2.3 Biosíntesis de los glucósidos de esteviol.....	5
2.4 Tricomas: estructuras epidérmicas en tejidos vegetales	9
2.4.1 Tricomas no glandulares.....	10
2.4.2 Tricomas glandulares.....	11
2.5 Microorganismos promotores de crecimiento vegetal	12
2.5.1 Mecanismos de promoción de crecimiento	12
2.5.1.2 Disponibilidad de Nitrógeno	13
2.5. 1.3 Disponibilidad de Fósforo.....	14
2.5.2 Bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal	16
2.5.3 Endófitos en plantas de interés comercial.....	18
2.5.4 Colonización de bacterias endófitas en el tejido vegetal.....	24
III. JUSTIFICACIÓN.....	25
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 Diagrama general de trabajo.....	28

5.2 Cultivo y manejo de las plantas de <i>S. rebaudiana</i>	29
5.3 Origen de los aislados bacterianos	29
5.4 Preparación del inóculo de las bacterias en matraces Erlenmeyer	31
5.5 Inoculación con bacterias endófitas de las plantas de <i>S. rebaudiana</i> en condiciones de vivero	31
5.6 Evaluación del contenido de GE mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC).....	33
5.6.1 Preparación de las muestras y obtención de extracto metanólico para la determinación de GEs.....	33
5.6.2 Cuantificación del contenido de GE en hojas de <i>S. rebaudiana</i>	33
5.7 Determinación del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en hojas de <i>S. rebaudiana</i> mediante espectrofotometría.	35
5.7.1 Obtención del extracto etanólico	35
5.7.2 Determinación de compuestos fenólicos totales.....	36
5.7.3 Determinación del contenido de flavonoides	37
5.8 Análisis de tricomas por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) y microscopía de barrido láser confocal.....	38
5.9 Perfil de expresión de genes en plántulas de <i>Stevia rebaudiana</i> inoculadas con bacterias endófitas	39
6. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos	41
6.1 Determinación de la actividad fotosintética.....	41
6.2 Análisis estadístico	42
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
7.1 Efecto de bacterias endófitas aisladas de <i>S. rebaudiana</i> sobre parámetros de crecimiento en plantas de <i>S. rebaudiana</i>	43
7.2 Efecto de bacterias endófitas aisladas de <i>S. rebaudiana</i> sobre sobre la acumulación glucósidos de esteviol en plantas de <i>S. rebaudiana</i>	45
7.3 Efecto de bacterias endófitas aisladas de <i>S. rebaudiana</i> sobre la acumulación de compuesto fenólicos y flavonoides en plantas de <i>S. rebaudiana</i>	48

7.4. Efecto de la inoculación de <i>E. hormachei</i> H2A3, <i>E. hormachei</i> H5A2 y <i>E. xiangfangensis</i> R7A2 sobre la densidad de tricomas en hojas de <i>S. rebaudiana</i>	50
7.5 Efecto de la inoculación de bacterias endófitas sobre la expresión diferencial de genes biosintéticos de GE en plantas de <i>S. rebaudiana</i>	61
7.6 Efecto de la inoculación de bacterias endófitas sobre la acumulación de pigmentos fotosintéticos en hojas de <i>S. rebaudiana</i>	64
7.7 Efecto de la inoculación de bacterias endófitas sobre la actividad fotosintética en hojas de <i>S. rebaudiana</i>	66
VIII. CONCLUSIONES	69
IX. BIBLIOGRAFÍA	71
X. ANEXOS	86
Anexo 1. Correlación de Pearson entre las variables densidad de tricomas y concentración de GEs, compuestos fenólicos y flavonoides.....	86
Anexo 2. Carátula del artículo científico publicado en la revista PeerJ.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Página
Figura 1: Estructura química de los principales glucósidos de esteviól presentes en <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. Glc-Glucosa; Ram-Ramnosa; Xil-Xilosa. Tomado de Oviedo Pereira et al. (2015)	6
Figura 2. Ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol en <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. CPS-copalil difosfato sintasa; KS-kaureno sintasa; KO-kaureno oxidasa; KAH-ácido kaurenoico oxidasa; UGTs-glucosiltransferasas. Tomado de Humphrey et al. (2006).....	7
Figura 3. Estructuras epidérmicas de <i>S. rebaudiana</i> tomadas mediante microscopia electrónica de barrido. Tricomas glandulares y no glandulares (A); magnificación de tricomas glandulares (G) y tricomas no glandulares largos y cortos (L y C).	10
Figura 4. Concentración de glucósidos de esteviol en plantas de <i>S. rebaudiana</i> inoculadas con bacterias endófitas. Glucósidos de esteviol total (A), Rebaudiósido A (B), Esteviósido (C). Las barras representan la media \pm DS de cuatro réplicas biológicas. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$).	46
Figura 5. Concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en plantas de <i>S. rebaudiana</i> inoculadas con bacterias endófitas. Las barras representan la media \pm DS de cuatro réplicas biológicas. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$).	50
Figura 7. Densidad de tricomas en hojas de <i>S. rebaudiana</i> inoculadas con bacterias endófitas. Densidad de tricomas glandulares (a), tricomas largos (b) y tricomas cortos (c). Las barras representan la media \pm DS de cuatro réplicas biológicas. Letras diferentes indica diferencia significativa ($P < 0.05$	54
Figura 8. Análisis de expresión del gen <i>TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)</i> en hojas de <i>S. rebaudiana</i> inoculadas con bacterias endófitas. Acumulación de transcrito de <i>TTG1</i> (A) e Intensidad relativa de la acumulación del transcrito <i>TTG1</i> (B) en hojas de <i>S. rebaudiana</i> inoculadas con <i>E. hormaechei</i> H2A3, <i>E. hormaechei</i> H5A2 y <i>E. xiangfangensis</i> . <i>GADPH</i> se utilizó como gen control interno. Las barras representan la media \pm DS de tres réplicas a 30 días postinoculación. Letras diferentes indica diferencia significativa ($P < 0.05$).	57

Figura 9. Localización de glucósidos de esteviol, compuestos fenólicos y flavonoides en tricomas de *S. rebaudiana*. Autofluorescencia de clorofila (canal rojo) Panel a-d. Autofluorescencia de los metabolitos secundarios (canal azul). Panel e-h. Colocalización de clorofila y autofluorescencia de los metabolitos secundarios, Panel i - l; Los paneles m-p corresponden a una ampliación de tricomas en plantas no inoculadas e inoculadas con *E. hormaechei* H2A3, *E. hormaechei* H5A2 y *E. xiangfangensis* R7A2, respectivamente. G, tricoma glandular; L, tricoma largo; y C, tricoma corto. 61

Figura 10. Análisis de expresión relativa de genes clave en la vía de biosíntesis de glucósidos de esteviol en hojas de *S. rebaudiana* inoculadas con bacterias endófitas. *KO* (a), *KAH* (b), *UGT74G1* (c), *UGT76G1* (d). *GAPDH* se utilizó como gen de referencia. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas recolectadas 30 días después de la inoculación. *Letras diferentes indica una diferencia significativa ($P < 0.05$)..... 62

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Bacterias endófitas aisladas de diferentes plantas hospederas y su actividad biológica	21
Cuadro 2. Bacterias endófitas aisladas de plantas de <i>S. rebaudiana</i>	30
Cuadro 3. Volumen y concentración de estándares para generar la curva patrón en la cuantificación de GEs.	34
Cuadro 4. Lista de genes específicos para el análisis mediante qRT-PCR	40
Cuadro 5. Efecto de la inoculación de bacterias endófitas sobre el crecimiento vegetal en plantas de <i>S. rebaudiana</i>	44

RESUMEN

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni es una planta de interés económico en la industria alimentaria y farmacéutica por sus glucósidos de esteviol (GEs), compuestos 300 veces más dulces que la sacarosa. Además, contienen compuestos fenólicos y flavonoides con actividad antioxidante. Las bacterias endófitas promueven el crecimiento y desarrollo y modulan el metabolismo de la planta huésped. En este estudio se evaluó el papel de las bacterias endófitas sobre el crecimiento; síntesis de GEs, concentración de compuestos fenólicos y flavonoides; y la densidad de tricomas y fotosíntesis. Las 12 bacterias probadas no incrementaron el crecimiento de las plantas de *S. rebaudiana*; sin embargo, el contenido de GEs aumentó con la inoculación de las bacterias *Enterobacter hormaechei* H2A3 y *E. hormaechei* H5A2. La concentración de SG en las hojas fue paralelo a un aumento en la densidad de tricomas glandulares, cortos y grandes. El análisis de imágenes de hojas de *S. rebaudiana* mostró una fuerte autofluorescencia (canal azul, 440 nm) en tricomas glandulares y cortos, lo que indica la presencia de GEs, compuestos fenólicos y flavonoides. No se evidenció un efecto sobre las clorofilas, carotenoides y actividad fotosintética. El aumento en los niveles de transcripción de los genes *KO*, *KAH*, *UGT74G1* y *UGT76G1* estuvo relacionado con la concentración de SG en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con *E. hormaechei* H2A3 y *E. hormaechei* H5A2. Estos resultados representan una estrategia biotecnológica para el uso de *E. hormaechei* H2A3 y *E. hormaechei* H5A2 como estimuladoras de la concentración de metabolitos secundarios en *S. rebaudiana*

ABSTRACT

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni is a plant of economic interest in the food and pharmaceutical industry for its steviol glycosides (SG), compounds 300 times sweeter than sucrose. In addition, they contain phenolic compounds and flavonoids with antioxidant activity. Endophytic bacteria promote growth and development and modulate the metabolism of the host plant. In this study, the role of endophytic bacteria on growth was evaluated; synthesis of SGs, concentration of phenolic compounds and flavonoids; and the density of trichomes and photosynthesis. The 12 bacteria tested did not increase growth of *S. rebaudiana* plants; however, the SG content increased with the inoculation of *Enterobacter hormaechei* H2A3 and *E. hormaechei* H5A2 bacteria. The SG concentration in the leaves was paralleled by an increase in the density of short and large glandular trichomes. Image analysis of *S. rebaudiana* leaves showed strong autofluorescence (blue channel, 440 nm) in glandular and short trichomes, indicating the presence of SGs, phenolic compounds, and flavonoids. There was no evidence of an effect on chlorophylls, carotenoids and photosynthetic activity. The increase in the transcription levels of the *KO*, *KAH*, *UGT74G1* and *UGT76G1* genes was related to the concentration of SGs in *S. rebaudiana* plants inoculated with *E. hormaechei* H2A3 and *E. hormaechei* H5A2. These results represent a biotechnological strategy for the use of *E. hormaechei* H2A3 and *E. hormaechei* H5A2 as stimulators of the concentration of secondary metabolites in *S. rebaudiana*.

I. INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta con importancia en la industria farmacéutica y alimentaria por la acumulación de glucósidos de esteviol (GEs), compuestos con un poder endulzante de 100 a 400 veces mayor al de la sacarosa. Los GEs se acumulan en las hojas, el esteviósido de 5-10% y el rebaudiósido A de 2-4% (Lemus-Mondaca et al., 2012). Además, existen reportes de que *S. rebaudiana* presenta propiedades antioxidantes, que son atribuidas a compuestos fenólicos (CF) y flavonoides (FL) (Pande & Gupta, 2013).

El cultivo de *S. rebaudiana* tiene importancia en México, principalmente por la adaptación de la planta a las diversas condiciones ambientales, convirtiéndose en un cultivo promisorio para distintas regiones, como es el caso de Veracruz, Chiapas y Yucatán (Oviedo-Pereira et al., 2015). El empleo de microorganismos benéficos es una alternativa biotecnológica para el mejoramiento de cultivos mediante la asociación con las plantas y el aprovechamiento de los nutrientes del suelo (Compant et al., 2005; Kandel et al., 2017). Dentro de estos microorganismos se encuentran las bacterias endófitas, las cuales viven dentro del tejido vegetal y en interacción simbiótica del tipo mutualista con la planta hospedera (Afzal et al., 2019). Las bacterias proveen a las plantas de los reguladores de crecimiento vegetal, auxinas y giberelinas; ayudan a la solubilización del fósforo; presentan actividad antimicrobiana frente a algunos fitopatógenos; y estimulan el metabolismo secundario las plantas (Brader et al., 2014; Hardoim et al., 2008). Por su parte, las plantas proveen a las bacterias de un nicho y de compuesto orgánicos necesarios

para su crecimiento (Santoyo et al., 2016). En *S. rebaudiana* existen reportes donde inoculan bacterias rizosféricas que mejoran el crecimiento de las plantas y el contenido de GEs, CF y FL (Kilam et al., 2015; Vafadar et al., 2014). Sin embargo, considerando las ventajas que tiene el uso de bacterias endófitas por su asociación simbiótica con la planta, es deseable realizar estudios para tratar de identificar bacterias de este tipo para el crecimiento y la biosíntesis de metabolitos secundarios de *S. rebaudiana*.

Al respecto, Montes-Salazar (2018) reportó el aislamiento e identificación de 12 bacterias endófitas de diferentes tejidos de plantas *S. rebaudiana*. Se evidenció que estas bacterias tienen la capacidad *in vitro* de producir ácido indol acético (AIA), solubilizar fósforo, producir sideróforos y al menos con una cepa se comprobó la estimulación en el desarrollo radicular en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Dada la importancia agronómica del cultivo de *S. rebaudiana* y el interés por el estudio de la interacción con microorganismos, en el presente estudio se evaluó su efecto sobre el crecimiento vegetal, la fotosíntesis, y la acumulación de GEs, CF y F. Además, sobre la densidad de tricomas en hojas de *S. rebaudiana*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Características morfológicas de *Stevia rebaudiana* Bertoni

La planta *S. rebaudiana* Bertoni pertenece a la familia de las Astereaceae, es originaria del noreste de Paraguay y fue descrita por primera vez en 1887 por el botánico suizo Moisés Santiago Bertoni, detallando su sabor dulce (Lewis et al.,1992).

S. rebaudiana es un arbusto ramificado que presenta una raíz fibrosa, filiforme, perenne y no profundiza, que se distribuye cerca de la superficie (Cruz-Martínez, 2015). El tallo es anual, subleñoso y pubescente; durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, se torne multicaule después del primer ciclo vegetativo, llega a producir hasta 20 tallos en tres a cuatro años y alcanzar hasta 90 centímetros de altura. Posee hojas sésiles (carece de peciolo), ovoidales, de nervadura reticulada (los nervios principales se ramifican en una multitud de nervículos), aserradas sobre todo en su extremo final, que adquieren una textura resinosa al secarse. Presenta pequeñas flores hermafroditas blanquecinas de corona tubular que conforman inflorescencias tipo capítulo y una raíz fibrosa que abarca una cuarta parte del tamaño total de la planta (Monteiro,1980; Shock,1982).

Las regiones de origen de *S. rebaudiana*, presentan climas de tipo tropical a subtropical, caracterizados por lluvias que van desde los 1400 a 1800 mm anuales, temperaturas entre 15-30 °C, y humedad relativa entre 75 a 85% (Melillo, 2000). *S. rebaudiana* presenta su crecimiento óptimo a una temperatura entre los 20 a 26° C, El fotoperiodo crítico para el desarrollo de la planta es de 13 horas, y se reporta que

los fotoperiodos largos (16/8 horas luz/oscuridad) favorecen el desarrollo y crecimiento de los entrenudos, el área foliar, el peso seco y la aparición de hojas nuevas. Además, esta especie aprovecha la materia orgánica presente en el suelo y es capaz de adaptarse a intervalo de pH de 6.5 – 7.5 (Ramirez Jaramillo et al., 2011; Ceunen & Geuns, 2013).

2.2 Composición química de *Stevia rebaudiana* Bertoni

En las hojas de *S. rebaudiana* existe una mezcla compleja de metabolitos secundarios como diterpenos, triterpenos, taninos, estigmasterol, aceites volátiles, los cuales están relacionados con la defensa de la planta frente a las condiciones ambientales; además contiene glucósidos de esteviol (GEs), compuestos del grupo de los diterpenos, responsables del sabor dulce característico y se encuentran en mayor cantidad en las hojas, con un poder edulcorante de 100 a 400 veces mayor a la de la sacarosa, además no son tóxicos, ni mutagénicos y no aportan calorías (Duran et al., 2012; Kim et al., 2011; Kaushik et al., 2010; Tadhani & Subhash, 2006).

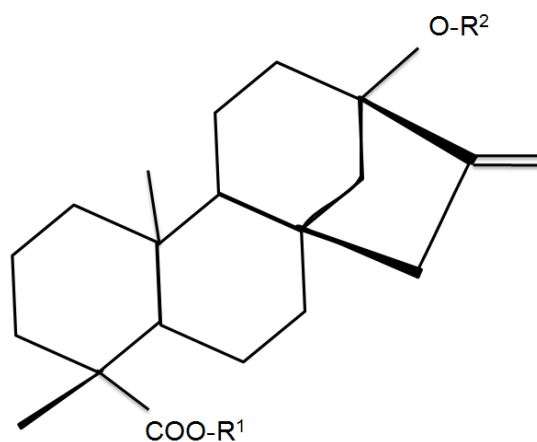
Los compuestos más abundantes y dulces son el esteviósido y el rebaudiósido A y su contenido es de 5-10 % de esteviósido y 2-4% de rebaudiosido A del peso seco de las hojas. Pero las hojas también contienen otros GEs de manera minoritaria como los rebaudiósidos C, D, E y F y el dulcósido A (Figura 1), los cuales representan entre un 1-2 % del peso seco de las hojas (Pande & Gupta, 2013). *S. rebaudiana* además de tener los edulcorantes, posee otros compuestos como; vitamina A, B2, B6, caroteno, aminoácidos, carbohidratos, enzimas, ácidos

orgánicos, polisacáridos, hormonas vegetales y microelementos (Jarma-Orozco et al., 2010; Pande & Gupta, 2013).

Las hojas de *S. rebaudiana* también contienen compuestos fenólicos y flavonoides; tales como ácidos hidroxicinámicos como el ácido clorogénico y ácido caféico (Barroso et al., 2018). Estos compuestos le confieren una capacidad antioxidante, además, son de origen natural, son inocuos, no tóxicos y genera interés a la industria para su empleo como aditivos en la formulación de alimentos (Goyal & Goyal, 2010).

2.3 Biosíntesis de los glucósidos de esteviol

Kumar et al. (2012) describe que la biosíntesis de los GEs se lleva a cabo en diferentes compartimentos dentro de la célula y se realiza como parte de la ruta de biosíntesis del ácido giberélico, a partir de mevalonato kaurenico (Figura 2). En *S. rebaudiana*, el kaureno es precursor del ácido giberélico, el cual es convertido a esteviol en el retículo endoplasmático. Como en el caso de todos los diterpenos, el ácido giberélico y el esteviol son sintetizado a partir del precursor geranil geranil difosfato, el cual se forma por la vía de la desoxi-D-xilulosa 5-fosfato. Dentro de las enzimas que participan en el proceso encontramos a dos diferentes terpenos ciclasas: la copalil difosfato sintasa (CPS) y la kaureno sintasa (KS) que como resultado de su actividad forman kaureno es oxidado por la enzima kaureno oxidasa (KO) en una reacción de tres pasos para dar formación al ácido kaurenico (Figura 2).



Nombre	R ¹	R ²
Steviosido	Gluβ1-	Gluβ1-2 Gluβ1-
rebaudiosido A	Gluβ1-	Gluβ1-2(Gluβ1-3)Gluβ1-
rebaudiosido C	Gluβ1-	Ramα1-2(Gluβ1-3)Gluβ1-
rebaudiosido D	Gluβ1-2	Gluβ1-2(Gluβ1-3)Gluβ1- Gluβ1-
rebaudiosido E	Gluβ1-2	Gluβ1-2 Gluβ1- Gluβ1-
rebaudiosido F	Gluβ1-	Xilβ1-2(Gluβ1-3)Gluβ1-
dulcósido A	Gluβ1-	Ramα1-2Gluβ1-

Figura 1: Estructura química de los principales glucósidos de esteviól presentes en *Stevia rebaudiana* Bertoni. Glc-Glucosa; Ram-Ramnosa; Xil-Xilosa. Tomado de Oviedo Pereira et al. (2015)

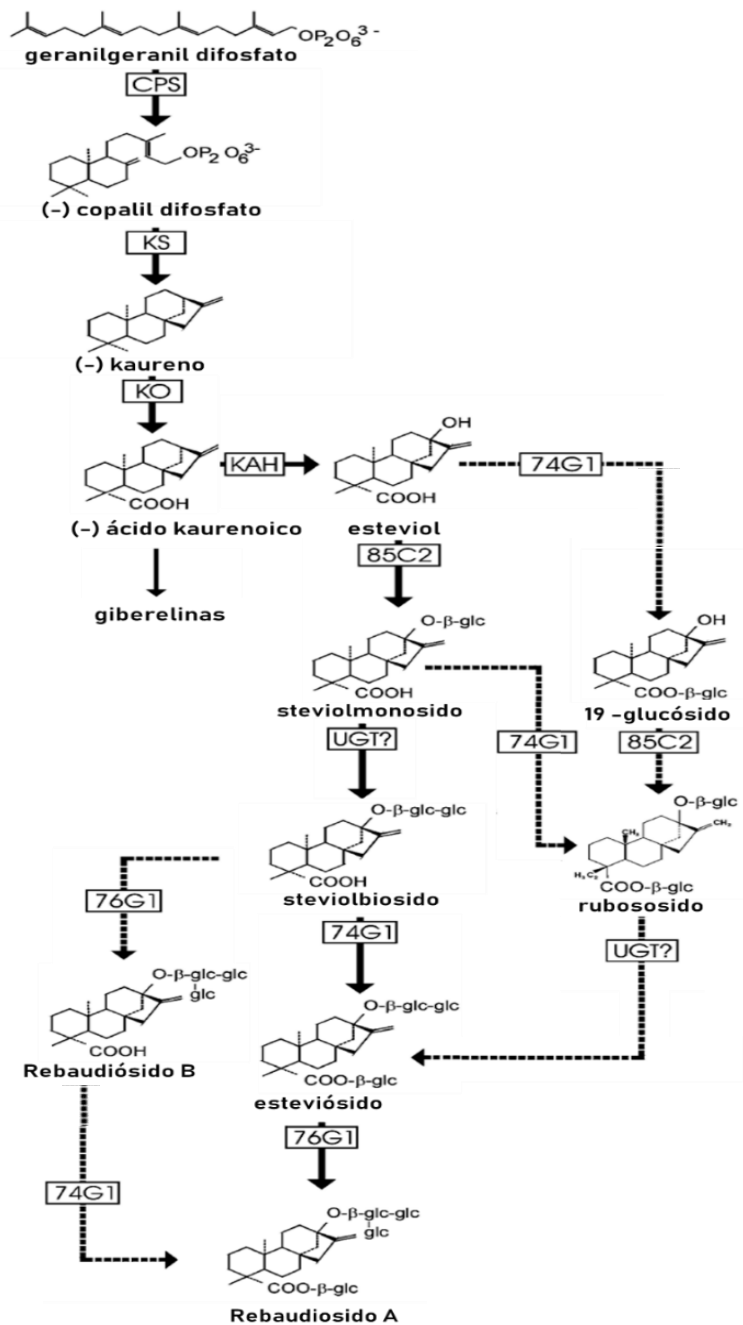


Figura 2. Ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol en *Stevia rebaudiana* Bertoni. CPS-copalil difosfato sintasa; KS-kaureno sintasa; KO-kaureno oxidasa; KAH-ácido kaurenoico oxidasa; UGTs-glucosiltransferasas. Tomado de Humphrey et al. (2006)

En hojas de *S. rebaudiana*, el ácido kaurenico es hidroxidado para formar esteviol (Kim et al., 1996), aunque aún no se han identificado la enzima, ni el gen responsables de esta reacción. El esteviol se glucosila mediante una serie de UDP-glucosiltransferasas (UGT), tres de los cuales (*UGT85C2*, *UGT74G1* y *UGT76G1*) han sido identificadas como enzimas que transfieren un residuo de azúcar a una molécula aceptora, y han caracterizado como enzimas específicas, dado que estas se encargan de glucosilar al esteviósido y rebaudiósido A (Richman et al., 2005).

Las UDP-glucosiltransferasas catalizan la transferencia de una molécula de glucosa a una molécula aceptora (glucósidos), lo cual modifica la solubilidad, actividad o transporte de la molécula. Estas enzimas muestran una alta especificidad en la transferencia de las unidades de glucosa al esteviol para formar los principales edulcorantes; esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido C, y dulcósido A, los cuales son almacenados en las vacuolas (Jarma-Orozco et al., 2010).

Existen antecedentes que la biosíntesis y acumulación de los GEs se pueden dar en los tricomas. Bondare et al. (2004; 2010) que existe una correlación positiva entre el número de tricomas de tipo glandular y el contenido de GEs, lo que indica, que estas estructuras contienen alguno de los precursores de la biosíntesis de los diterpenos y son el sitio de almacenamiento. Por su parte, Cornara et al. (2001) evidencia que en hojas e inflorescencias de *S. rebaudiana* hay tricomas que secretan compuestos de tipo terpeno, sesquiterpenos, flavonoles, entre otros, y se sugieren que tienen una función de secreción de metabolitos secundarios.

2.4 Tricomas: estructuras epidérmicas en tejidos vegetales

En los diferentes órganos de las plantas, se reporta la presencia de diversos tipos de estructuras epidérmicas, las cuales presentan variedad de formas, tamaños, distribución y funciones en el tejido. Dentro de estas estructuras se han descrito las emergentes, papilas y tricomas (Werker, 2000).

Los tricomas se diferencian de otras estructuras epidérmicas como las papilas por su capacidad de secretar o almacenar metabolitos secundarios como son los terpenos y FL, y que contribuyen a la defensa de las plantas frente a las condiciones bióticas y abióticas, como el ataque por insectos o enfermedades causadas por bacterias y hongos patógenos (Li et al., 2020). La liberación de estos metabolitos se puede dar por glutación, fenómeno que se genera por la presión hídrica que viene desde la raíz, al sintetizar y acumular los metabolitos se liberan mediante poros o por ruptura celular (Dassanayake & Larkin, 2017). Los tricomas son definidos como apéndices unicelulares o multicelulares, que se originan a partir de células epidérmicas y que se orientan hacia la superficie del tejido vegetal. Los tricomas se clasifican en tricomas no glandulares (TNG) y tricomas glandulares (TG) (Figura 3 A-B) (Xiao et al., 2016).

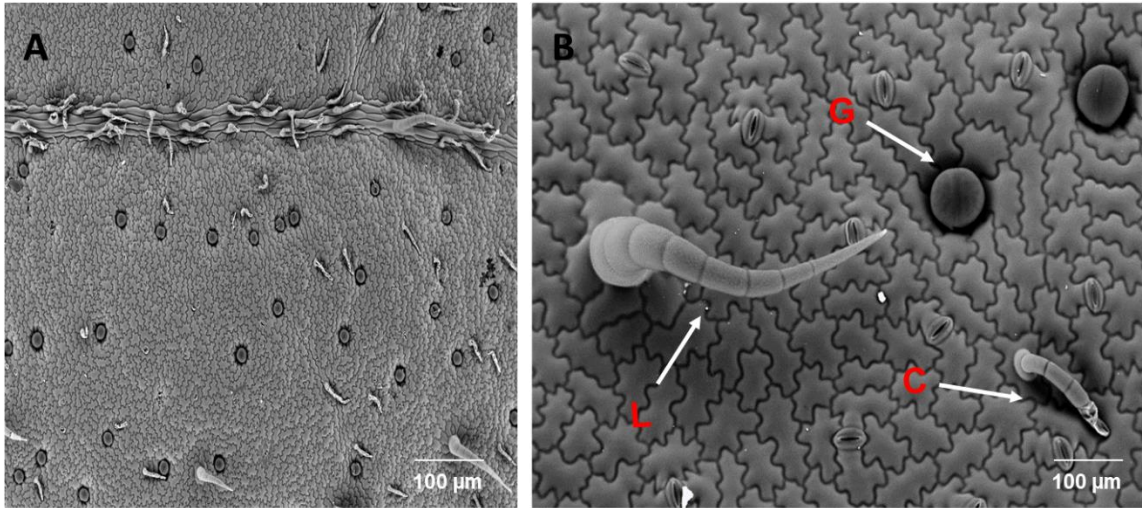


Figura 3. Estructuras epidérmicas de *S. rebaudiana* tomadas mediante microscopía electrónica de barrido. Tricomas glandulares y no glandulares (A); magnificación de tricomas glandulares (G) y tricomas no glandulares largos y cortos (L y C).

2.4.1 Tricomas no glandulares

Los TNG son diversos en microestructura, morfología y anatomía, y se clasifican por su morfología en tricomas ramificados o no ramificados (Werker, 2000). En hojas de plantas de la misma especie se pueden encontrar más de un tipo de TNG; como tricomas unicelulares cubiertos con pequeños gránulos y de longitudes variable, tricomas formados por dos células que se distribuyen en el margen de la hoja y que se mezclan con tricomas multicelulares largos (Werker, 2000). Los TNG son la primera barrera de protección física de las hojas frente a herbívoros, hongos y bacterias; también de condiciones ambientales adversas, como el frío, metales y radiación UV (Xiao et al., 2016).

Los TNG son estructuras que tienen la capacidad de producir algunos metabolitos secundarios, Judd et al. (2019) demostró que en los TNG de hojas de *Artemisa annua* se produce artemisinina. Li et al. (2020), reporta que en hojas de *Camellia sinensis* los tricomas son unicelulares de tipo no glandular y que acumulan cafeína, catequinas y aminoácidos; para el caso de *S. rebaudiana*, Tateo et al. (2001) y Bondarev et al. (2010) identificaron dos tipos de TNG (largos y cortos), sin embargo, no se reporta una función específica en las hojas en relación a su interacción con el ambiente.

2.4.2 Tricomas glandulares

Los TG son estructuras que se originan de una única célula epidérmica, y se pueden clasificar en secretores y no secretores (Tian et al., 2017). Estos tricomas son una barrera de protección en las hojas frente a condiciones de estrés, y sintetizan y secretan metabolitos secundarios que ayudan a la defensa de la planta como son lípidos, fenilpropanoides, FL y terpenos (Champagne & Boutry, 2016).

En el caso de *S. rebaudiana*, Bonderev et al. (2010) reportan una correlación positiva entre el número de TG y el contenido de GEs. Sarmiento- López et al. (2021) asocian la densidad de tricomas glandulares producidos por la inoculación con hongos micorrícicos, con la acumulación de CF y FL, y sugiere que en estas estructuras se acumulan este tipo de metabolitos secundarios, además reporta la relación positiva entre la densidad de tricomas y los niveles de expresión del gen *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)*, el cual está involucrado en el desarrollo de los tricomas.

2.5 Microorganismos promotores de crecimiento vegetal

En el suelo habitan diversos grupos de microorganismos, dentro de los cuales se encuentran las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, las cuales tienen la capacidad de formar interacciones benéficas con las plantas (Bais et al., 2006; Hartman & Tringe, 2019). La asociación entre el tejido vegetal, las bacterias y el suelo se da de una manera dinámica y equilibrada en la rizosfera, debido a que está influenciado tanto por el metabolismo de las plantas como de los microorganismos presentes (Jha et al., 2013; Vandenkoornhuyse et al., 2015).

Este tipo de bacterias generalmente están asociadas a la superficie de las raíces y la rizosfera del suelo, además, se conoce que estimulan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Compant et al., 2005). Los mecanismos por los que estas bacterias generan beneficio a las plantas, se puede mencionar: la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo, producción de sideróforos y ácidos orgánicos (Berg, 2009). Las bacterias también pueden producir fitohormonas como: auxinas, citoquininas y giberelinas; además, presentan actividad antagónica frente a bacterias y hongos fitopatógenos, lo que se ha relacionado con la sanidad y rendimiento de los cultivos (Olanrewaju et al., 2017).

2.5.1 Mecanismos de promoción de crecimiento

Las bacterias endófitas generan varios efectos benéficos de forma directa o indirecta sobre la planta hospedera. Imran et al. (2019), menciona que las plantas se ven beneficiadas de forma directa mediante la adquisición de nutrientes y modulando la

síntesis de hormonas que se relacionan con el crecimiento, como son las auxinas, giberelinas y etileno. Indirectamente, estas bacterias endófitas ayudan a la planta a controlar fitopatógenos, produciendo compuestos de tipo antimicrobianos o bien, generando una respuesta de defensa a la planta (Santoyo et al., 2016)

2.5.1.2 Disponibilidad de Nitrógeno

La adquisición de nutrientes como el nitrógeno, es uno de los mecanismos relacionados con la promoción de crecimiento vegetal. En la literatura se han reportado algunas bacterias de tipo endofíticas como el caso de *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum spp* y *Azoarcus spp* con la capacidad de fijar nitrógeno en plantas caña de azúcar y arroz (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998). La inoculación de este tipo de bacterias genera cambios fisiológicos en la planta, además de aumentar la biomasa seca y la acumulación de nitrógeno total (Asaf et al., 2017). Estas bacterias, mediante el proceso denominado Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) pueden suministrar nitrógeno a la planta hospedera gracias a la actividad de la enzima nitrogenasa; donde se atrapa el nitrógeno atmosférico (N_2) y se convierte en amonio (NH_3), el cual es asimilable por la planta (Bhattacharjee et al., 2008). Guapta et al. (2012) sugiere que *Pseudomonas aeruginosa* tiene la capacidad de aumentar el contenido de nitrógeno en el suelo, además, reportar un incremento en la longitud de la raíz y el brote de plantas de trigo comparado con plantas no inoculadas. Asimismo, Carrel y Frank, (2014) reporta a *Gluconacetobacter diazotrophicus* como una de las bacterias más abundante

aisladas de pinos y resaltando la habilidad de fijar nitrógeno ayudando al crecimiento y desarrollo de su hospedero.

2.5. 1.3 Disponibilidad de Fósforo

El fósforo es otro de los micronutrientes importante para muchos complejos enzimáticos que actúan en los procesos fisiológicos de las plantas (Gyaneshwar et al., 2002). Aunque el fósforo está presente en grandes cantidades en el suelo, en su mayor proporción se encuentra de manera insoluble, por lo que no puede ser asimilado por las plantas y cumplir su función sobre el crecimiento vegetal (Kaur & Reddy, 2014). Las bacterias endófitas tienen la capacidad de aumentar la disponibilidad de este nutriente mediante mecanismos como acidificación, quelación, intercambio iónico y producción de ácidos orgánicos (Khan et al., 2009).. En la literatura comúnmente se encuentra que la mayoría de los endófitos aislados de plantas con interés agronómico como arroz, maíz, tomate y algunas plantas medicinales, tiene la capacidad de solubilizar fósforo (Sahu et al., 2020; Mohanty et al., 2017; Dhouib et al., 2019; LongFei et al, 2018). Li et al. (2018) reportar que el 13% de las bacterias aisladas de tejidos de *Glyzyrrysa uralensis* F fueron capaces de solubilizar fosforo, y que los géneros más comunes fueron *Bacillus* y *Microbacterium*. De igual forma De Fretes et al. (2018) aisló cuatro bacterias endófitas de sorgo (*Microbacterium testaceum*, *Microbacterium oleivorans*, *Brevibacterium iodinum* y *Microbacterium arborescens*) con capacidades de solubilizar fósforo, estos reportes demuestran el potencial de las bacterias endófitas en la promoción de crecimiento vegetal.

Estudios previos del uso de bacterias rizosféricas en *S. rebaudiana*, con capacidad de promover el crecimiento de la planta y su acumulación de metabolitos, son presentados a continuación. Mamta et al. (2010), reportaron que la inoculación de *Bacillus gladioli*, *Enterobacter aerogenes* y *Serratia marcescens* en plantas de *S. rebaudiana*, ocasionó un aumento en el crecimiento de la planta, además del aumento en el rendimiento de esteviósido y rebaudiósido A.

Vafadar et al. (2014), demostraron que la inoculación con la rizobacteria *Azotobacter chroococcum* y el hongo micorrízico *Glomus intraradices* en plantas de *S. rebaudiana*, aumentó el número de hojas, tallo y raíz con relación a las plantas no inoculadas y generó un aumento de 2 veces más en el contenido de rebaudiósido A y esteviósido. Además, los autores reportan un aumento de 3.5 veces más en el contenido de clorofila total en las plantas inoculadas comparado con las plantas control. La mejora en el crecimiento de las plantas puede explicarse por el beneficio que ejercen las bacterias en la nutrición de las plantas, ya que puede presentarse un aumento en el contenido de N de hasta un 49%, en el caso del P de 3.3 veces más y el K un aumento de 60%, con respecto a plantas no inoculadas.

Kilam et al. (2015, 2017), reportó que una coinoculación de *Piroformospora indica* y *Azotobacter sp.* en *S. rebaudiana* mejoró el crecimiento de las plantas, genera 2 veces el contenido de esteviósido y rebaudiosido A, además incrementa 1.3 veces el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides en comparación con las plantas control.

En *S. rebaudiana* se conoce que el uso de diferentes microorganismos como *Rhizophagus intraradices* (Mandal et al., 2015), y *Rhizophagus irregularis*

(Sarmiento-López et al., 2020) generan un incremento en los niveles de expresión de *GGDPS*, *KS*, *KO*, *KAH*, *UGT85C2*, *UGT74G1* y *UGT76G1*, genes asociados a la biosíntesis de los GEs y que a su vez se relaciona con el aumento en el contenido de GEs. Es importante mencionar que la expresión de los genes *UGT85C2*, *UGT74G1* y *UGT76G1* es esencial para la acumulación de los GEs, debido a que son los encargados de la adición de moléculas de azúcar para la formación de los GEs presentes en las hojas de la planta.

2.5.2 Bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal

Las bacterias endófitas son organismos que viven dentro del tejido vegetal sin generar daño aparente y se clasifican de acuerdo con la estrategia en la que habitan en las plantas. Las bacterias obligadas, no tiene capacidad de proliferarse o reproducirse fuera de las plantas y posiblemente se transmiten en las plantas de in ciclo reproductivo a otro mediante la semilla (Hardoim et al.,2008).

Las bacterias facultativas son las que habitan de forma libre en la rizosfera y cuando existen las condiciones favorables colonizan a su huésped (Ardanov et al., 2012).

Finalmente, los endófitos pasivos, son los que no buscan colonizar las plantas, pero lo hacen como resultado de heridas abiertas en el tejido o a lo largo de pelos radicales, esta estrategia es menos competitiva, dado que es deficiente en la colonización del tejido y puede ser considerada no apropiada para estimular el crecimiento de la planta (Gaiero et al., 2013).

En esta interacción, la planta provee a las bacterias un nicho propicio para su crecimiento, ya que las protege frente a condiciones adversas como la luz UV, variación en la temperatura y estrés osmótico.

Por su parte, las bacterias al tener un contacto directo con el tejido vegetal pueden conferir beneficios a la planta hospedera en cuanto al crecimiento, mediante la asimilación de nutrientes esenciales como fósforo, hierro y nitrógeno, además de la modulación o regulación de los niveles de fitohormonas como auxinas, giberelinas y citocininas. También tiene la capacidad de producir antibióticos, producir metabolitos secundarios e inducir el sistema de defensa de la planta hospedera (Gaiero et al., 2013).

Las bacterias endófitas que habitan en un hospedero pueden ser clasificadas como específicas, ya que solo crecen en un hospedero/tejido o presentan preferencia por algún hospedero. Esta característica implica el desarrollo de una adaptación hospedera/hospedante, hospedera/tejido (Schulz, 2006). Las bacterias endófitas tienen diversas maneras de interactuar y colonizar en el tejido vegetal. Los estomas y la raíz son parte fundamental para el contacto microorganismo-planta, las grietas radiculares o heridas permiten que estas penetren al tejido, también la secreción de algunos metabolitos por parte de la planta facilita la interacción y atracción para las bacterias (Sørensen & Sessitsch, 2015).

Es importante mencionar que la actividad biológica de las bacterias endófitas puede representar una estrategia interesante para su aplicación en la agricultura, como biofertilizantes o bioestimulantes para cultivos de interés comercial.

2.5.3 Endófitos en plantas de interés comercial

En el cuadro 1, se presenta una síntesis de los reportes en la literatura sobre bacterias endófitas aisladas de diferentes plantas. Diversas bacterias se han aislado de árboles perennes, por ejemplo: *Olea europaea* L (Cheffi et al., 2019), *Eucalyptus nitens* (Angulo et al., 2014) y *Moringa peregrina* (Khan et al., 2016); así como de plantas medicinales o aromáticas, por ejemplo, como el caso de *Piper nigrum* (Ashajyothi et al., 2019), *Jatropha curcas* (Mohanty et al., 2017), *Ocimum tenuiflorum* (Sahu et al., 2020) y *Tephrosia apollinea* (Khan et al., 2014). Dentro de los aislados bacterianos, se observa que el género *Bacillus* se reporta con mayor diversidad y frecuencia (Dhouib et al., 2019; Jiao et al., 2019; Chen et al., 2020; Khan et al., 2016). Otros géneros; como *Pseudomonas* y *Enterobacter* también se encuentran reportados como endófitos comunes (LongFei et al, 2018; Ashajyothi et al., 2019; Pereira et al., 2019). La raíz y el tallo son tejidos de donde se aíslan con mayor frecuencia las bacterias endófitas (Dhouib et al., 2019; Ashajyothi et al., 2019; Angulo et al., 2014). Además, se han aislado de hojas, corteza, semillas y fruto (Jiao et al., 2019; Khan et al., 2016; Chen et al., 2020).

El efecto promotor de crecimiento de las bacterias endófitas se ha probado en la misma planta hospedera (Dhouib et al., 2019; Jiao et al., 2019; LongFei et al, 2018); como en especies de plantas distintas a la hospedera (Agarwar et al., 2020; Ashajyothi et al., 2019; Khan et al., 2016). El efecto promotor se realiza inoculando las bacterias en la planta y se determinan los efectos en la planta a nivel morfológico, bioquímico y molecular. Los resultados de promoción de crecimiento en las plantas

de la misma especie y en plantas distintas a la hospedera, indican la versatilidad de los endófitos para ofrecer beneficios en cualquier tipo de planta. Los efectos o mecanismos de acción de las bacterias endófitas en la planta se agrupan en la capacidad para mejorar el crecimiento vegetal, el control biológico que pueden tener sobre otros fitopatógenos y la capacidad de las bacterias para inducir mecanismos de defensa en la planta.

En *S. rebaudiana*, Montes-Salazar . (2018), aisló e identificó 12 bacterias endófitas de distintos tejidos de la planta y evaluó su capacidad de producción de ácido indol acético (AIA), sideróforos y solubilización de fosfatos. Las bacterias que sobresalen en la producción de AIA son *Enterobacter cloacae* cepa MB0-1 y *Enterobacter hormaechei* cepa Lb1 con valores de 72.4 y 66.9 µg de AIA/mL respectivamente. Para la producción de sideróforos se resaltan *E. hormaechei* cepa 1017, *E. hormaechei* cepa Lb1 y *E. kobei*. En cuanto a la capacidad de solubiliza fosfatos, *E. hormaechei* cepa 1017, *E.hormaechei* cepa Lb1, *E. cloacae* cepa 13047, *E. kobei* y *E. xiangfangensis* son buenas bacterias solubilizadoras de fosfato con valores de 540, 560, 800, 620 y 680 µg/mL respectivamente.

Hernández-Guisao. (2019) reporta el uso de las bacterias aisladas de *S. rebaudiana* y su efecto en la promoción de crecimiento en plantas de *Medicago sativa*, siete bacterias mejoraron el peso seco de la raíz, 10 bacterias mejoraron el peso seco aéreo y 12 bacterias el peso seco total. Las 12 bacterias aumentaron la longitud del tallo hasta 1.4 veces y entre 60-120 % más del área foliar con respecto a las plantas control. Estos últimos reportes son los únicos en aislar e identificar bacterias endófitas de *S. rebaudiana*, determinar sus características promotoras del

crecimiento y evaluar su efecto sobre parámetros de crecimiento vegetal en una planta modelo.

Cuadro 1. Bacterias endófitas aisladas de diferentes plantas hospederas y su actividad biológica

Planta hospedera	Bacteria endófitas	Tejido	Planta colonizada	Actividad biológica	Referencia
			Propia planta		
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Bacillus velezensis</i>	Tallo	<i>Solanum lycopersicum</i>	Actividad antifúngica, promoción de crecimiento	Dhouib et al., 2019
Tabaco	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Semillas	Tabaco	Promoción de crecimiento, control biológico	Jiao et al., 2019
Árbol de olivo	<i>Bacillus velezensis</i>	Raíz	<i>Olea europaea</i> L	Promoción de crecimiento, control biológico	Cheffi et al., 2019
<i>Glycine max</i> L	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Ochrobactrum haematophilum</i>	Nódulos de raíz	<i>Glycine max</i> L seeds	Promoción de crecimiento y mayor producción de clorofila	Zhao, Xu, y Lai, 2018

<i>Eucalyptus nitens</i>	<i>Bacillus simplex</i>	Raíz	<i>Eucalyptus nitens</i>	Promoción de crecimiento	Angulo et al., 2014
Otra planta					
<i>Gnetum gnemon L</i>	<i>Staphylococcus warneri</i> , <i>Bacillus velezensis</i> , <i>Solibacillus isronensis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus atrophaeu.</i>	Hojas, Tallo y cono*	<i>Solanum lycopersicum</i>	Promoción de crecimiento	Agarwal et al., 2020
Fresa	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Fruta fresa	-	Control biológico en fruta	Chen et al., 2020
<i>Ocimum tenuiflorum</i>	<i>Bacillus altitudinis</i>	Tallo	<i>Orizava sativa L</i>	Control biológico, Inducción de enzimas de defensa, aumento de materia seca	Sahu et al., 2020
<i>Piper nigrum L</i>	<i>Pseudomona putida</i>	Raíz	Arroz	Promoción de crecimiento, activa defensa	Ashajyothi et al., 2019
<i>Piper tuberculatum</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	Raíz	<i>Piper nigrum L</i>	Aumento de biomasa	Pereira et al., 2019
<i>Jatropha curcas</i>		Raíz	Maíz	Promoción de crecimiento	Mohanty et al., 2017

Paenibacillus
oceanisediminis,
Paenibacillus panacisol,
Bacillus aryabhatai s,
Bacillus safensis,
Brevibacillus agri,
Staphylococcus
succinus

<i>Moringa peregrina</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	corteza	<i>Solanum lycopersicum</i>	Promoción de crecimiento, producción de clorofila	
<i>Tephrosia apollinea</i> .	<i>Sphingomonas</i> sp.	Hojas	<i>Solanum lycopersicum</i>	Promoción de crecimiento	Khan et al., 2014

2.5.4 Colonización de bacterias endófitas en el tejido vegetal

El proceso de colonización de las plantas por las bacterias implica una compleja comunicación química donde se requiere de un reconocimiento de compuestos específicos de los exudados de la raíz por parte de las bacterias endófitas (Bais et al., 2006). La penetración de las bacterias endófitas en raíces se produce a través de la colonización de los pelos radiculares (Mercado-Blanco & Prieto, 2012), donde a través de la pared celular vegetal se secretan enzimas hidrolíticas como las celulasas, xilanasas, pectinasas y endoglucanasas, que facilitan la entrada y propagación de bacterias dentro de los tejidos de la planta (Kandel et al., 2017). Los endófitos ocupan con más frecuencia los espacios interradiculares. Hardoim et al. (2015), sugiere que los espacios interradiculares son ricos en nutrimentos para las bacterias, como son los carbohidratos, aminoácidos y nutrientes inorgánicos.

El sistema vascular es una ruta de transporte hacia compartimientos internos de la planta una vez están en el tejido vegetal y las bacterias tienen la capacidad de llegar a órganos lejanos y específicos de la planta, como flores, semillas, fruto y polen o bien estar en los espacios intercelulares (Frank et al., 2017). Estudios en plantas de arroz (*Oryza sativa*) que fueron inoculadas con *Pseudomonas putida* y *Bacillus amyloquifaciens* reportan presencia y colonización en el tejido radicular (Ashajyothi et al. 2019; Shahzad et al. 2017).

III. JUSTIFICACIÓN

S. rebaudiana es una planta de interés nutricional y farmacológico debido a los compuestos que contienen sus hojas que tienen un poder edulcorante de 100 a 400 veces mayor que la sacarosa. Los compuestos que presentan esta característica dulce se denominan glucósidos de esteviol (GEs). La planta además contiene compuestos fenólicos (CF) y flavonoides (FL) con actividad antioxidante. Por lo cual, la planta es utilizada por la industria alimentaria y farmacéutica, como edulcorante de origen natural y que aporta un nivel calórico bajo aporte y antioxidantes.

En México *S. rebaudiana* se cultiva en los estados de Veracruz, Yucatán, Nayarit, Oaxaca y Chiapas, y es un cultivo promisorio, dado a que existen condiciones ambientales adecuadas para su adaptación. Una tecnología para el mejoramiento de los cultivos es el uso de microorganismos con actividad promotora de crecimiento, dentro de los cuales se encuentran las bacterias endófitas que brindan beneficios a la planta hospedera. Las bacterias endófitas viven dentro del tejido vegetal sin causar un daño aparente a la planta, creando una interacción mutualista donde las bacterias promueven el crecimiento vegetal y estimulan el metabolismo secundario, y por su parte las plantas les proveen un nicho adecuado para su crecimiento, protección contra condiciones adversas y fuente de carbono. Los resultados en el grupo de trabajo con 12 bacterias endófitas aisladas de *S. rebaudiana* muestran que las bacterias tienen características para la promoción de crecimiento, como es la producción de ácido indolacético y la capacidad de solubilizar fosfatos; en este sentido, la inoculación de estas bacterias endófitas en plantas de *S. rebaudiana* permitirá obtener información sobre el papel que cumplen

dentro de *S. rebaudiana*, describir su capacidad en promover el desarrollo y crecimiento vegetal respecto a parámetros como altura de planta, longitud de la raíz, desarrollo foliar, entre otros; además de determinar la función que ejercen las bacterias sobre la biosíntesis y acumulación de metabolitos de interés como GEs, CP y FL. Además de definir si las bacterias endófitas cuando son inoculadas en plantas de *S. rebaudiana* pudieran tener un papel en la expresión de genes asociados a la biosíntesis de GEs, fotosíntesis y sobre estructuras acumuladores de metabolitos secundarios como los tricomas.

IV. OBJETIVOS

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inoculación con bacterias endófitas sobre el crecimiento, biosíntesis de glucósidos de esteviol, concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, y la densidad de tricomas en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

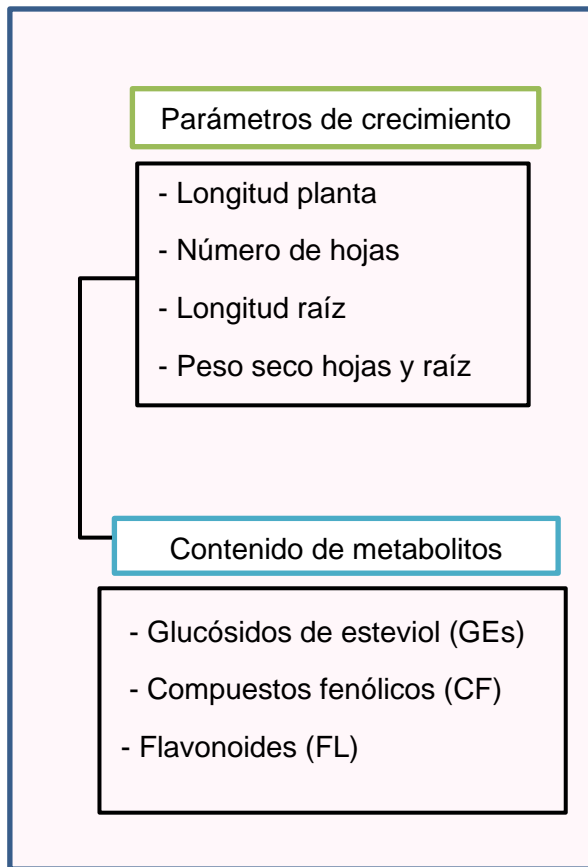
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Seleccionar bacterias endófitas sobresalientes por su capacidad promotora de crecimiento vegetal y de promoción en la concentración de glucósidos de esteviol, compuestos fenólicos y flavonoides en plantas de *S. rebaudiana* cultivadas en vivero.
- Analizar los niveles de expresión de los genes *KO*, *KAH*, *UGT74G1*, *UGT76G1* en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con bacterias endófitas y su relación con la acumulación de GS.
- Determinar el efecto de la inoculación con bacterias endófitas en plantas de *S. rebaudiana* sobre la densidad de tricomas y el nivel de expresión del gen *TTG1*.
- Determinar el efecto de la inoculación de bacterias endófitas sobre la concentración de pigmentos y actividad fotosintética en plantas de *S. rebaudiana*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diagrama general de trabajo

Etapa 1



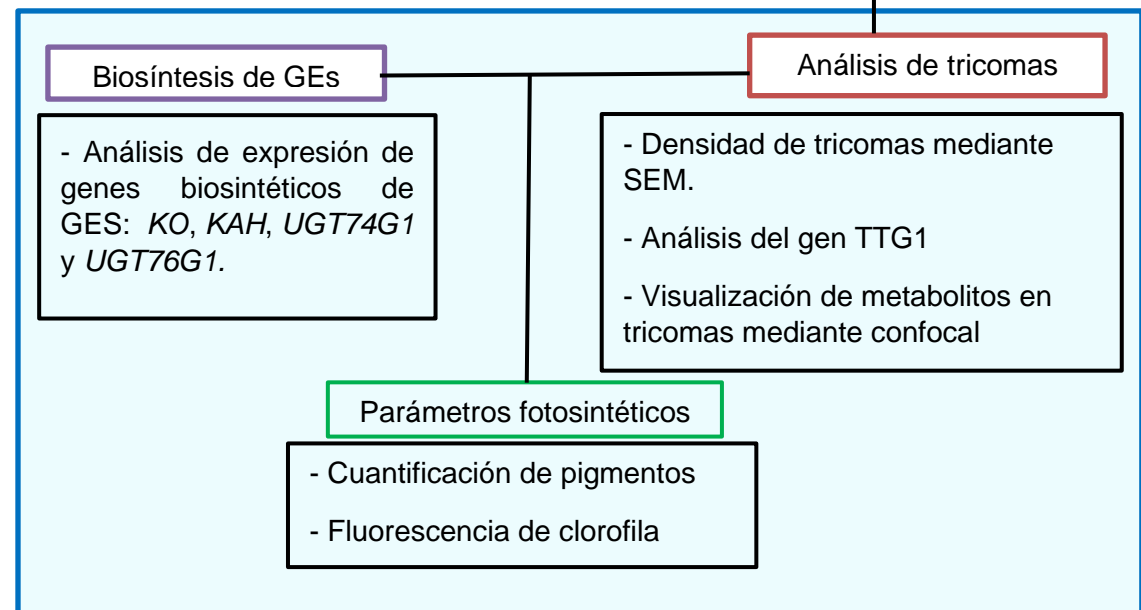
Selección de bacterias endófitas sobresalientes

Plantas de *S. rebaudiana* no inoculadas (control) e inoculadas



Hojas

Etapa 2



5.2 Cultivo y manejo de las plantas de *S. rebaudiana*

Las plantas de *S. rebaudiana* se cultivaron y mantuvieron en un vivero ubicado en las instalaciones del CEPROBI-IPN bajo la supervisión del Laboratorio de la Dra. Silvia Evangelista Lozano del Laboratorio de propagación *ex vitro* y siguiendo la metodología reportada (Evangelista-Lozano & Rodríguez-Monroy, 2015). Los explantes apicales de 3-5 cm se plantaron en macetas de 1 L de capacidad, con un sustrato a base de 60 % de turba, 20 % de perlita y 20 % de vermiculita, a un pH de 5.6 ± 0.5 y porosidad del 85%. Previo a su uso, el sustrato se esterilizó en un autoclave a 121°C y 15 PSI durante 2 h. Las macetas con los explantes se mantuvieron en un vivero durante 15 días, las plantas fueron regadas día de por medio con la solución nutritiva Steiner al 50% (Rodríguez -García, 2015).

5.3 Origen de los aislados bacterianos

Las bacterias endófitas se aislaron de diferentes tejidos de plantas de *S. rebaudiana*: hoja, tallo y raíz (Cuadro 2). Los tejidos se enjuagaron con agua estéril y la superficie se esterilizó usando etanol al 70 % (10 min) e hipoclorito de sodio al 2 % (20 min). Los fragmentos de cada tejido se sembraron en cajas Petri con medio Luria Bertani (LB) y agar (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, EE. UU.); las cajas de Petri se incubaron a 25 ± 1 °C durante 24 h. Se obtuvieron cultivos axénicos y se criopreservaron en glicerol al 20% (v/v) en tubos Eppendorf de 1.5 mL a -80 °C.

Cuadro 2. Bacterias endófitas aisladas de plantas de *S. rebaudiana*.

Tejido	Aislamiento	Cepa cercana NCBI*	Código acceso	Identidad
Hoja	H2A3	<i>Enterobacter hormaechei strain C15</i>	CP042488.1	99.7%
Hoja	H5A2	<i>Enterobacter hormaechei strain ER48</i>	MT124573.1	100%
Hoja	H7A1	<i>Enterobacter bacterium strain EMt 5</i>	EU863187.1	90%
Tallo	T1A2	<i>Enterobacter xiangfangensis strain KV7</i>	MH200641.1	99.7%
Tallo	T3A3	<i>Enterobacter xiangfangensis strain SitB416</i>	KY880912.1	99.8%
Tallo	T5P1	<i>Enterobacter xiangfangensis strain KV7</i>	MH200641.1	99.7%
Raíz	R2A2	<i>Enterobacter xiangfangensis strain KV7</i>	MH200641.1	99.7%
Raíz	R3A1	<i>Enterobacter cloacae strain MB0-11</i>	MH041191.1	100%
Raíz	R5P1	<i>Enterobacter hormaechei strain EGYMCRVIM</i>	CP052870.1	99.3%
Raíz	R6A1	<i>Enterobacter hormaechei strain C45</i>	CP04255.1	99.7%
Raíz	R6P1	<i>Bacillus safensis strain F14</i>	MH065717.1	100%
Raíz	R7A2	<i>Enterobacter xiangfangensis strain KV7</i>	MH200641.1	99.7%

Las secuencias de rDNA 16S de los aislados se compararon con la base de datos GenBank utilizando BlastN y un análisis filogenético utilizando el programa MEGA 6 según Montes-Salazar et al. (2018). El inóculo bacteriano se cultivó en frascos de 250 mL con un volumen de 100 mL de medio líquido LB y se incubó en un agitador rotatorio (Infors HT, Minitron, Suiza) a 200 rpm durante 48 h a 25 °C

5.4 Preparación del inóculo de las bacterias en matraces Erlenmeyer

A partir de los tubos Eppendorf criopreservados de cada aislado, se tomó una alícuota de 100 µL y se sembró en una caja Petri con medio sólido LB. Luego de 24 h de incubación a 25°C, se tomó una asada de una colonia para inocular matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen de 100 mL de medio LB líquido, los cuales fueron incubados en un agitador rotatorio a 200 rpm durante 48 h a 25°C.

5.5 Inoculación con bacterias endófitas de las plantas de *S. rebaudiana* en condiciones de vivero

Se utilizaron plantas de *S. rebaudiana* de 15 días de edad, con raíces de cinco cm de largo y dos hojas. Las plantas se desinfectaron con etanol al 70% durante 1 min, seguido de hipoclorito de sodio al 2% durante 1 min y, posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril durante 2 min.

Las plantas se plantaron en macetas de 1 dm³ que contenían el mismo sustrato mencionado anteriormente. El sustrato se vertió en macetas negras de 1 L con una altura de 11 cm, y un diámetro inferior y superior de 8 y 10 cm respectivamente y las macetas se colocaron en bandejas de plástico. Un día después de haber sido plantadas (tiempo 0 desde el inicio del experimento), las plantas fueron inoculadas

en la raíz con 5 mL de caldo de cultivo de cada uno de los 12 aislados. La concentración se ajustó a 0,2 DO a 600 nm (aproximadamente 1×10^8 células cm^{-3}) (Botta et al., 2013). Las plantas se cultivaron a 28 °C, con un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Se consideraron diez plantas por tratamiento y se realizaron dos experimentos independientes. El control fueron plantas no inoculadas. Todas las plantas se regaron en días alternos con una solución de Steiner al 50 % (Rodríguez-García, 2015). Las macetas se colocaron en el vivero en disposición aleatoria y no se realizó poda durante el tiempo de evaluación.

Después de 30 días de la inoculación, a las plantas se evaluaron las siguientes variables: altura, número de hojas, longitud de la raíz, peso fresco y seco de la parte aérea y de las raíces, y el contenido GEs, CF y FL de las hojas. Luego de la evaluación de las variables mencionadas, se seleccionaron las bacterias *E. hormaechei* H2A3, *E. hormaechei* H5A2 por su capacidad de estimular la acumulación de GEs, CF y F, así como *E. xiangfangensis* R7A2 como un control. Se realizó un experimento independiente con las bacterias seleccionadas bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas y se evaluó la expresión de genes relacionados con la ruta de biosíntesis de los GEs (*KO*, *KHA*, *UGT74G1* y *UGT76G1*), densidad de tricomas, contenido de pigmentos fotosintéticos y actividad fotosintética.

5.6 Evaluación del contenido de GE mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)

5.6.1 Preparación de las muestras y obtención de extracto metanólico para la determinación de GEs.

Para la extracción de los GEs se utilizó como solvente metanol de acuerdo a la metodología reportada y modificada por Villamarín-Gallegos, (2016). Las muestras de 0.1g hojas secas de tres plantas por bacteria evaluada se mantuvieron en un desecador por 1 h y luego se registró el peso seco de las muestras. El tejido seco se molió en un mortero de porcelana y se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL. El polvo de tejido seco se suspendió en 1 mL de metanol durante 24 h a temperatura ambiente. Luego de las 24 h, se mezcló y centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 10 min, el sobrenadante se recuperó en un tubo Eppendorf y se almacenó a -4°C hasta su procesamiento.

5.6.2 Cuantificación del contenido de GE en hojas de *S. rebaudiana*

Para realizar la cuantificación de GEs se empleó un equipo de Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, CAMAG, Muttenz, Switzerland), el cual tiene un sistema automático de aplicación ATS4, una cámara automatizada de desarrollo (Automatic Developing Chamber ADC2), un sistema de fotodocumentación y evaluación de imágenes TLC Visualizer y una parrilla de calentamiento de placas. El cálculo del contenido de GEs se realizó mediante el software VisionCATS versión 2.0.15069.1.

Se usaron como estándares de GEs los compuestos mayoritarios en plantas de *S. rebaudiana*: esteviósido (Sigma-50956), dulcósido-A (ASB-00004949-005), rebaudiósido-A (ASB-00018223-002), y rebaudiósido-C (ASB-00018223-002). Para la aplicación de las muestras se usaron placas de HPTLC de 20 x 10 cm de Silica Gel 60 F254 (Merck) y se llevó a cabo con el sistema de aplicación automático ATS4 (CAMAG, Muttenz, Switzerland). La curva patrón para la cuantificación de los compuestos se realizó para cada placa, aplicando cinco concentraciones que se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Volumen y concentración de estándares para generar la curva patrón en la cuantificación de glucósidos de esteviol.

Aplicación (µL)	Concentración (µg)
0.8	0.2
1.6	0.4
3.2	0.8
6.4	1.6
12.8	3.2

El equipo ADC2 (CAMAG-Automatic Developing Chamber) se utilizó para la separación en placa de los GEs, como fase móvil (10 mL) y fase de saturación (25 mL) se usó la siguiente mezcla de solventes: cloroformo: metanol: ácido acético (65:25:4 v: v: v). Para lograr una correcta separación de los GE, el proceso se llevó a cabo en dos etapas usando la misma mezcla de solvente: en la primera

separación, la distancia de migración final fue de 80 mm y en la segunda, de 85 mm. La cámara de separación se dejó en saturación con los solventes durante 20 min; 5 min de pre-acondicionamiento, 10 min de acondicionamiento y 5 min de secado. Se controló la humedad en un intervalo de 47 ± 2 % reportado como humedad relativa. Posterior al proceso de separación, se llevó a cabo el revelado de los GEs en la placa con el reactivo de alfa-naftol; el cual previamente se preparó disolviendo 2 g de α -Naftol en 180 mL de etanol absoluto y 12 mL H_2SO_4 al 50%. La placa se sumergió en la solución preparada durante 3 s e inmediatamente se puso sobre la plancha de calentamiento a 120 °C durante 5 min. Las imágenes se tomaron con luz ultravioleta de 254, 366 nm y con luz blanca, para luego analizarlas en el programa VisionCATS versión 2.0.15069.1.

5.7 Determinación del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en hojas de *S. rebaudiana* mediante espectrofotometría.

5.7.1 Obtención del extracto etanolico

Las hojas frescas de cuatro plantas se colectaron en forma aleatoria y se secaron a 55°C en una estufa (Riossa E-33) durante 48 h. Luego de las 48 h se registró el peso seco, las muestras estuvieron previamente en un desecador por 1 h. Las muestras secas se molieron en un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino, el cual se colocó en tubos Eppendorf, y se adicionó 1 mL de etanol al 75%, la concentración de la muestras fue de 0.1 % (p:v). La mezcla se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C durante 10 min, se recuperó el sobrenadante en tubos Eppendorf y se almacenó a -4°C hasta su procesamiento.

5.7.2 Determinación de compuestos fenólicos totales

La determinación de compuestos fenólicos se realizó mediante la metodología reportada por Bobo-García et al. (2014), empleando una microplaca ELISA de 96 pocillos y el reactivo de Follin-Ciocalteu. Para generar la curva patrón, se utilizó ácido gálico como estándar.

Para esto, se pesaron 0.01 g de ácido gálico, se disolvieron en 1 mL de etanol al 75% y se realizaron diluciones de 0 a 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en intervalos de 10 μg para generar soluciones stock de cada concentración. Se obtuvo un coeficiente de correlación de $R=0.995$.

Para la cuantificación en la muestra problema, se realizó una dilución 1:10 del extracto, para lo cual se tomaron 20 μL de extracto y se adicionaron 180 μL de etanol al 75%. Luego, se tomaron 20 μL de la dilución y se colocaron en un pozo de la microplaca y se agregaron 100 μL de la solución de Folin-Ciocalteu diluida con agua desionizada a una relación 1:4 (v:v). Las muestras se dejaron incubar durante 6 min en oscuridad a temperatura ambiente en la microplaca, luego de los 6 min se añadieron 100 μL de carbonato de sodio al 10% y se incubó la reacción por 2 h. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 760 nm en un lector de placas (Multiscan Go, Thermo Fisher Scientific) equipado con el Software SkanIt versión 1.00.40. Los resultados se reportaron como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de peso seco (g PS).

5.7.3 Determinación del contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó con la metodología descrita por Chang et al. (2002), y con la modificación propuesta por Villamarin- Gallegos et al. (2016), que consiste en realizar la cuantificación en microplacas en lugar de celdas de vidrios. Para generar la curva patrón o de calibración se empleó como estándar la quercetina; y para esto, 0.01 g de quercetina se disolvió en 1 mL de etanol al 75% y a partir de esta solución, se hicieron diluciones en un intervalo de 0 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se obtuvo un coeficiente correlación de $R=0.995$.

De cada stock se tomaron 24 μL y se colocaron en un pozo de la microplaca, luego se adicionaron 72 μL de etanol al 75%, e inmediatamente 5 μL de cloruro de aluminio al 10%, esta reacción se dejó incubar por 6 min en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 5 μL de acetato de potasio 1M y se dejó por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 415 nm mediante un lector de placas (Multiscan Go, Thermo Fisher Scientific) equipado con el Software SkanIt versión 1.00.40. Para la muestra problema, se tomaron 24 μL del extracto y se realizó el mismo procedimiento para la curva patrón. Los resultados fueron reportados como mg equivalentes de quercetina (EQ) por gramo de peso seco de la muestra (g PS).

5.8 Análisis de tricomas por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) y microscopía de barrido láser confocal

La densidad de tricomas de las hojas se analizó con un microscopio electrónico de barrido ambiental (Carl Zeiss, EVO LS10, Alemania) según la metodología reportada por Sarmiento-López et al. (2021). Se colectaron hojas completamente desarrolladas cerca del tercer meristemo apical de plantas no inoculadas y aquellas inoculadas con bacterias endófitas seleccionadas. Se colocó una hoja en stubs de aluminio con cinta de carbón conductor de doble cara y se observó bajo ESEM utilizando un voltaje de 15 kV. La presión del gas en la cámara ESEM se mantuvo a 20 Pa mediante la introducción de vapor de agua y se utilizó un detector de electrones secundario para obtener micrografías. La densidad de tricomas en $0,255 \text{ cm}^2$ (área foliar de tricomas⁻¹) y el tipo de tricomas (cortos, grandes y glandulares) se determinaron mediante análisis de imágenes utilizando el software de edición ImageJ 2.0 a partir de micrografías obtenidas por ESEM.

El efecto de la inoculación de plantas con bacterias endófitas sobre la acumulación de metabolitos específicos se visualizó con un microscopio de barrido láser confocal (Carl Zeiss, modelo LSM 800, Alemania) según la metodología reportada por Sarmiento-López et al. (2021). La máxima fluorescencia de los metabolitos secundarios (GEs, compuestos fenólicos y flavonoides) se observó en el espectro azul (435-485 nm), y las clorofilas en el espectro rojo (630-685 nm) se detectaron según la metodología de Talamond et al. (2015). Las micrografías se obtuvieron utilizando Zeiss Efficient Navigation (ZEN) 2.6 Blue edition.

5.9 Perfil de expresión de genes en plántulas de *Stevia rebaudiana* inoculadas con bacterias endófitas

Se evaluaron los niveles de acumulación de transcritos de los genes para kaureno oxidasa (*KO*), kaureno hidroxilasa (*KAH*) y (UDP)-glicosiltransferasas (*UGT74G1* y *UGT76G1*) en hojas de plantas no inoculadas (control) y hojas de plantas inoculadas con las bacterias endófitas seleccionadas. *E. hormaechei* H2A3, *E. hormaechei* H5A2 y *E. xiangfangensis* R7A2. La expresión de cada gen se normalizó frente a la expresión del gen *GAPDH*. Las muestras de hojas congeladas (0,5 g) se molieron hasta obtener un polvo fino con nitrógeno líquido. El ARN total se obtuvo utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo del fabricante.

La muestra de RNA fue tratada con DNasa, y la cantidad de RNA total extraído se cuantificó mediante la relación A260/280 y A260/230 usando el equipo Nanodrop 2000c (Thermo,USA) (Simms et al., 1993).

Para determinar la calidad e integridad del ARN total se realizó un gel de agarosa al 1,5 % saturado con formaldehído. La síntesis del cDNA se llevó a cabo a partir de 1 µg de ARN purificado utilizando un kit de transcripción inversa de ADNc y siguiendo la metodología reportada por Kilam et al., (2017).

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) se realizó con SYBR Green (QIAGEN, California, EE. UU.) y se cuantificó en un termociclador de PCR en tiempo real Rotor-Gene Q (QIAGEN, California, EE. UU.). La qRT-PCR se programó para 35 ciclos, con desnaturalización a 95 °C durante 15 s, hibridación a 58 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. Se evaluaron tres repeticiones biológicas con tres repeticiones técnicas por tratamiento. La especificidad de los

primers se verificó mediante PCR regular. Se utilizaron genes específicos de la ruta de síntesis de los glucósidos de esteviol y síntesis de tricomas (Mandal et al., 2015) (Cuadro 4). Los resultados cuantitativos fueron evaluados por el Método $2^{-\Delta CT}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001).

Cuadro 4. Lista de genes específicos para el análisis mediante qRT-PCR

Gen	Primers
	(5'-----3')
<i>GDPH</i>	Directo: TCAGGGTGGTGCCAAGAAGG Reverso: TTACCTTGGCAAGGGGAGCA
<i>KO</i>	Directo: GTTGAAGGAGAAGAAACCTTAC Reverso: CAACATATAAGCTCTCCACATC
<i>KAH</i>	Directo: CCTATAGAGAGGCCCTTGTTG Reverso: TAGCCTCGTCCCTTTGTGTC
<i>UGT74G1</i>	Directo: GGTAGCCTGGTGAAACATGG Reverso: CTGGGAGCTTCCCTCTTCT
<i>UGT76G1</i>	Directo: GACGCGAACTGGAACTGTTG Reverso: AGCCGTCCGAGGTTAAGACT
<i>TTG1</i>	Directo: GCTCCCTCTCGCTTTTAGGT Reverso: CCGCAATATATCCTGGTTGG

6. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

El contenido de clorofilas (a y b) y carotenoides se cuantificaron mediante el método reportado por Lichtenthaler. (1987). Las muestras de hojas frescas de plantas inoculadas y no inoculadas se lavaron con agua desionizada estéril para retirar material contaminante superficial. Se llevó a cabo la extracción a partir de 50 mg de tejido fresco de hoja y se maceró con 1 mL de acetona al 80%. Las muestras se centrifugaron para separar el sobrenadante, se almacenaron a 4°C, protegiéndolo de la luz con papel aluminio hasta su evaluación. El contenido de pigmentos se determinó mediante un espectrofotómetro (Thermo Scientific® Multiskan GO) a 663, 646 y 470 nm. El contenido total de clorofilas se calculó por la sumatoria del contenido de clorofila a y b, expresando los datos en miligramos por gramo de peso fresco (mg/ g PF), usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clor a} = (12.21 \times A_{663} - 2.81 \times A_{646})$$

$$\text{Clor b} = (21.50 \times A_{646} - 5.10 \times A_{663})$$

$$\text{Car} = (1000 \times A_{470} - 3.27 \times \text{Clor a} - 104 \times \text{Clor b}) * / (229)$$

Donde, A_n es igual a la absorbancia en nm, V es el volumen de la muestra en mL, y PF es el peso fresco de las hojas en g. Los resultados se reportaron como mg/ g peso seco.

6.1 Determinación de la actividad fotosintética

La fluorescencia de clorofila en las plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con las bacterias seleccionadas y no inoculadas se midió con un fluorímetro de clorofilas OS.30p (Opti-Sciences Inc., USA). Para obtener los datos de fluorescencia de

clorofila se usó la segunda hoja en la zona cercana al meristemo apical de acuerdo a la metodología reportada por Sarmiento-López et al., 2020. Las plantas fueron pre-acondicionadas en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la fluorescencia de las clorofilas se evaluó mediante un pulso de saturación con luz actínica ($3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y se calcularon parámetros indicadores de la actividad fotoquímica como la fluorescencia primaria (F_o), la fluorescencia máxima (F_m), la máxima eficiencia cuántica fotoquímica del PSII (F_v/F_m) y la eficiencia del potencial fotoquímico (F_v/F_o). Parámetros como la fluorescencia variable (F_v) y F_v/F_o fueron calculados de la siguiente manera: $F_v = F_m - F_o$ y $F_v/F_o = F_m/F_o - 1$ (Schreiber et al., 1994).

6.2 Análisis estadístico

Los datos crudos de cada análisis se utilizaron para obtener las medias y desviaciones estándar. Los datos de cada variable de crecimiento, contenido de pigmentos fotosintéticos, actividad fotosintética, concentración de metabolitos, densidad de tricomas y expresión de genes de las plantas no inoculadas e inoculadas se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y las diferencias significativas se analizaron mediante la prueba de Tukey, con un valor de $P < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico Minitab® para Windows, versión 19.1 (Estados Unidos, LLC), y los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism para Windows, versión 6.0 (GraphPad Corp, San Diego, CA, EE. UU.).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Efecto de bacterias endófitas aisladas de *S. rebaudiana* sobre parámetros de crecimiento en plantas de *S. rebaudiana*

Las plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con las bacterias endófitas no presentaron una actividad promotora del crecimiento vegetal, debido a que su crecimiento (longitud de planta, longitud de raíz, número de hojas y peso seco de raíz) no fue estadísticamente diferente con respecto a las plantas no inoculadas (Cuadro 5).

Las interacciones entre la planta y los microorganismos endófitos se han propuesto como una estrategia para mejorar el crecimiento de las plantas y estimular el metabolismo secundario (Afzal et al., 2019; Hardoim et al., 2015; Hardoim et al., 2008).

Sin embargo, en este trabajo, la reinoculación con bacterias endófitas aisladas de diferentes tejidos de *S. rebaudiana* no promovió significativamente el crecimiento de las plantas. Estos resultados sugieren que la promoción del crecimiento no está asociada con la reinoculación bacteriana endofítica y que las bacterias no afectaron negativamente el crecimiento de las plantas. Es posible que la planta pueda dividir los nutrientes para el metabolismo primario o proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. Además, podría indicar que estas bacterias tienen otro tipo de efecto en la planta, como por ejemplo el estímulo sobre metabolismo secundario, lo que puede generar una mayor acumulación de compuestos bioactivos (Li et al., 2018). Este comportamiento también se ha observado en diferentes interacciones planta-microorganismo, como *Ocimum basilicum* L.

Cuadro 5. Efecto de la inoculación de bacterias endófitas sobre el crecimiento vegetal en plantas de *S. rebaudiana*.

Tratamiento	Longitud planta (cm)	Número hojas	Peso seco hojas	Longitud raíz (cm)	Peso seco raíz
Control	23.6 ± 2.5 a	28.5 ± 3.3 a	0.117 ± 0.03 a	19.1 ± 2.2 a	0.128 ± 0.05 a
<i>E. hormaechei</i> H2A3	19.7 ± 1.3 a	27.2 ± 2.5 a	0.082 ± 0.02 a	18.9 ± 2.0 a	0.116 ± 0.04 a
<i>E. hormaechei</i> H5A2	23.4 ± 1.5 a	29.9 ± 3.7 a	0.088 ± 0.01 a	20.8 ± 2.4 a	0.146 ± 0.04 a
<i>E. bacterium</i> H7A1	25.2 ± 7.3 a	29.9 ± 3.7 a	0.105 ± 0.05 a	21.6 ± 1.2 a	0.129 ± 0.07 a
<i>E. xiangfangensis</i> T1A2	21.9 ± 2.6 a	28.6 ± 2.9 a	0.103 ± 0.05 a	23.9 ± 5.7 a	0.107 ± 0.04 a
<i>E. xiangfangensis</i> T3A3	24.9 ± 3.1 a	30.2 ± 3.5 a	0.095 ± 0.02 a	21.2 ± 2.9 a	0.107 ± 0.05 a
<i>E. xiangfangensis</i> T5P1	25.8 ± 3.1 a	31.0 ± 2.0 a	0.108 ± 0.04 a	21.1 ± 1.7 a	0.125 ± 0.04 a
<i>E. xiangfangensis</i> R2A2	20.7 ± 2.1 a	28.2 ± 1.9 a	0.087 ± 0.03 a	22.2 ± 4.7 a	0.092 ± 0.03 a
<i>E. cloacae</i> R3A1	23.6 ± 1.7 a	29.4 ± 0.7 a	0.116 ± 0.03 a	21.2 ± 2.7 a	0.114 ± 0.04 a
<i>E. hormaechei</i> R5P1	24.5 ± 2.6 a	28.6 ± 2.8 a	0.099 ± 0.03 a	23.0 ± 3.4 a	0.104 ± 0.03 a
<i>E. hormaechei</i> R6A1	23.3 ± 3.7 a	26.6 ± 5.0 a	0.093 ± 0.01 a	26.0 ± 6.3 a	0.101 ± 0.02 a
<i>Bacillus safensis</i> R6P1	22.3 ± 1.3 a	26.7 ± 1.8 a	0.121 ± 0.02 a	20.0 ± 2.3 a	0.115 ± 0.02 a
<i>E. xiangfangensis</i> R7A2	23.3 ± 3.3 a	29.7 ± 2.5 a	0.087 ± 0.02 a	21.6 ± 2.3 a	0.102 ± 0.03 a

Los datos representan la media ± desviación estándar de diez plantas individuales cosechadas hasta 30 días después de la inoculación. La misma letra indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de crecimiento ($p < 0.05$).

inoculado con *Glomus mosseae* (Copetta et al., 2006) y *Ocimum gratissimum* L. inoculado con *Glomus intrarradices* (Hazzoumi et al., 2017).

7.2 Efecto de bacterias endófitas aisladas de *S. rebaudiana* sobre la acumulación glucósidos de esteviol en plantas de *S. rebaudiana*

En plantas inoculadas con *Enterobacter hormaechei* H2A3, hubo un aumento significativo con respecto a plantas no inoculadas en las concentraciones de GE total (Fig. 4A), rebaudiósido A (Fig. 4B) y esteviósido (Fig. 4C), con valores de 2,2, 2,2 y 2,1 veces más, respectivamente. La misma tendencia se encontró con la inoculación con *E. hormaechei* H5A2, donde las concentraciones de SG total, rebaudiósido A y esteviósido aumentaron significativamente en 1,5, 1,5 y 1,4 veces más en comparación con las de las plantas no inoculadas. La inoculación con *E. bacterium* H7A1 no incrementó significativamente la concentración de los metabolitos evaluados en relación a las plantas no inoculadas, pero fue similar a la encontrada en plantas inoculadas con *E. hormaechei* H5A2. Las plantas inoculadas con otras bacterias no presentaron cambios significativos en la concentración de los glucósidos (Fig. 4).

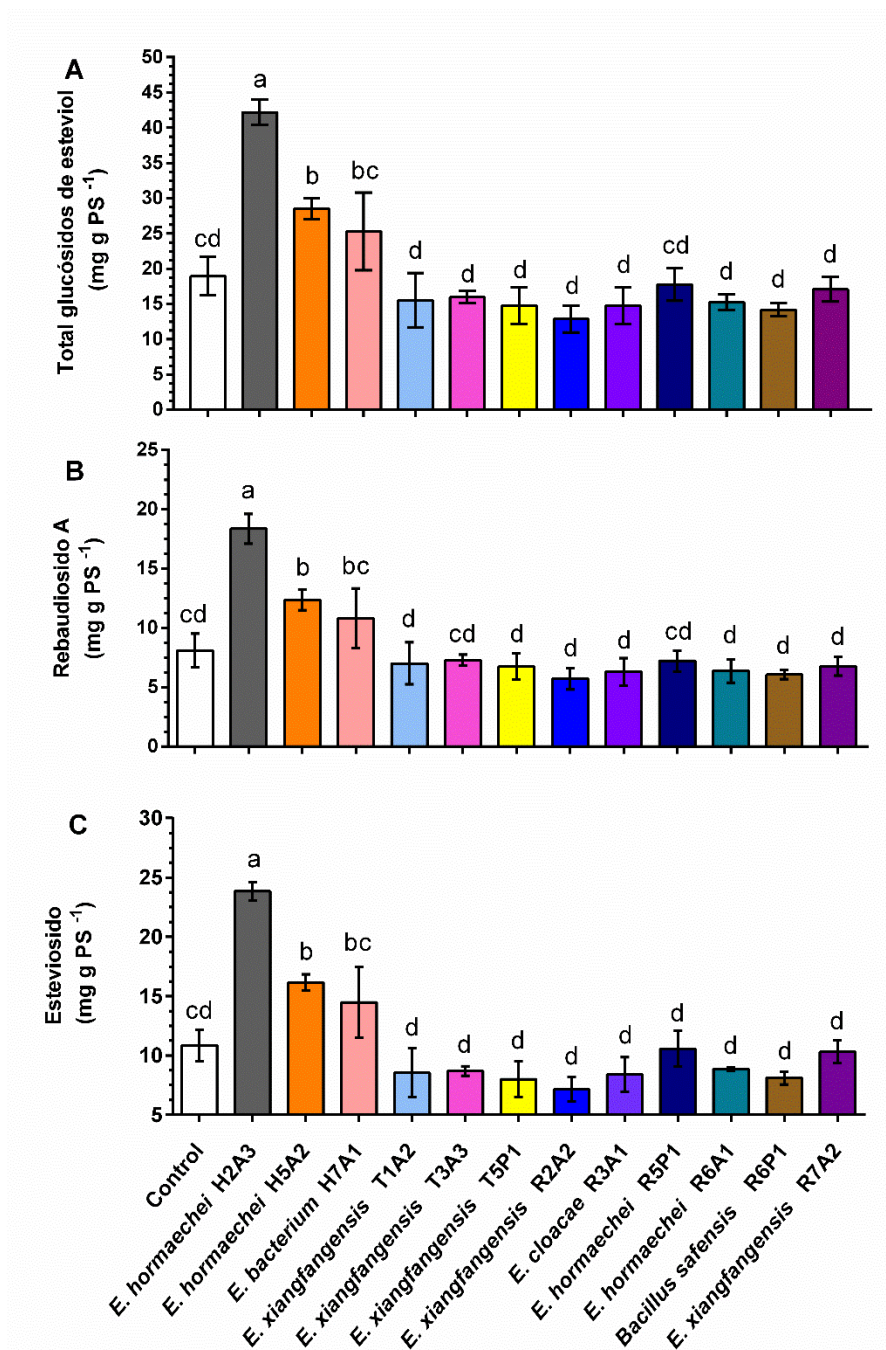


Figura 4. Concentración de glucósidos de esteviol en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con bacterias endófitas. Glucósidos de esteviol total (A), Rebaudiósido A (B), Esteviósido (C). Las barras representan la media \pm DS de cuatro réplicas biológicas. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Estudios previos en otras especies como: *Oryza sativa* (Andreozzi et al., 2019; Balachandar et al., 2006), *Beta vulgaris* L (Shi et al., 2010), *Artemisia annua* (Li et al., 2012; Tripathi et al., 2020), *Catharanthus roseus* (Tiwari et al., 2013), *Salvia miltiorrhiza* (Yan et al., 2014), *Fragaria ananassia* (Guerrero-Molina et al., 2014), *Glycine max* (Asaf et al., 2017), *Glycyrrhiza uralensis* F (Li et al., 2018), *Lycoris radiata* (Liu et al., 2020) y *Camellia oleifera* (Xu et al., 2020), indican que las bacterias pueden tener un efecto diferencial en la promoción del crecimiento de las plantas o en la biosíntesis de metabolitos secundarios, similar a lo que se encontró este trabajo. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte donde se observa el efecto de bacterias endófitas de *S. rebaudiana* como estrategia para mejorar su crecimiento o acumulación de sus metabolitos secundarios. Previamente, Vafadar et al. (2014), informaron que bacterias aisladas de la rizosfera (*Bacillus polymixa*, *Pseudomonas putida* y *Azotobacter chroococcum*) e inoculadas en plantas de *S. rebaudiana* aumentaron significativamente la biomasa de raíces y brotes, así como el contenido de esteviósido, clorofila y en el contenido de N,P y K. Kilam et al. (2015), reportaron que *A. chroococcum* mejora el crecimiento, la actividad antioxidante y el contenido de glucósidos de esteviol de las plántulas de *S. rebaudiana* en condiciones *in vitro*.

Por otra parte, se han reportado varios hongos, incluidos *Glomus intrarradises*, *Piriformospora indica*, *Rhizoglomus irregulare* y *Rizophagus intraradices*, como otros microorganismos inoculantes de *S. rebaudiana*, y los resultados demostraron que tienen la capacidad de mejorar el crecimiento de las plantas y la acumulación de esteviósidos (Vafadar, Amooaghaie, y Otroshy, 2014; Kilam et al., 2015; Tavarini

et al., 2018; Sarmiento-Lopez et al., 2020; Mandal et al., 2013; Mandal et al., 2015). Se ha propuesto una relación sinérgica entre bacterias y hongos para mejorar el crecimiento vegetal de *S. rebaudiana* y la acumulación de GEs (Kilam et al., 2015; Vafadar et al., 2014). Sin embargo, se sabe poco sobre el uso de bacterias endófitas para mejorar el metabolismo secundario en *S. rebaudiana*. Los hallazgos de Nowogórska y Patykowski (2015) respaldan la idea de que la inoculación secuencial con bacterias, hongos o una combinación de ambos no siempre produce efectos sinérgicos. Sin embargo, se requiere de más investigaciones sobre este tema en el futuro. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de inoculación de *S. rebaudiana* con bacterias endófitas del género *Enterobacter* como estrategia para mejorar la biosíntesis de sus metabolitos secundarios. Los resultados de este estudio indican que la síntesis de metabolitos secundarios se logra con la inoculación de bacterias endófitas sin coinoculación fúngica.

7.3 Efecto de bacterias endófitas aisladas de *S. rebaudiana* sobre la acumulación de compuesto fenólicos y flavonoides en plantas de *S. rebaudiana*

En plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con *E. hormaechei* H5A2, hubo un aumento significativo de 1,4 veces en la concentración de flavonoides en comparación con las plantas no inoculadas (Fig. 5A), mientras que la concentración de compuestos fenólicos fue similar a la de las plantas no inoculadas (Fig. 5B). La inoculación con las otras bacterias no aumentó la concentración de flavonoides y compuestos

fenólicos, mientras que la inoculación con *E. xianfangensis* R7A2 disminuyó significativamente la concentración de compuestos fenólicos.

Con base a los resultados obtenidos en el análisis de los parámetros de crecimiento y aumento de los metabolitos secundarios con la inoculación de bacterias endófitas, Las bacterias seleccionadas para continuar con este trabajo fueron *E. hormaechei* H2A3 y *E. hormaechei* H5A2. Además, se utilizó *E. xianfangensis* R7A2 como tratamiento adicional porque no mostró inducción de metabolitos ni promoción del crecimiento. Estas bacterias se utilizaron para analizar el efecto sobre los pigmentos fotosintéticos, actividad fotosintética, densidad de tricomas en las hojas, y la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de SG.

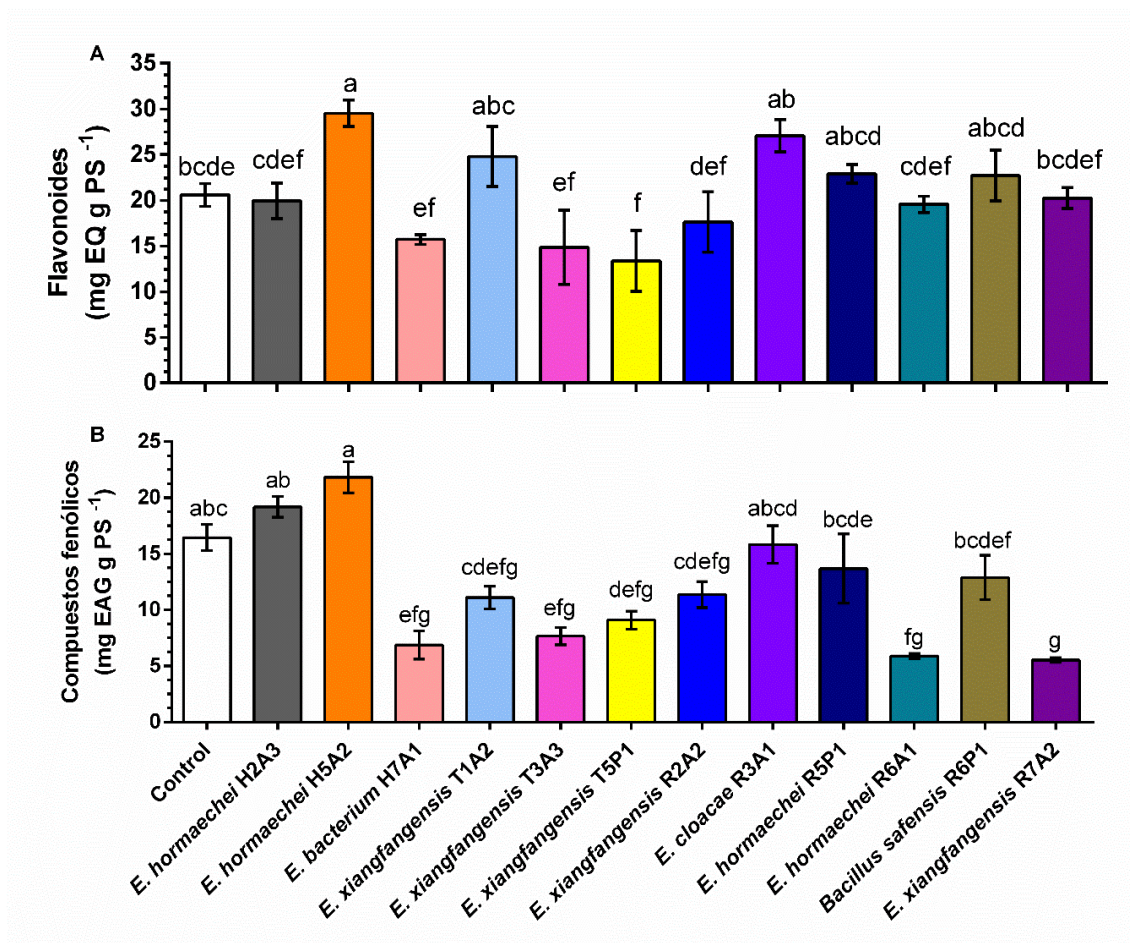


Figura 5. Concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con bacterias endófitas. Las barras representan la media \pm DS de cuatro réplicas biológicas. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

7.4. Efecto de la inoculación de *E. hormachei* H2A3, *E. hormachei* H5A2 y *E. xiangfangensis* R7A2 sobre la densidad de tricomas en hojas de *S. rebaudiana*

Fotomicrografías (SEM) de las hojas de plantas no inoculadas y plantas inoculadas con las bacterias seleccionadas mostraron tres tipos de tricomas: glandulares (G),

largos (L) y cortos (C) (Fig. 6). En las plantas inoculadas con *E. hormaechei* H2A3, las microfotografías mostraron la presencia de un mayor número de tricomas cortos, largos y glandulares en comparación con las plantas no inoculadas (Fig. 6B), mientras que en hojas de plantas inoculadas con *E. hormaechei* H5A2 y *E. xiangfangensis* R7A2, las fotomicrografías no mostraron un efecto visual sobre el número de tricomas en relación con las plantas no inoculadas (Fig. 6C-D).

En las hojas de las plantas no inoculadas e inoculadas, los tricomas cortos fueron los más abundantes (2000 a 6000 tricomas cm²), seguidos de los glandulares (1000 a 3000 tricomas cm²) y los tricomas largos (200 a 800 tricomas cm²) (Fig. 7). La densidad de tricomas mostró que *E. hormaechei* H2A3 indujo un aumento significativo en los tricomas glandulares, largos y cortos de 1,7, 4,3 y 1,5 veces más con respecto a plantas no inoculadas, respectivamente (Fig. 7A-C). Sin embargo, las bacterias *E. hormaechei* H5A2 y *E. xiangfangensis* R7A2 no indujeron ningún efecto sobre la densidad de tricomas (Fig. 7A-C).

La figura 8 muestra los resultados obtenidos del análisis de la acumulación del transcrito *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (*TTG1*) en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas y no inoculadas con las bacterias seleccionadas. Se observó que en hojas inoculadas con *E. hormaechei* H2A3 hubo una mayor acumulación (Fig. 8A) e intensidad de la banda del transcrito de *TTG1* de 2.9 veces más (Fig. 8B) comparado con las plantas no inoculadas. En contraste, en hojas de plantas inoculadas con *E. hormaechei* H5A2 y *E. xiangfangensis* R7A2 la acumulación e intensidad de la banda del transcrito no es diferente con respecto a las plantas no

inoculadas (Fig. 8 A,B). El aumento en la densidad de los tricomas glandulares, largos y cortos en *S. rebaudiana* inoculadas con *E. hormaechei* H2A3 (Fig. 7) pueden asociarse con los altos niveles de expresión del transcrito TTG1 (Fig. 8).

Con la finalidad de demostrar que los metabolitos secundarios evaluados en este trabajo se acumulan en los tricomas, se realizó un análisis de estas estructuras en hojas de *S. rebaudiana* no inoculadas e inoculadas con las bacterias seleccionadas mediante microscopia confocal (Fig. 9). Se detectó en el canal rojo se muestra la autofluorescencia de las clorofilas (Figs. 9 A-D), mientras que en el canal azul se observa la autofluorescencia de GEs, compuestos fenólicos y flavonoides en los tricomas (Figs. 9 E-H). La inoculación con *E. hormaechei* H2A3 y *E. hormaechei* H5A2 generó una mayor intensidad en la señal autofluorescente en el canal azul, particularmente en los tricomas glandulares y cortos (Figs. 9 F-G), mientras que en las plantas no inoculadas (Fig. 9E) y las inoculadas con *E. xiangfangensis* R7A2 (Fig. 9H), la señal de autofluorescencia fue menor. En particular, se exhibió una fuerte fluorescencia azul en la cavidad secretora de los tricomas glandulares y en los tricomas cortos de plantas inoculadas con *E. hormaechei* H2A3 y *E. hormaechei* H5A2 (Fig. 8N y O) en comparación con plantas no inoculadas (Fig. 8M) y aquellas inoculadas con *E. xiangfangensis* R7A2 (Fig. 8P).

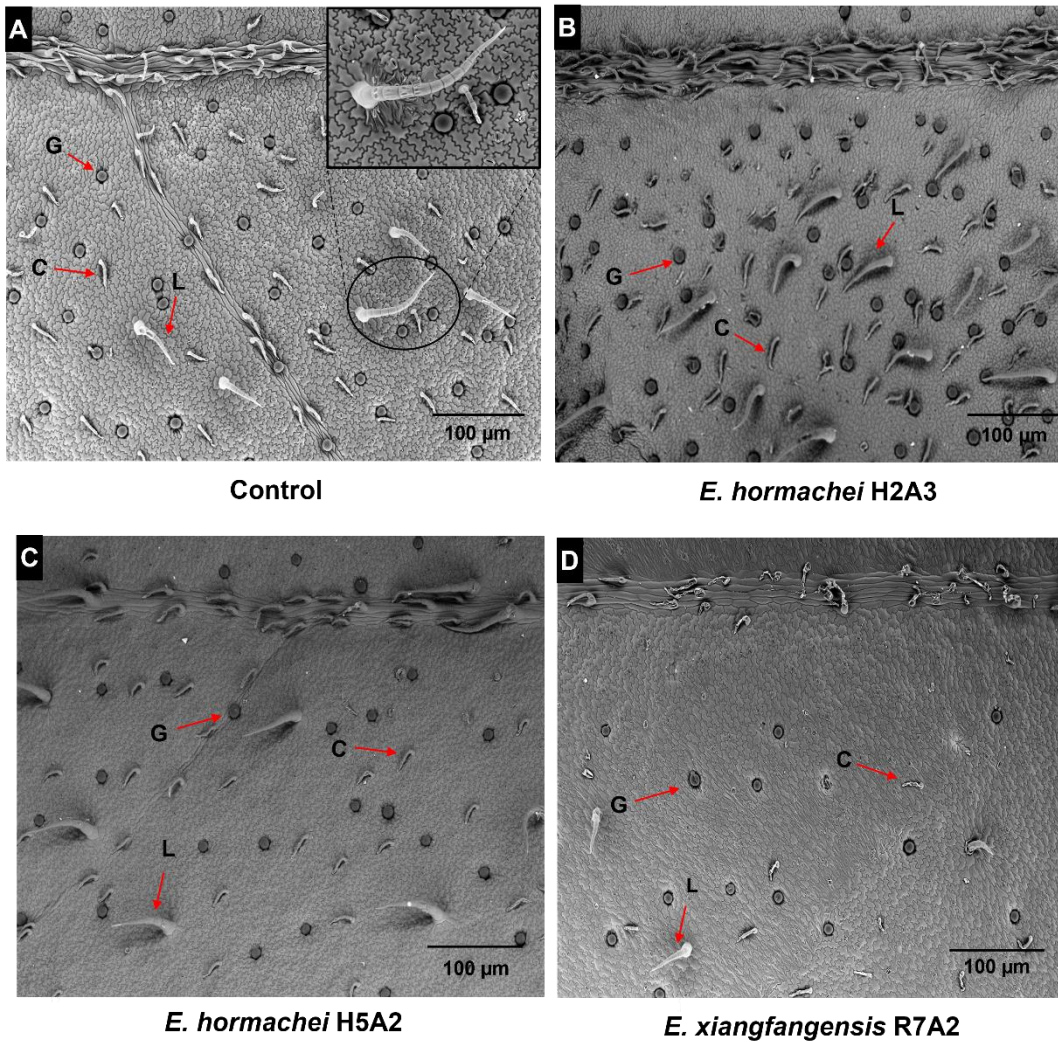


Figura 6. Tricomas glandulares (G), largos (L) y cortos (C) en hojas de *S. rebaudiana* visualizadas en microscopio electrónico de barrido de plantas control (A), inoculadas con *E. hormachei* H2A3 (B), *E. hormachei* H5A2 (C), y *E. xiangfangensis* R7A2 (D), un zoom de los tipos de tricomas (A).

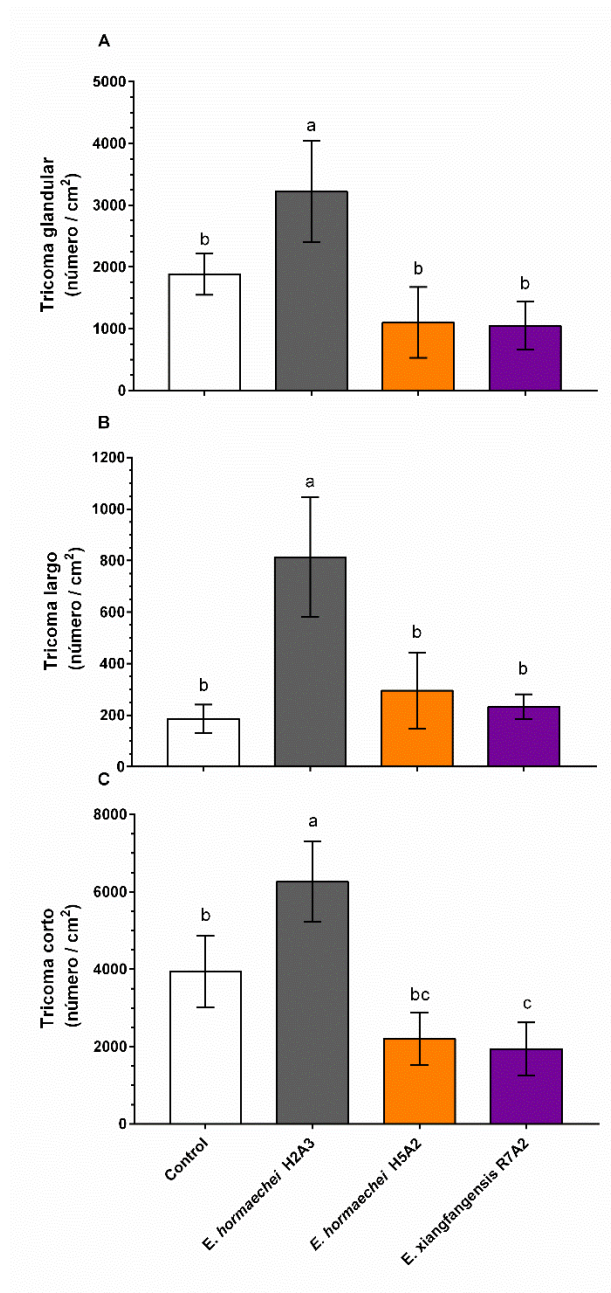


Figura 7. Densidad de tricomas en hojas de *S. rebaudiana* inoculadas con bacterias endófitas. Densidad de tricomas glandulares (a), tricomas largos (b) y tricomas cortos (c). Las barras representan la media \pm DS de cuatro réplicas biológicas. Letras diferentes indica diferencia significativa ($P < 0.05$).

Los tricomas son estructuras vegetales que acumulan metabolitos secundarios, y su presencia en las hojas de las plantas está asociada a mecanismos de defensa frente a patógenos, insectos y condiciones ambientales adversas (Champagne & Boutry, 2016; Tian et al., 2017; Werker, 2000). Los tricomas observados en las hojas de *S. rebaudiana* fueron cortos, largos y glandulares. Esta morfología de tricomas es típica de las hojas de *S. rebaudiana* (Bondarev et al., 2003; Bondarev et al., 2010; Cornara et al., 2001; Monteiro et al., 2001). Los resultados de este trabajo mostraron que la inoculación con bacterias endófitas provoca un aumento significativo en la densidad de tricomas en las hojas de *S. rebaudiana*. Esta respuesta anatómica se ha observado en otras plantas inoculadas con hongos, como *A. annua* inoculada con *R. intraradices* (Mandal et al., 2015) y *A. annua* inoculada con *Glomus macrocarpum* y *Glomus fasciculatum* (Kapoor et al., 2007).

En el presente trabajo, la inoculación con el endófito *E. hormaechei* H2A3 generó una mayor densidad de tricomas en las hojas de *S. rebaudiana*, lo que fue paralelo con una mayor concentración de GEs, compuestos fenólicos y flavonoides. Sin embargo, se realizó un análisis de Pearson entre la concentración de metabolitos secundarios y la densidad de tricomas, observando que no hay una correlación entre las variables ($R^2 < 0.53$) (Anexo 1). Estos resultados contrastan con Bondarev et al. (2010); sugieren una relación positiva entre el número de tricomas glandulares y la acumulación de SG; sin embargo, no presentaron un análisis cuantitativo de la correlación entre la acumulación de SG y la densidad de tricomas.

En otras plantas que acumulan metabolitos secundarios en tricomas, se reportó una relación entre el número de tricomas en las hojas y la acumulación de metabolitos

secundarios inducida por la inoculación con diferentes hongos. Kapoor et al. (2007) y Mandal et al. (2015b) describieron que la inoculación de hongos benéficos (*Glomus macrocarpum*, *Glomus fasciculatum* y *Rhizophagus intraradices*) en plantas de *A. annua* mejoró la acumulación de artemisinina en los tricomas y reforzó la idea de que las interacciones beneficiosas, incluidas las bacterias endófitas, inducen varias respuestas bioquímicas y fisiológicas en beneficio de los cultivos.

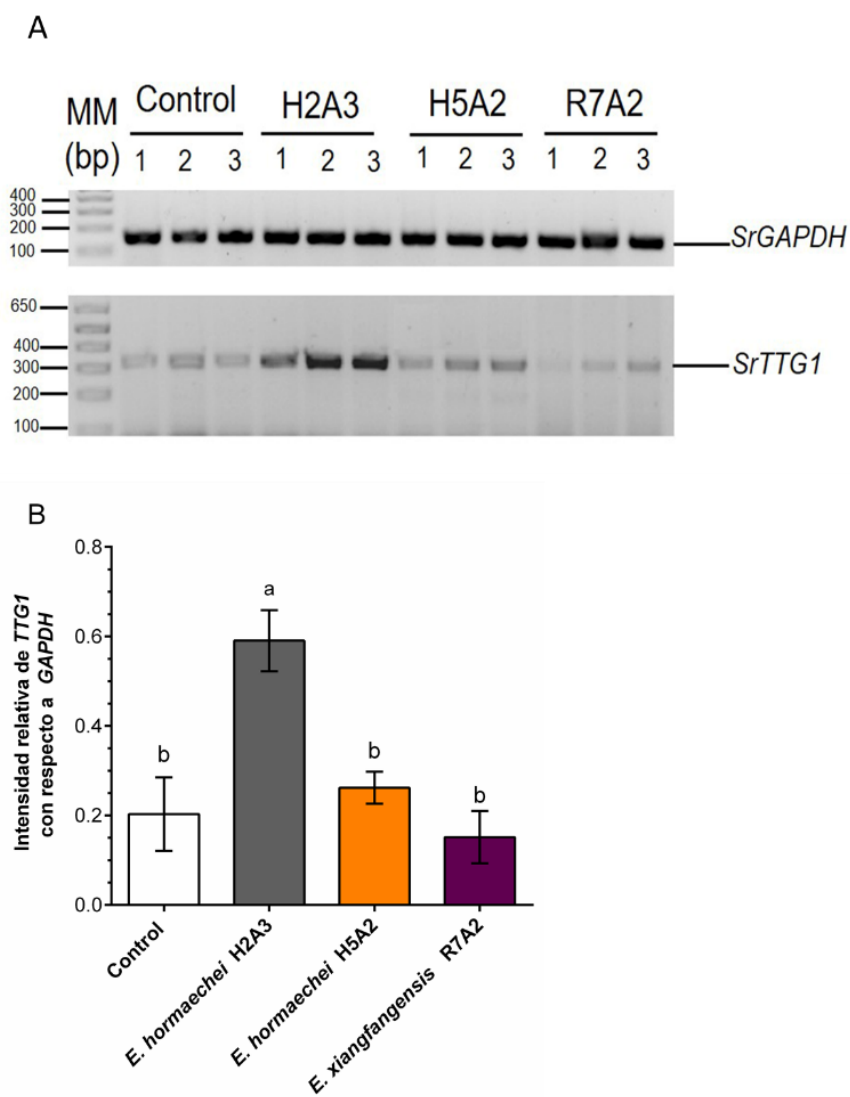


Figura 8. Análisis de expresión del gen *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (*TTG1*) en hojas de *S. rebaudiana* inoculadas con bacterias endófitas. Acumulación de transcrito de *TTG1* (A) e Intensidad relativa de la acumulación del transcrito *TTG1* (B) en hojas de *S. rebaudiana* inoculadas con *E. hormaechei* H2A3, *E. hormaechei* H5A2 y *E. xiangfangensis*. *GADPH* se utilizó como gen control interno. Las barras representan la media \pm DS de tres réplicas a 30 días postinoculación. Letras diferentes indica diferencia significativa ($P < 0.05$).

El uso de herramientas de microscopía confocal utilizadas en este trabajo permitió la localización de los GEs, compuestos fenólicos y flavonoides en los tricomas de las hojas de *S. rebaudiana* al detectar su autofluorescencia, así como se ha empleado para otras especies vegetales (Agati et al., 2002; Talamond et al., 2015; Vidot et al., 2019). Esta se basa en la autofluorescencia de los metabolitos cuando son excitados por un haz de luz, y esta fluorescencia se caracteriza por bandas de emisión en los espectros azul (440 nm), verde (520 nm) y rojo (690 nm) (Buschmann et al., 2001; García-Plazaola et al., 2015). En este trabajo se encontró autofluorescencia en el espectro azul, indicativo de la acumulación de estos metabolitos en tricomas de *S. rebaudiana* inoculados por *E. hormaechei* H2A3 y *E. hormaechei* H5A2. En las hojas de otras plantas, los metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos, compuestos fenólicos y flavonoides se han localizado por su emisión de autofluorescencia en tejidos epidérmicos y haces vasculares (Agati et al., 2002; Conéjéro et al., 2014; Hutzler et al., 1998; Talamond et al., 2015). Recientemente, Sarmiento-López et al. (2021) reportaron que plantas de *S. rebaudiana* colonizadas con el hongo micorrícico arbuscular *R. irregularis* mostraron fluorescencia en los tricomas y que esto se relacionó con el incremento de compuestos fenólicos y acumulación de flavonoides. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que se produce un mecanismo similar para la inducción y acumulación de metabolitos en las interacciones tanto de bacterias endófitas como de hongos con plantas. Es bien sabido que los metabolitos secundarios como los terpenos y los compuestos fenólicos tienen una función importante al activar resistencia sistémica, lo que permite que las plantas respondan de manera más

efectiva a los ataques de patógenos y herbívoros (Cervantes-Gómez et al., 2016; Pozo & Azcón-Aguilar, 2007; Santos et al., 2017). En este trabajo se observó un aumento significativo en el desarrollo de tricomas, así como en la acumulación de GEs y flavonoides, lo que puede estar relacionado con la inducción de resistencia sistémica por la inoculación de bacterias endófitas en plantas de *S. rebaudiana* de manera similar a lo observado en otras especies de plantas bajo diferentes interacciones planta-microorganismo (Kapoor et al., 2017; Mandal et al., 2015). Sin embargo, en *S. rebaudiana*, se necesitan más estudios experimentales para probar esta hipótesis.

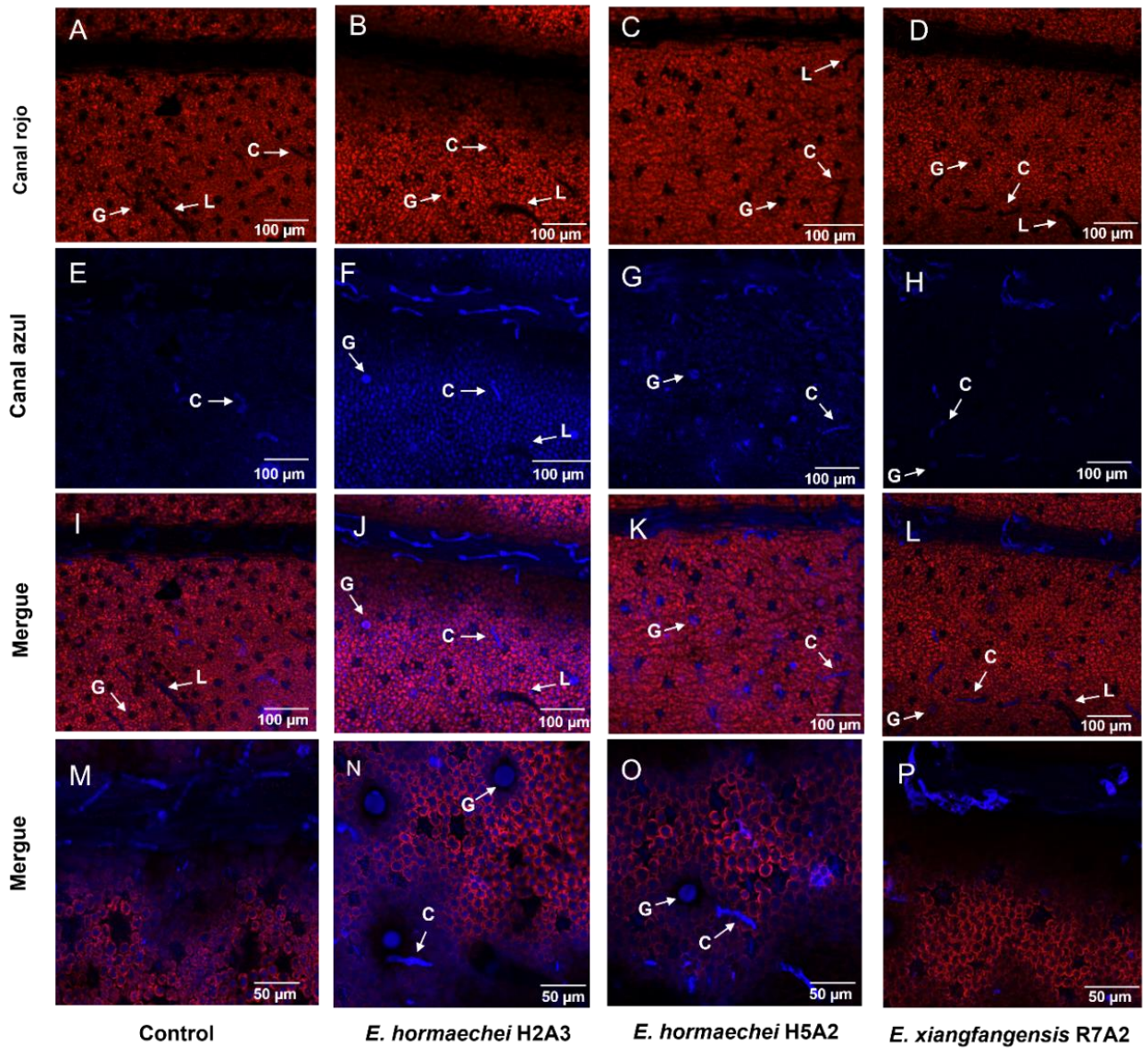


Figura 9. Localización de glucósidos de esteviol, compuestos fenólicos y flavonoides en tricomas de *S. rebaudiana*. Autofluorescencia de clorofila (canal rojo) Panel a-d. Autofluorescencia de los metabolitos secundarios (canal azul). Panel e-h. Colocalización de clorofila y autofluorescencia de los metabolitos secundarios, Panel i - l; Los paneles m-p corresponden a una ampliación de tricomas en plantas no inoculadas e inoculadas con *E. hormaechei* H2A3, *E. hormaechei* H5A2 y *E. xiangfangensis* R7A2, respectivamente. G, tricoma glandular; L, tricoma largo; y C, tricoma corto.

7.5 Efecto de la inoculación de bacterias endófitas sobre la expresión diferencial de genes biosintéticos de GE en plantas de *S. rebaudiana*.

Los resultados de la expresión diferencial de los genes de biosíntesis de GEs en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con bacterias endófitas se presentan en la Figura 10. El nivel de transcripción del gen *KO* aumentó significativamente con las bacterias *E. hormaechei* H5A2 (21,3 veces) y *E. xiangfangensis* R7A (42,3 veces) en comparación con el inoculado con *E. hormaechei* H2A3 y el de las plantas no inoculadas (Fig. 10A). El nivel de transcripción de *KAH* aumentó significativamente 52,3 veces con la inoculación con *E. hormaechei* H5A2 (Fig. 10B). Los niveles de transcripción del gen *UGT74G1* aumentaron significativamente con la inoculación con *E. hormaechei* H2A3 (11,3 veces) y *E. hormaechei* H5A2 (17,2 veces), mientras que *E. xiangfangensis* R7A aumentó (6,0 veces) pero no fue significativo con respecto a la de las plantas no inoculadas (Fig. 10C). Finalmente, los niveles de transcripción del gen *UGT76G1* aumentaron significativamente 3,2 veces con la inoculación con *E. hormaechei* H2A3 (Fig. 10D).

La kaureno oxidasa y la kaureno hidroxilasa son enzimas importantes en la biosíntesis de los GEs y representan el principal punto de ramificación en el catabolismo de la columna central (esteviol) de los GEs.

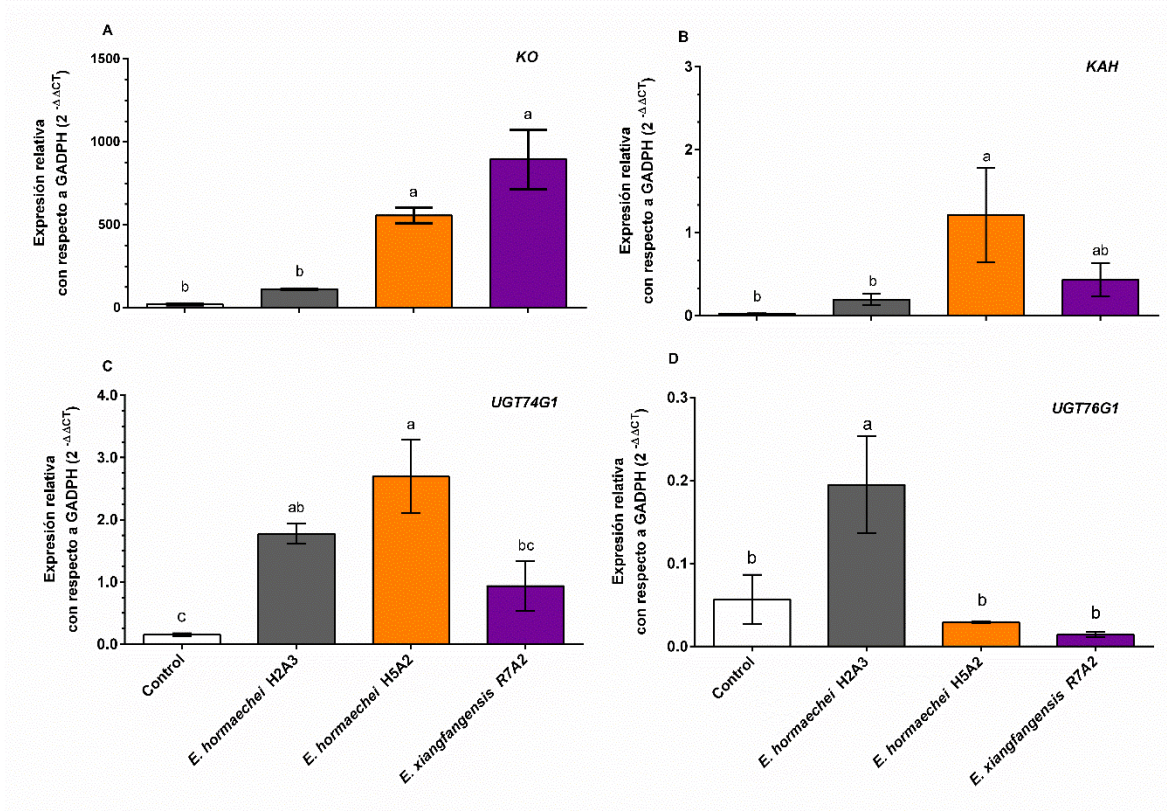


Figura 10. Análisis de expresión relativa de genes clave en la vía de biosíntesis de glucósidos de esteviol en hojas de *S. rebaudiana* inoculadas con bacterias endófitas. *KO* (a), *KAH* (b), *UGT74G1* (c), *UGT76G1* (d). *GAPDH* se utilizó como gen de referencia. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas recolectadas 30 días después de la inoculación. *Letras diferentes indica una diferencia significativa ($P < 0.05$).

De hecho, el esteviol es glicosilado por la conjugación de glucosa por UDP-glicosiltransferasas (UGT), donde *UGT74G1* es responsable de sintetizar esteviósido, mientras que *UGT76G1* es necesaria para producir rebaudiósido A (Brandle & Telmer, 2007). Los resultados del análisis de expresión génica de la ruta de biosíntesis de los GEs en hojas de *S. rebaudiana* mostraron que el gen *KO* estaba sobreexpresado con la inoculación con *E. hormaechei* H5A2 y *E. xiangfangensis* R7A2; el gen *KAH* estaba sobreexpresado con *E. hormaechei* H5A2. Asimismo, el gen *UGT74G1* aumentó su expresión con la inoculación de *E. hormaechei* H2A3 y *E. hormaechei* H5A2, lo que fue consistente con la alta concentración de esteviósido, mientras que el gen *UGT76G1* aumentó su expresión con la inoculación con *E. hormachei* H2A3, lo que puede estar directamente relacionado con la concentración de rebaudiósido A determinada en hojas de *S. rebaudiana*.

La inoculación con *E. hormachei* H5A2 también estimuló la acumulación de rebaudiósido A, pero no se reflejó en la expresión de genes implicados en la síntesis de los GEs. Aunque los niveles de transcripción en las plantas inoculadas con *E. hormachei* H5A2 fueron bajos, es posible que la actividad enzimática de las (UDP)-glicosiltransferasas sintetizadas por el gen *UGT76G1* sea similar a la de las plantas inoculadas con *E. hormachei* H2A3. Sin embargo, son necesarios más estudios complementarios de actividad enzimática para confirmar esta hipótesis.

Previamente, otros microorganismos aislados de la rizosfera e inoculados en plantas de *S. rebaudiana* mostraron mejoras en la acumulación de GE, y el efecto

se asocia con la expresión de sus genes de biosíntesis. Kilam et al. (2015), Mandal et al. (2013), Tavarini et al. (2018), y Vafadar et al. (2014), utilizaron *Rhizophagus fasciculatus*, *Bacillus polymixa*, *Pseudomonas putida*, *Azotobacter chroococcum*, *Glomus intraradices*, *Piriformospora indica* y *Rhizogloium irregulare*, que generaron un aumento de GS y se asociaron con la expresión de los genes *KO*, *KS*, *KHA*, *UGT74G1* y *UGT76G1*. Por otra parte, se reporta que las bacterias endófitas aumentan el contenido de metabolitos secundarios y la expresión de genes relacionados con su biosíntesis. Por ejemplo, las especies de *Pseudonocardia* inducen la acumulación de artemisinina en *Artemisia annua* (Li et al., 2012), y *Acinetobacter sp* induce la acumulación de ácido abscísico (ABA) y ácido salicílico (SA) en *Atractylodes lancea* (Wang et al., 2014).

Los hallazgos de este trabajo muestran que el uso de las bacterias endófitas *E. hormachei* H2A3 y *E. hormachei* H5A2 puede considerarse una estrategia biotecnológica para incrementar el contenido de metabolitos secundarios en *S. rebaudiana*.

7.6 Efecto de la inoculación de bacterias endófitas sobre la acumulación de pigmentos fotosintéticos en hojas de *S. rebaudiana*.

En plantas inoculadas con las bacterias seleccionadas *E. hormaechei* H2A3, *E. hormaechei* H5A2 y *E. xiangfangensis* R7A2 no se observaron cambios significativos sobre el contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides (Fig. 11). En el caso de la clorofila a se observaron valores entre 7.2 - 10.7 mg / PF de hoja (Fig. 11 A); para clorofila b valores entre 2.5 – 3.52 mg / PF de

hoja (Fig. 11 B), y en cuanto al contenido total de clorofila, valores entre 9.7- 14.2 mg / PF de hoja (Fig. 11 C); finalmente se observó un contenido de carotenoides entre 1.3 – 1.9 mg / PF de hoja (Fig. 11 D).

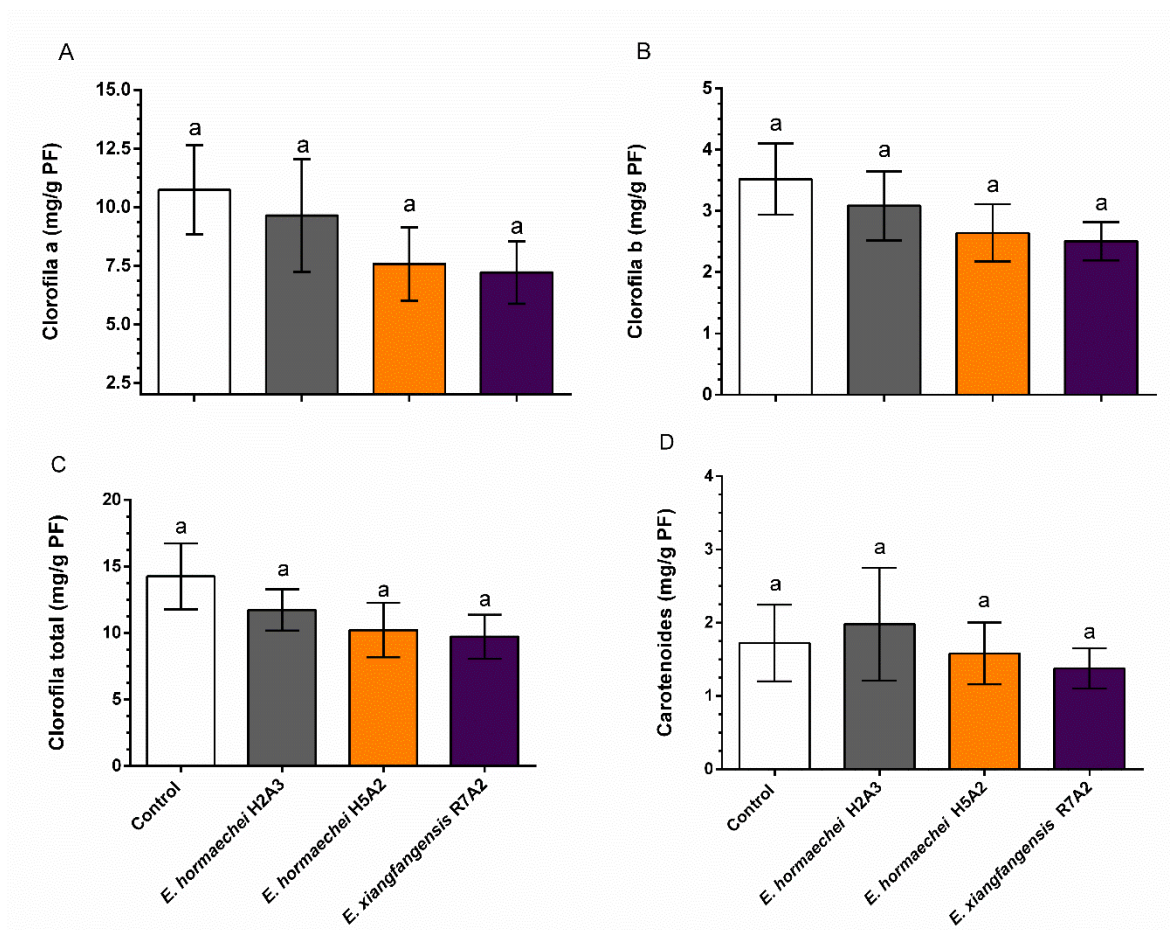


Figura 11. Análisis de pigmentos fotosintéticos en hojas de plantas de *S. rebaudiana*. Contenido de Clorofila a (A), Clorofila b (B), Clorofila total (C) y Carotenoides (D) de plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con *E. hormaechei* H2A3, *E. hormaechei* H5A2 y *E. xiangfangensis* R7A2. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres réplicas recolectadas 30 días después de la inoculación. Letras iguales indica que no hay diferencias significativas (P<0.05).

Los pigmentos fotosintéticos son moléculas importantes en el proceso de fotosíntesis de las plantas durante distintas etapas de crecimiento y desarrollo, además estos están relacionados con la respuesta de las plantas frente a factores bióticos y abióticos (Kan et al., 2017; Maayan et al., 2008). En el presente trabajo se evidencia que la inoculación con las bacterias seleccionadas no genera cambios estadísticamente significativos sobre la concentración de clorofilas y carotenoides con respecto a las plantas no inoculadas.

En la literatura revisada no se encontraron reportes del efecto de bacterias endófitas sobre los pigmentos fotosintéticos en plantas *S. rebaudiana*. Sin embargo existen reportes donde se aumenta la concentración de clorofilas y carotenoides con la inoculación de microorganismos tipo rizosféricos (Sarmiento-López et al., 2020; Mandal et al., 2013; Vafadar et al., 2014). Asaf et al., 2017, reporta el uso del endófito *Bacillus subtilis* en plantas de soya observando que no genera un aumento sobre clorofilas, lo que fue similar a los resultados obtenidos en este trabajo.

7. 7 Efecto de la inoculación de bacterias endófitas sobre la actividad fotosintética en hojas de *S. rebaudiana*

En plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con las bacterias *E. hormaechei* H2A3, *E. hormaechei* H5A2 y *E. xiangfangensis* R7A2 no se observaron cambios significativos sobre los parámetros evaluados como actividad fotosintética (Fig. 12). En el caso de la fluorescencia mínima (F_o) los valores fueron entre 180 – 194 (Fig. 12A); con respecto a fluorescencia máxima (F_m) se observaron valores entre 736 – 810 (Fig. 12B); la eficiencia máxima del fotosistema PSII (F_v/F_m) fue entre 0.75 –

0.77 (Fig. 12C) y finalmente, en el potencial de la eficiencia fotoquímica (F_v/F_o) se observaron valores entre 3.03 – 3.34 (Fig. 12D)

El proceso de fotosíntesis se inicia con la captura de fotones por parte de los pigmentos antena en los centros de reacción de los fotosistemas PSI y PSII, donde pueden determinar los parámetros de emisión de fluorescencia mínima y máxima (F_o y F_m), la eficiencia cuántica del PSII (F_v/F_m) y el potencial de la eficiencia fotoquímica (F_v/F_v) (Baker, 2008). La determinación de la actividad fotosintética medida como la fluorescencia de las clorofilas, permite obtener información a nivel fotoquímico del proceso de fotosíntesis en respuesta a diferentes condiciones de estrés (Harbinson, 2013).

En este trabajo se evidencia que la inoculación con las bacterias endófitas seleccionadas no genera diferencias estadísticamente significativas en los parámetros fotosintéticos evaluados comparado con las plantas no inoculadas. En la literatura consultada no se encontraron reportes sobre el efecto de bacterias endófitas sobre la actividad fotosintética en *S. rebaudiana*. Sin embargo, recientemente Sarmiento-López et al. (2020) reporta que la inoculación con una micorriza ayuda a compensar el estrés nutricional aumentando el rendimiento fotoquímico del fotosistema PSII.

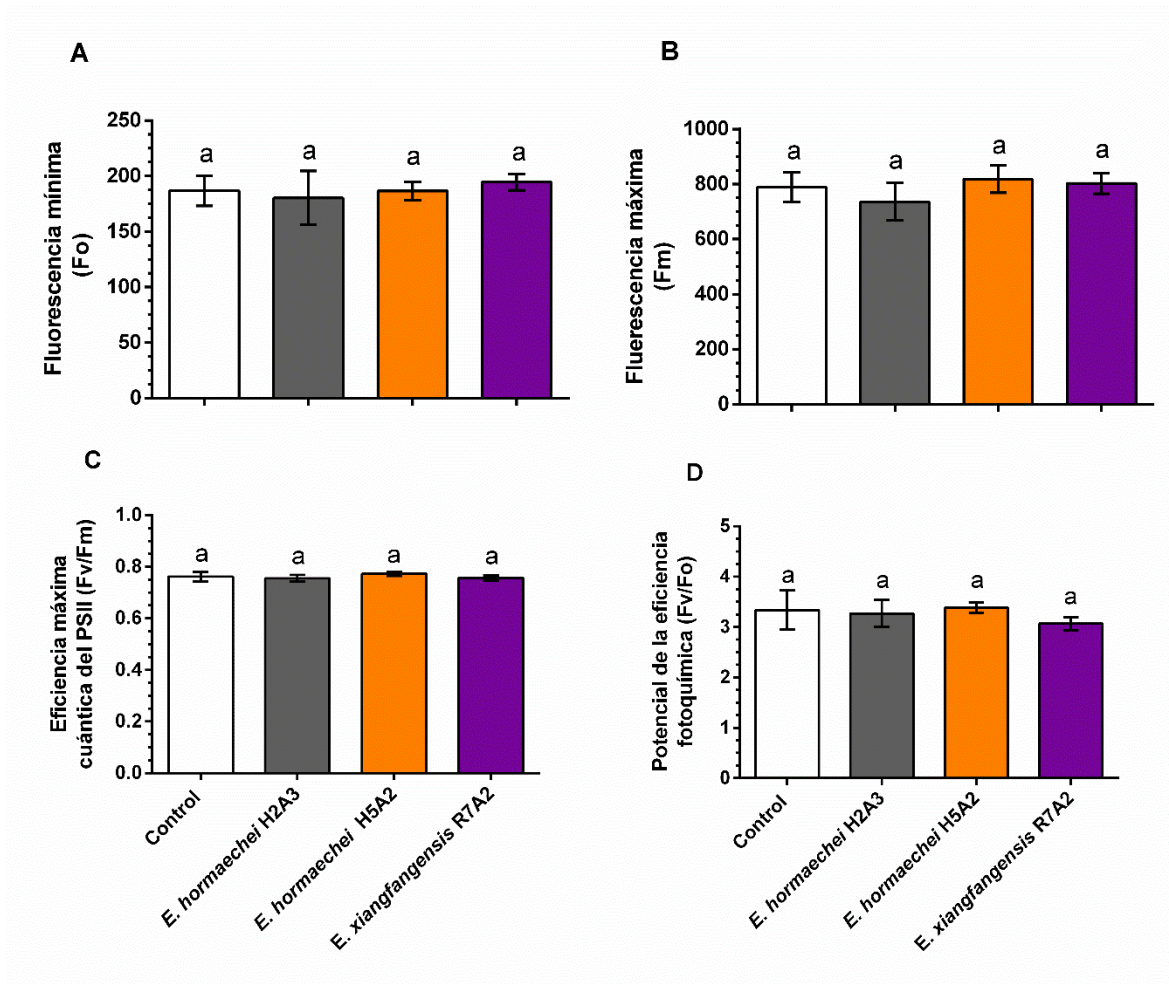


Figura 12. Análisis de la actividad fotosintética en hojas de plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con *E. hormaechei* H2A3, *E. hormaechei* H5A2 y *E. xiangfangensis* R7A2. Fluorescencia mínima (Fo) (A), fluorescencia máxima (Fm) (B), eficiencia máxima cuántica del PSII (Fv/Fm) (C) y potencial de la eficiencia fotoquímica (Fv/Fo) (D). Barras representan la media \pm desviación estándar de tres réplicas recolectadas 30 días después de la inoculación. Letras iguales indica que no hay diferencias significativas ($P < 0.05$).

VIII. CONCLUSIONES

No se observó actividad promotora del crecimiento vegetal en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con las 12 bacterias aisladas de hoja, raíz y tallo de la misma planta.

El contenido de esteviósido y rebaudiosido A en plantas de *S. rebaudiana* se vio favorecido con la inoculación de *Enterobacter hormaechei* H2A3, *Enterobacter hormaechei* H5A2 y *Enterobacter bacterium* H7A1.

La inoculación de las plantas de *S. rebaudiana* con *Enterobacter hormaechei* H5A2 generó un aumento significativo en el contenido de flavonoides y las bacterias *Enterobacter hormaechei* H2A3 y *Enterobacter hormaechei* H5A2 generaron un aumento en el contenido de compuestos fenólicos, pero no fueron diferentes estadísticamente respecto al control.

La inoculación de las plantas de *S. rebaudiana* con *Enterobacter hormaechei* H2A3 aumentó la densidad de tricomas glandulares y tricomas no glandulares, tipo largos y cortos, relacionándose con altos niveles del transcrito TTG1. Además, se logró evidenciar mediante microscopia confocal que la acumulación de los glucósidos de esteviol, compuestos fenólicos y flavonoides se da en los tricomas glandulares y cortos.

La expresión de los genes *KO*, *KHA* y *UGT74G1* en las plantas de *S. rebaudiana*, se indujo con la inoculación de *Enterobacter hormaechei* H2A3, *Enterobacter hormaechei* H5A2 y *Enterobacter xiangfangensis* R7A2, mientras que en el caso del gen *UGT76G1* solo se observó inducción con la inoculación de *Enterobacter hormaechei* H2A3.

La inoculación de *Enterobacter hormaechei* H2A3, *Enterobacter hormaechei* H5A2 y *Enterobacter xiangfangensis* R7A2 en plantas de *S. rebaudiana* no generó efecto sobre los pigmentos fotosintéticos y sobre la actividad fotosintética con respecto a plantas control.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Ardanov, P., Sessitsch, A., Häggman, H., Kozyrovska, N., Pirttilä, A. M (2012). Methylobacterium-induced endophyte community changes correspond with protection of plants against pathogen attack. *PLoS ONE* 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046802>.
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221 (February), 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Agarwal, H., Dowarah, B., Baruah, P. M., Bordoloi, K. S., Krishnatreya, D. B., Agarwala, N. (2020). Endophytes from *Gnetum gnemon* L. can protect seedlings against the infection of phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* as well as promote plant growth in tomato. *Microbiological Research*, 238(April), 126503. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126503>
- Andreozzi, A., Prieto, P., Mercado-Blanco, J., Monaco, S., Zampieri, E., Romano, S., Bianco, C. (2019). Efficient colonization of the endophytes *Herbaspirillum huttiense* RCA24 and *Enterobacter cloacae* RCA25 influences the physiological parameters of *Oryza sativa* L. cv. Baldo rice. *Environmental Microbiology*, 21(9), 3489–3504. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14688>
- Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., Sossa, Y. K. E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de

Eucalyptus nitens. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 338–347.
[https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70093-8](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70093-8)

Asaf, S., Khan, M. A., Khan, A. L., Waqas, M., Shahzad, R., Kim, A. Y., Lee, I. J. (2017). Bacterial endophytes from arid land plants regulate endogenous hormone content and promote growth in crop plants: An example of *Sphingomonas* sp. and *Serratia marcescens*. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 31–38. <https://doi.org/10.1080/17429145.2016.1274060>

Ashajyothi, M., Kumar, A., Sheoran, N., Ganesan, P., Gogoi, R., Subbaiyan, G. K., Bhattacharya, R. (2020). Black pepper (*Piper nigrum* L.) associated endophytic *Pseudomonas putida* BP25 alters root phenotype and induces defense in rice (*Oryza sativa* L.) against blast disease incited by *Magnaporthe oryzae*. *Biological Control*, 143(July 2019), 104181. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104181>

Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>

Balachandar, D., Sandhiya, G. S., Sugitha, T. C. K., Kumar, K. (2006). Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(7), 707–712. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9094-0>

Barroso, M. R., Martins, N., Barros, L., Antonio, A. L., Rodrigues, M. Â., Sousa, M.

- J., Ferreira, I. C. F. R. (2018). Assessment of the nitrogen fertilization effect on bioactive compounds of frozen fresh and dried samples of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Food Chemistry*, 243(August 2017), 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.137>
- Berg, G. (2009). Plant – microbe interactions promoting plant growth and health : perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 11–18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M. R., Navarro, M. (2014). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.012>
- Ceunen, S., Geuns, J. M. C. (2013). Spatio-temporal variation of the diterpene steviol in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. *Phytochemistry*, 89, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.01.007>
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J. (2002). estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods.

Journal of Food and Drug Analysis, 10(3), 178–182. <https://doi.org/N/A>

- Cheffi Azabou, M., Gharbi, Y., Medhioub, I., Ennouri, K., Barham, H., Tounsi, S., Triki, M. A. (2020). The endophytic strain *Bacillus velezensis* OEE1: An efficient biocontrol agent against *Verticillium wilt* of olive and a potential plant growth promoting bacteria. *Biological Control*, 142(July 2019). <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104168>
- Chen, C., Cao, Z., Li, J., Tao, C., Feng, Y., Han, Y. (2020). A novel endophytic strain of *Lactobacillus plantarum* CM-3 with antagonistic activity against *Botrytis cinerea* on strawberry fruit. *Biological Control*, 148(19), 104306. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104306>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Cruz Martínez, M. (2015). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. UNA REVISIÓN. *Cultivos Tropicales*, 36, 5–15.
- Dassanayake, M., Larkin, J. C. (2017). Making plants break a sweat: The structure, function, and evolution of plant salt glands. *Frontiers in Plant Science*, 8(March), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00406>
- Dhouib, H., Zouari, I., Ben Abdallah, D., Belbahri, L., Taktak, W., Triki, M. A., Tounsi,

- S. (2019). Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against *Verticillium wilt* disease. *Biological Control*, 139(July), 104092. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104092>
- Duran, S; Rodriguez, M. del P.; Córdón, K.; Record, J. (2012). Stevia (*Stevia rebaudiana*), non-caloric natural sweetener. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(4), 203–206. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000400015>
- Frank, A. C., Guzmán, J. P. S., Shay, J. E. (2017). Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040070>
- Goyal, S. K., Goyal, R. K. (2010). Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Internacional Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(February), 1–10. <https://doi.org/10.3109/09637480903193049>
- Guerrero-Molina, M. F., Lovaisa, N. C., Salazar, S. M., Díaz-Ricci, J. C., Pedraza, R. O. (2014). Elemental composition of strawberry plants inoculated with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* REC3, assessed with scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray analysis. *Plant Biology*, 16(4), 726–731. <https://doi.org/10.1111/plb.12114>
- Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J., Poole, P. S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Soil*, 245(1), 133–143.
- Harbinson, J. (2013). Improving the accuracy of chlorophyll fluorescence measurements. *Plant, Cell and Environment*, 36(10), 1751–1754.

- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Elsas, J. D. van. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- Hartman, K., Tringe, S. G. (2019). Interactions between plants and soil shaping the root microbiome under abiotic stress. *Biochemical Journal*, 476(19), 2705–2724. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180615>
- Humphrey, T. V., Richman, A. S., Menassa, R., Brandle, J. E. (2006). Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis. *Plant Molecular Biology*, 61(1–2), 47–62. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-5966-9>
- Jarma Orozco, A., Espitia Camacho, M. (2010). Stevioside Synthesis in *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bert). 15, 289–294.
- Jha, P. N., Gupta, G., Jha, P., Mehrotra, R. (2013). Association of rhizospheric / endophytic bacteria with plants: a potential gateway to sustainable agriculture. *Greener Journal of Agricultural Sciences*, 3(2), 73–84. <https://doi.org/10.15580/GJAS.2013.2.010313354>

- Jiao, R., Munir, S., He, P., Yang, H., Wu, Y., Wang, J., He, Y. (2019). Biocontrol potential of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 against tobacco powdery mildew and its growth promotion. *Biological Control*, 143, 104160. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104160>
- Kan, X., Ren, J., Chen, T., Cui, M., Li, C., Zhou, R., Yin, Z. (2017). Effects of salinity on photosynthesis in maize probed by prompt fluorescence, delayed fluorescence and P700 signals. *Environmental and Experimental Botany*, 140(June), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.019>
- Kandel, S., Joubert, P., Doty, S. (2017). Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms*, 5(4), 77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040077>
- Kaur, G., Reddy, M. S. (2014). Role of phosphate-solubilizing bacteria in improving the soil fertility and crop productivity in organic farming. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(4), 549–564. <https://doi.org/10.1080/03650340.2013.817667>
- Kaushik, R., Narayanan, P., Vasudevan, V., Muthukumaran, G., Antony, U. (2010). Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 47(1), 27–33. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0011-7>
- Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Saqlan, S. M., Rasheed, M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop

Production. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(1), 48–58.

Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., Lee, I. J. (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*, 52(8), 689–695. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4002-7>

Kilam, D., Saifi, M., Abdin, M. Z., Agnihotri, A., Varma, A. (2015). Combined effects of *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* enhance plant growth, antioxidant potential and steviol glycoside content in *Stevia rebaudiana*. *Symbiosis*, 66(3), 149–156. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0347-x>

Kilam, D., Saifi, M., Abdin, M. Z., Agnihotri, A., Varma, A. (2017). Endophytic root fungus *Piriformospora indica* affects transcription of steviol biosynthesis genes and enhances production of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 97, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.12.003>

Kim, I. S., Yang, M., Lee, O. H., Kang, S. N. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5), 1328–1332. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.003>

Kim, K. K., Sawa, Y., Shibata, H. (1996). Hydroxylation of ent-kaurenoic acid to steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni - Purification and partial characterization of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2, 223–230. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0336>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.015>
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132(3), 1121–1132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.140>
- Li, J., Zhao, G. Z., Varma, A., Qin, S., Xiong, Z., Huang, H. Y., Li, W. J. (2012). An Endophytic *Pseudonocardia* species induces the production of Artemisinin in *Artemisia annua*. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051410>
- Li, L., Mohamad, O. A. A., Ma, J., Friel, A. D., Su, Y., Wang, Y., Li, W. (2018). Synergistic plant–microbe interactions between endophytic bacterial communities and the medicinal plant *Glycyrrhiza uralensis* F. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 111(10), 1735–1748. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1062-4>
- Liu, Z., Zhou, J., Li, Y., Wen, J., Wang, R. (2020). Bacterial endophytes from *Lycoris radiata* promote the accumulation of Amaryllidaceae alkaloids. *Microbiological Research*, 239(April), 126501. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126501>
- Maayan, I., Shaya, F., Ratner, K., Mani, Y., Lavee, S., Avidan, B., Ostersetzer-Biran,

- O. (2008). Photosynthetic activity during olive (*Olea europaea*) leaf development correlates with plastid biogenesis and Rubisco levels. *Physiologia Plantarum*, 134(3), 547–558. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01150.x>
- Mamta, Rahi, P., Pathania, V., Gulati, A., Singh, B., Bhanwra, R. K., Tewari, R. (2010). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Soil Ecology*, 46(2), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.08.008>
- Mandal, S., Evelin, H., Giri, B., Singh, V. P., Kapoor, R. (2013). Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. *Applied Soil Ecology*, 72, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.003>
- Mandal, S., Upadhyay, S., Singh, V. P., Kapoor, R. (2015). Enhanced production of steviol glycosides in mycorrhizal plants: A concerted effect of arbuscular mycorrhizal symbiosis on transcription of biosynthetic genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 89, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.02.010>
- Melillo, P. (2000). Agrotecnología para el cultivo de Estevia o hierba dulce. In J. V Martínez, H. Yesed, & A. Cáceres (Eds.), *Fundamentos de Agrotecnología de Plantas Medicinales Iberoamericanas* (Convenio A, pp. 441 – 450). Santafé de Bogotá.
- Mohanty, S. R., Dubey, G., Kollah, B. (2017). Endophytes of *Jatropha curcas* promote growth of maize. *Rhizosphere*, 3(P1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.11.001>

- Monteiro, R. (1980). Taxonomia e biologia da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. Universidade Estadual de Campinas.
- Montes Salazar, A. M. (2018). Bacterias endófitas de *Stevia rebaudiana* Bertoni con actividad promotora de crecimiento vegetal. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Oviedo Pereira, D., Alvarenga Venutolo, S., Lozano Evangelista, S., Sepúlveda Jimenez, G., Rodriguez Monroy, M. (2015). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un Cultivo Promisorio para México. *BioTecnología*, 19(2), 14–27.
- Pande, S. S., Gupta, P. (2013). Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5(February), 26–33. <https://doi.org/10.5897/JPP13>.
- Pereira, A. C. da C., de Castro, G. L. S., Rodrigues, P. C., Silva, G. B., de Oliveira, D. A., de Souza, C. R. B. (2019). An endophytic *Pseudomonas* sp. of *Piper tuberculatum* promotes growth on *Piper nigrum* through increase of root biomass production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 108(January), 101420. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2019.101420>
- Ramírez-Jaramillo, G., Avilés Baeza, W. I., Moguel Ordoñez, Y. B., Góndola

- Gonzales, S. F., May Lara, C. (2011). Estevia (*Stevia rebaudiana*, Bertoni), un cultivo con potencial productivo en México. In Y. B. Moguel Ordoñez, G. Ramírez Jaramillo, S. F. Góndola Gonzales (Eds.), (Primera Ed, pp. 65–70). Mérida, Yucatán, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Richman, A., Swanson, A., Humphrey, T., Chapman, R., McGarvey, B., Pocs, R. Brandle, J. (2005). Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *Plant Journal*, 41(1), 56–67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02275.x>
- Sahu, P. K., Singh, S., Gupta, A. R., Gupta, A., Singh, U. B., Manzar, N., Saxena, A. K. (2020). Endophytic bacilli from medicinal-aromatic perennial Holy basil (*Ocimum tenuiflorum* L.) modulate plant growth promotion and induced systemic resistance against *Rhizoctonia solani* in rice (*Oryza sativa* L.). *Biological Control*, 150, 104353. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104353>
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Sarmiento-López, L. G., López-Meyer, M., Sepúlveda-Jiménez, G., Cárdenas, L., Rodríguez-Monroy, M. (2020). Photosynthetic performance and stevioside concentration are improved by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Stevia rebaudiana* under different phosphate concentrations. *PeerJ*, 8.

<https://doi.org/10.7717/peerj.10173>

Schulz, B., C. B. (2006). What are endophytes? In: Microbial Root endophytes. In Microbial Root endophytes.

Shahzad, R., Khan, A. L., Bilal, S., Waqas, M., Kang, S. M., Lee, I. J. (2017). Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. *Environmental and Experimental Botany*, 136, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.010>

Shi, Y., Lou, K., Li, C. (2010). Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by endophytic bacteria. *Photosynthesis Research*, 105(1), 5–13. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9547-7>

Shock, C. C. (1982). Experimental cultivation on Rebaudi's Stevia in California. In Agronomy progress report. Davis.

Sørensen, J., Sessitsch, A. (2015). Plant-associated bacteria lifestyle and molecular interactions. In J. D. van Elsas (Ed.), Plant-associated bacteria lifestyle and molecular interactions. (2da ed., pp. 211–236).

Tadhani, M., Subhash, R. (2006). Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: Proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *Journal of Medical Sciences*, 6(3), 321–326.

Tiwari, R., Awasthi, A., Mall, M., Shukla, A. K., Srinivas, K. V. N. S., Syamasundar, K. V., Kalra, A. (2013). Bacterial endophyte-mediated enhancement of in planta content of key terpenoid indole alkaloids and growth parameters of

- Catharanthus roseus*. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 306–310.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.045>
- Tripathi, A., Awasthi, A., Singh, S., Sah, K., Maji, D., Patel, V. K., Kalra, A. (2020). Enhancing artemisinin yields through an ecologically functional community of endophytes in *Artemisia annua*. *Industrial Crops and Products*, 150(February), 112375. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112375>
- Vafadar, F., Amooaghaie, R., Otroshy, M. (2014a). Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 128–136. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.779035>
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Villamarín-Gallegos, D. J. (2016). Desarrollo y composición química de plantas de *Stevia rebaudiana* bertonii inoculadas con *Trichoderma*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional.
- Xu, J. X., Li, Z. Y., Lv, X., Yan, H., Zhou, G. Y., Cao, L. X., He, Y. H. (2020). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain 1-L-29, an endophytic bacteria from *Camellia oleifera* with antimicrobial activity and efficient plant-root colonization. *PLoS ONE*, 15(4), 1–18.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232096>

- Yan, Y., Zhang, S., Zhang, J., Ma, P., Duan, J., Liang, Z. (2014). Effect and mechanism of endophytic bacteria on growth and secondary metabolite synthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(5), 1095–1105. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1484-1>
- Zhao, L. F., Xu, Y. J., Lai, X. H. (2018). Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2), 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.007>

X. ANEXOS

Anexo 1. Correlación de Pearson entre las variables densidad de tricomas y concentración de GEs, compuestos fenólicos y flavonoides.

A continuación, se muestra el análisis de correlación de Pearson realizado entre la densidad de tricomas y los metabolitos evaluados, con la finalidad de establecer una relación entre estas variables. Se utilizó el paquete estadístico Minitab® para Windows, versión 19.1 (Estados Unidos, LLC).

Tricomas (número cm ²)	GEs (mg gPS ⁻¹)	Compuestos fenólicos (mg EAG gPS ⁻¹)	Flavonoides (mg EQ gPS ⁻¹)
7531.92	20.47	14.58	19.20
4910.60	15.83	18.56	20.99
4977.27	20.54	16.19	21.57
10163.66	42.27	20.79	21.21
11610.88	43.98	19.16	17.70
8867.04	40.36	17.58	20.89
2807.20	26.96	19.70	30.19
2025.65	29.94	21.35	27.84
3520.00	28.63	24.41	30.54
3267.60	15.44	5.18	20.04
3387.78	16.87	5.89	19.24
2509.05	18.92	5.50	21.49
Tricomas vs GEs			
Correlación 0.727			
R ² = 0.528			

Tricomas vs Compuestos fenólicos		
Correlación 0.310		
$R^2 = 0.096$		
Tricomas vs Flavonoides		
Correlación -0.546		
$R^2 = 0.298$		

Anexo 2. Carátula del artículo científico publicado en la revista PeerJ



Enhanced specialized metabolite, trichome density, and biosynthetic gene expression in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni plants inoculated with endophytic bacteria *Enterobacter hormaechei*

Q1

These cannot be changed:

- The order of authors
- Co-first and corresponding authorships
- The order of the affiliations

Please only ANNOTATE the proof. Do not edit the PDF. If multiple authors will review this PDF, please return one file containing all corrections.

Dumas G. Oviedo-Pereira¹, Melina López-Meyer², Silvia Evangelista-Lozano¹, Luis G. Sarmiento-López², Gabriela Sepúlveda-Jiménez¹ and Mario Rodríguez-Monroy¹

¹ Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Yautepec, Morelos, México

² Departamento de Biotecnología Agrícola, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación Para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Guasave, Sinaloa, México

ABSTRACT

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni is a plant of economic interest in the food and pharmaceutical industries due its steviol glycosides (SG), which are rich in metabolites that are 300 times sweeter than sucrose. In addition, *S. rebaudiana* plants contain phenolic compounds and flavonoids with antioxidant activity. Endophytic bacteria promote the growth and development and modulate the metabolism of the host plant. However, little is known regarding the role of endophytic bacteria in the growth; synthesis of SG, flavonoids and phenolic compounds; and the relationship between trichome development and specialized metabolites in *S. rebaudiana*, which was the subject of this study. The 12 bacteria tested did not increase the growth of *S. rebaudiana* plants; however, the content of SG increased with inoculation with the bacteria *Enterobacter hormaechei* H2A3 and *E. hormaechei* H5A2. The SG content in leaves paralleled an increase in the density of glandular, short, and large trichome. The image analysis of *S. rebaudiana* leaves showed the presence of SG, phenolic compounds, and flavonoids principally in glandular and short trichomes. The increase in the transcript levels of the *KO*, *KAH*, *UGT74G1*, and *UGT76G1* genes was related to the SG concentration in plants of *S. rebaudiana* inoculated with *E. hormaechei* H2A3 and *E. hormaechei* H5A2. In conclusion, inoculation with the stimulating endophytes *E. hormaechei* H2A3 and *E. hormaechei* H5A2 increased SG synthesis, flavonoid content and flavonoid accumulation in the trichomes of *S. rebaudiana* plants.

Subjects Agricultural Science, Biotechnology, Microbiology, Molecular Biology, Plant Science

Keywords *Stevia rebaudiana*, Endophytic bacteria, Trichomes, Steviol glycosides, Biosynthetic genes, UDP-glycosyltransferases, Bacteria-plant association, Plant-endophytic microorganism interactions, Kaurene oxidase, Specialized metabolite

Submitted 11 February 2022
Accepted 13 June 2022
Published TBD

Corresponding author
Mario Rodríguez-Monroy,
mrmonroy@ipn.mx

Academic editor
Heng Yin

Additional Information and
Declarations can be found on
page 17

DOI 10.7717/peerj.13675

© Copyright
2022 Oviedo-Pereira et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

How to cite this article Oviedo-Pereira DG, López-Meyer M, Evangelista-Lozano S, Sarmiento-López LG, Sepúlveda-Jiménez G, Rodríguez-Monroy M. 2022. Enhanced specialized metabolite, trichome density, and biosynthetic gene expression in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni plants inoculated with endophytic bacteria *Enterobacter hormaechei*. *PeerJ* 10:e13675 <http://doi.org/10.7717/peerj.13675>