



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

**EFFECTIVIDAD DE HONGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES CON NIVELES DE FÓSFORO EN EL
RENDIMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE ESTEVIÓSIDO Y
REBAUDIÓSIDO-A EN *Stevia rebaudiana* Bertoni**

REPOSITORIO

Que presenta:

Rodrigo Armando Cauich Cauich

Como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Agricultura Tropical Sustentable

Director de tesis:

Dr. José María Tun Suárez

Conkal, Yucatán, México

Noviembre, 2024



TecNM



Conkal, Yucatán, México, a 08 de noviembre de 2024

El comité de tesis del candidato a grado: Rodrigo Armando Cauich Cauich, constituido por los CC. Dr. José María Tun Suárez, Dra. Mónica Guadalupe Lozano Contreras, Dr. Jairo Cristóbal Alejo, Dra. Elizabeth de los Ángeles Herrera Parra y Dr. Rubén Humberto Andueza Noh, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **Efectividad de hongos micorrícicos arbusculares con niveles de fósforo en el rendimiento y concentración de esteviósido y rebaudiósido-A en *Stevia rebaudiana* Bertoni**, que presenta como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Agricultura Tropical Sustentable, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Dr. José María Tun Suárez
Director de Tesis

Dra. Mónica Guadalupe Lozano
Contreras
Codirectora de Tesis

Dr. Jairo Cristóbal Alejo
Asesor de Tesis

Dra. Elizabeth de los Ángeles
Herrera Parra
Asesora de Tesis

Dr. Rubén Humberto Andueza Noh
Asesor de Tesis



Conkal, Yucatán, México a 08 de noviembre de 2024

DECLARATORIA DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.

Rodrigo Armando Cauich Cauich

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
HOJA DE FIRMAS.....	ii
DECLARATORIA DE PROPIEDAD.....	¡Error! Marcador no definido.
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
I. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. ANTECEDENTES	3
1.2.1. Potencial fitoquímico de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni en el mercado mundial..	3
1.2.2. Biosíntesis de esteviósido y rebaudiósido-A.....	5
1.2.3. El cultivo de <i>S. rebaudiana</i> en México	6
1.2.4. Alternativa sostenible para la producción de esteviósido y rebaudiósido-A en <i>S. rebaudiana</i>	7
1.2.5. Capacidad de colonización de los HMA en la simbiosis con las plantas.....	8
1.2.6. Contribución de los HMA en el cultivo de <i>S. rebaudiana</i>	9
1.2.7. Papel del fósforo en la simbiosis HMA - planta	11
1.3. HIPÓTESIS	12
1.4. OBJETIVOS.....	13
1.4.1. General	13
1.4.2. Específicos	13
1.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	14
1.6. LITERATURA CITADA.....	15

II. CAPITULO 2. EVALUACIÓN DE CONSORCIOS MICORRÍCICOS ARBUSCULARES NATIVOS EN INTERACCIÓN CON NIVELES DE FÓSFORO EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO Y FOTOSÍNTESIS DE <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni EN CONDICIONES DE INVERNADERO	26
2.1. RESUMEN Y ABSTRACT	26
III. CAPITULO 3. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE ¹H-RMN DE ESTEVIÓSIDO Y REBAUDIÓSIDO-A EN <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni EN INTERACCIÓN CON MICORRIZAS ARBUSCULARES Y FÓSFORO.....	28
3.1. RESUMEN Y ABSTRACT	28
IV. CAPÍTULO 4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR DE GENES BIOSINTÉTICOS DE ESTEVIÓSIDO Y REBAUDIÓSIDO-A EN PLANTAS DE <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni EN INTERACCIÓN CON HONGOS MICORRÍCICOS ARBUSCULARES Y FÓSFORO EN CONDICIONES DE CIELO ABIERTO.....	30
4.1. RESUMEN Y ABSTRACT	30

RESUMEN

Las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni producen metabolitos secundarios. El esteviósido (Stv) y rebaudiósido-A (Reb-A) le brindan una propiedad edulcorante única sin calorías, por lo que, ha crecido su demanda en el país, pero se conoce relativamente poco de su manejo en el estado. Es indispensable la búsqueda de alternativas sostenibles que aumenten el rendimiento agronómico y fitoquímico de las plantas, una alternativa es el uso hongos arbusculares (HMA) en combinación con fertilizantes clave que permita potencializar su nutrición y concentración de metabolitos de importancia económica. El objetivo de esta investigación fue evaluar consorcios de HMA nativos en combinación con niveles de fósforo, para mejorar el crecimiento, aumentar el rendimiento y expresión de genes asociados a la concentración de Stv y Reb-A en hojas de *S. rebaudiana*. Se obtuvieron inóculos con esporas viables de HMA de diferentes localidades del estado de Yucatán, se evaluó el efecto de cada uno sobre la productividad y concentración de Stv y Reb-A en condiciones protegidas y en condiciones de cielo abierto el efecto del consorcio sobresaliente, además, se determinó los niveles de expresión de los genes KO y UGT74G1 y UGT76G1 involucrados en la ruta de biosíntesis de Stv y Reb-A. La fertilización con fósforo afectó significativamente la colonización de los consorcios micorrícicos. En condiciones protegidas el crecimiento vegetativo de *S. rebaudiana* variedad Morita II se promovió por la inoculación de todos los consorcios HMA, sin embargo, el consorcio “RC” integrado por *Funneliformis geosporum*, *Claroideoglomus claroideum* y *Glomus ambisporum* en combinación con 25% de fósforo aumentó el fosforo a nivel foliar, mejoró la fotosíntesis y la concentración de Stv y Reb-A. En condiciones de cielo abierto se encontró colonización micorrícica del consorcio RC, sin embargo, la concentración de Stv y Reb-A en la variedad Ch’ujuk de *S. rebaudiana* estuvo mayormente influenciada por el 25% de fósforo y no por la inoculación del consorcio, lo que fue consistente con el análisis de expresión génica de KO, UGT74G1 y UGT76G1.

Palabras clave: Hojas, edulcorante, micorrizas, fosfato, metabolitos, genes

ABSTRACT

Stevia rebaudiana Bertoni leaves produce secondary metabolites. Stevioside (Stv) and rebaudioside-A (Reb-A) provide a unique calorie-free sweetening property, which is why their demand has grown in the country, but relatively little is known about their management in the state. It is essential to search for sustainable alternatives that increase the agronomic and phytochemical performance of plants. An alternative is the use of arbuscular fungi (AMF) in combination with key fertilizers that can enhance their nutrition and concentration of metabolites of economic importance. The objective of this research was to evaluate consortia of native AMF in combination with phosphorus levels, to improve growth, increase yield and expression of genes associated with the concentration of Stv and Reb-A in *S. rebaudiana* leaves. Inoculation with viable AMF spores were obtained from different locations in the state of Yucatán, the effect of each one on the productivity and concentration of Stv and Reb-A was evaluated in protected conditions and in open air conditions the effect of the outstanding consortium, in addition, the expression levels of the KO and UGT74G1 and UGT76G1 genes involved in the Stv and Reb-A biosynthesis pathway were determined. Phosphorus fertilization significantly affected the colonization of mycorrhizal consortia. Under protected conditions, the vegetative growth of *S. rebaudiana* variety Morita II was promoted by the inoculation of all AMF consortia, however, the “RC” consortium composed of *Funneliformis geosporum*, *Claroideoglossum Claroideum* and *Glomus ambisporum* in combination with 25% phosphorus increased Phosphorus at the foliar level improved photosynthesis and the concentration of Stv and Reb-A. Under open air conditions, mycorrhizal colonization of the RC consortium was found; however, the concentration of Stv and Reb-A in the Ch'ujuk variety of *S. rebaudiana* was mostly influenced by 25% phosphorus and not by the inoculation of the consortium, which was consistent with the gene expression analysis of KO, UGT74G1 and UGT76G1.

Keywords: leaves, sweetener, mycorrhizae, phosphate, metabolites, genes

I. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. INTRODUCCIÓN

La *Stevia rebaudiana* Bertoni, también conocida como hierba dulce, hoja de caramelo y hoja de miel (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012), es un arbusto perenne perteneciente a la familia Asteraceae (antes Compositae). Es originaria de América del sur en la región tropical de Paraguay (Alonzo-Torres, 2007). Sus hojas acumulan compuestos llamados glucósidos de esteviol que tienen entre 100 y 300 veces el dulzor de la sacarosa. Los glucósidos de esteviol que se han encontrado son: esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido-A, B, C, D y dulcósido-A (Huang *et al.*, 2010; Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). Sin embargo, el esteviósido y rebaudiósido-A son los más importantes, su mayor contenido en las hojas le brinda a la planta el sabor dulce (Brandle y Telmer, 2007).

Dado que el esteviósido y rebaudiósido-A son 143 y 320 veces más dulce que la sacarosa, en su orden, con pocas calorías (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012) son usados como agentes edulcorantes y suplementos dietéticos por la industria alimenticia y farmacéutica de varios países, para atender la creciente demanda de sustituir edulcorantes sintéticos perjudiciales para la salud (Kim *et al.*, 2010). Actualmente, los mercados más grandes para *S. rebaudiana*, son Japón y Corea. Sin embargo, el mayor productor en el mundo es China, de donde se exporta alrededor del 80% de su producción mundial (González-Moralejo, 2011; Pal *et al.*, 2013). La creciente demanda de esteviósido y rebaudiósido-A, requiere de un cultivo intensivo de *S. rebaudiana* para aumentar su producción, sin embargo, los estudios revelan que el contenido de los glucósidos de esteviol depende del crecimiento de las plantas, de la biomasa total producida y eficiencia en la absorción de fósforo, que a su vez depende del manejo agronómico del cultivo (Geuns, 2003; Sarmiento-López *et al.*, 2020).

Por lo tanto, se han realizado esfuerzos para mejorar la concentración de glucósidos de esteviol en *S. rebaudiana*, particularmente de esteviósido y rebaudiósido-A (Das *et al.*, 2008), los investigadores han adoptado técnicas modernas, como la gestión del agua (Fronza y Folngatti, 2003), gestión del fotoperíodo (Mamta *et al.*, 2010), cultivo de tejidos (Madan

et al., 2010) y la aplicación de sales (Gupta *et al.*, 2014). Sin embargo, estas técnicas, suelen ser costosas y de baja practicabilidad en campo (Gupta *et al.*, 2014). La simbiosis entre hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y las plantas, es una asociación mutualista que resulta útil en el cultivo de plantas de importancia agrícola (Sharma *et al.*, 2016). Esta simbiosis mejora el crecimiento de las plantas, la fotosíntesis, la absorción de nutrientes, principalmente de fósforo y el contenido de fitoquímicos (Adolfsson *et al.*, 2015).

Los HMA son microorganismos rizosféricos del suelo, capaces de establecer una endosimbiosis mutualista con el 80% de las plantas (Sharma *et al.*, 2016). La simbiosis estimula la producción de biomasa y confiere resistencia a las plantas frente a fitopatógenos (Smith y Read, 2010). Estos microorganismos son útiles para la agricultura sostenible (Gianinazzi *et al.*, 2010; Zen *et al.*, 2013) y pueden ser una alternativa para aumentar la concentración de esteviósido y rebaudiósido-A en *S. rebaudiana* (Cauich-Cauich *et al.*, 2022).

En los últimos años, los estudios han reportado aumentos inducidos por HMA en la concentración de metabolitos secundarios en varias plantas medicinales (Kapoor *et al.*, 2007; Copetta *et al.*, 2006; Khaosaad *et al.*, 2006; Toussaint *et al.*, 2007; Zubek *et al.*, 2012). También se han reportado aumentos en *S. rebaudiana* (Mandal *et al.*, 2013; Tavarini *et al.*, 2018), sin embargo, estos estudios en su mayoría se centran en la inoculación de una sola especie, que por lo general es *Rhizophagus intraradices* (Giovannini *et al.*, 2020), no se ha reportado el efecto de un consorcio de HMA nativos asociados al cultivo de *S. rebaudiana* y su efecto en la productividad y acumulación de fitoquímicos.

La acumulación de esteviósido y rebaudiósido-A en *S. rebaudiana* está relacionado con una mejor nutrición de fósforo, la cual se puede ver favorecida por la interacción con HMA (Kapoor *et al.*, 2007; Zubek *et al.*, 2012). En este contexto, Mandal *et al.* (2013) encontraron que la simbiosis de HMA con *S. rebaudiana* y la adición de fósforo con 50 mg kg⁻¹ suelo, mejoró la producción de esteviósido y rebaudiósido-A en plantas inoculadas e involucró mecanismos nutricionales y no nutricionales como la fotosíntesis. Además, observaron que los HMA son capaces de regular la tasa transcripción de once genes involucrados en la biosíntesis de glucósidos de esteviol como consecuencia de la mejora del

estado de nutrición y el aumento de la fotosíntesis en la planta de *S. rebaudiana* (Mandal *et al.*, 2015). Este resultado sugirió la importancia del fósforo en la simbiosis de HMA y *S. rebaudiana*, sin embargo, se desconoce el nivel de fósforo que pueda actuar en sinergia con HMA. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de consorcios de HMA nativos en interacción con niveles de fósforo en la producción de biomasa y concentración de esteviósido y rebaudiósido-A en *S. rebaudiana*.

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1. Potencial fitoquímico de *Stevia rebaudiana* Bertoni en el mercado mundial

Los beneficios de la *S. rebaudiana* son conocidos y usados desde tiempos ancestrales por las tribus guaraníes, quienes la usaban como edulcorante y planta medicinal (Alonzo-Torres, 2007). Actualmente, más de 200 especies de estevia están presentes en todo el mundo, pero *S. rebaudiana*, es la única con propiedades edulcorantes (Shivanna *et al.*, 2013). Por esta razón, esta especie se cultiva en muchas regiones de Asia, Europa y América del Norte, donde sus hojas se usan como sustituto del azúcar (Abbas Momtazi-Borojeni *et al.*, 2017). Su verdadera importancia radica en que sus hojas contienen esteviósido y rebaudiósido-A, glucósidos de esteviol que han captado la atención de diversos sectores, debido a que tienen propiedades funcionales y sensoriales superiores a otros edulcorantes de alto poder de dulzura, que probablemente serán sustituidos en un futuro por estos metabolitos en el creciente mercado de alimentos naturales (Goyal *et al.*, 2010).

Además de la presencia de glucósidos de esteviol, *S. rebaudiana* también es fuente de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud, como diterpenos de labdano no glucosídicos, flavonoides, compuestos fenólicos, fibra cruda, fitoesteroles, ácidos clorogénicos, triterpenos, hidrocarburos (Wolwer-Rieck, 2012), ácido cafeico, alcaloides, taninos, saponinas y quinonas (Lemus-Mondaca *et al.*, 2016). Varios estudios han informado que estos compuestos presentes en las hojas no han resultado ser teratogénicos, cancerígenos ni mutagénicos, y no causan toxicidad (Ahmad *et al.*, 2020). Por el contrario, *S. rebaudiana* tiene aplicaciones en el mercado de la salud (Hossain *et al.*, 2017), ya que esta gama de

fitoquímicos posee potencial terapéutico contra enfermedades como la diabetes mellitus, candidiasis, obesidad, hipertensión arterial y cáncer (Abbas Momtazi-Borojeni *et al.*, 2017; Lemus-Mondaca *et al.*, 2018), además, tiene propiedad antimicrobiana, anticaries y antioxidante (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2015).

Debido a estas propiedades, las hojas se procesan y muelen para su uso natural. También se utilizan como colorante, potenciador del sabor, edulcorante en café, ensaladas y frutas (Hossain *et al.*, 2017). El uso en bebidas es mayor que su uso en alimentos, aunque, se usa en productos lácteos como: helados, yogurt, leche saborizada, cereales y panadería (Ahmed *et al.*, 2011). La presencia tanto de esteviósido como rebaudiósido-A y bioactivos pertenecientes a grupos fenólicos y flavonoides en las hojas, justifican sus propiedades medicinales y su aplicación en la industria alimenticia, nutracéutica y farmacéutica (Ahmad *et al.*, 2020). En los últimos años, *S. rebaudiana* ha ganado un mayor interés industrial y científico, como una alternativa nutricional frente a edulcorantes artificiales (Kovačević *et al.*, 2018).

El esteviósido y rebaudiósido-A son los glucósidos de esteviol que se encuentran en mayor proporción en las hojas de *S. rebaudiana*, son estables en solución acuosa y en un amplio rango de temperatura y pH, lo cual ha fomentado su comercialización a nivel mundial (Abou-Arab y Abu-Salem, 2010). Estos metabolitos tienen propiedades organolépticas distintivas.

El esteviósido es 143 veces más dulce que la sacarosa en peso, pero el rebaudiósido-A es 242 veces más dulce, es decir, la calidad del sabor del rebaudiósido-A es mejor que la del esteviósido, porque es más dulce y menos amargo, sin embargo, ambos comparten una misma ruta de biosíntesis (Brandle y Telmer, 2007). Por lo que, en la tarea del quehacer científico, se buscan alternativas para aumentar la concentración de estos dos metabolitos en la planta y potencializar su valor en el mercado.

1.2.2. Biosíntesis de esteviósido y rebaudiósido-A

La biosíntesis de los glucósidos de esteviol tiene lugar en las hojas de *S. rebaudiana* (La biosíntesis de los glucósidos de esteviol tiene lugar en las hojas de *S. rebaudiana* (Brandle *et al.*, 1998), en un proceso de diecisiete pasos que se pueden clasificar en tres etapas. Comienza con la conversión de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato a isopentil difosfato y dimetilalil difosfato en ocho reacciones secuenciales que forman la vía 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (vía MEP) (McGarvey y Croteau, 1995; Wanke *et al.*, 2001). La 1-desoxi-D xilulosa 5-fosfato sintasa y la 1-desoxi-D-xilulosa 5 fosfato reductoisomerasa juegan un papel central en la regulación de la vía MEP, por tanto, es de gran importancia la absorción de fósforo en la planta (Cordoba *et al.*, 2009). Estas enzimas catalizan la condensación de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato en MEP (Takahasi *et al.*, 1998; Kuzuyama *et al.*, 2000). El 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa es un punto de control importante en la biosíntesis de glucósidos de esteviol (Kumar *et al.*, 2012) ya que podría unirse a intermedios de la vía y controlar el flujo de metabolitos por regulación de retroalimentación (Kemp *et al.*, 2005).

La segunda etapa comienza con una reacción de condensación catalizada por una importante ramificación de la enzima geranil geranil difosfato sintasa para formar geranil geranil difosfato, que es un precursor común para la biosíntesis de varios diterpenoides (Okada *et al.*, 2007). El geranil geranil difosfato se convierte en esteviol por acción consecutiva de 4 enzimas, a saber, copatil difosfato sintasa, kaureno sintasa, kaureno oxidasa e hidroxilasa de ácido kaurenoico (Brandle y Telmer, 2007). Las vías de biosíntesis de glucósidos de esteviol y giberelinas comparten el mismo precursor kaurenoide y geranil geranil difosfato sintasa, copatil difosfato sintasa, kaureno sintasa y kaureno oxidasa están involucrados en la biosíntesis de giberelinas y glucósidos de esteviol (Richman *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2012). Dado que, la copatil difosfato sintasa es crucial para la conversión de geranil geranil difosfato a copatil difosfato, se cree que es un punto de control para el flujo de metabolitos (Silverstone *et al.*, 1997). El kaureno se produce a partir de copatil difosfato en una ciclación dependiente de ionización por kaureno sintasa (Brandle y Telmer, 2007). Es importante para la síntesis de glucósidos de esteviol ya que kaureno sintasa está presente en duplicados solo en *S. rebaudiana* (Richman *et al.*, 1999). El kaureno oxidasa cataliza la

oxidación del kaureno para formar ácido kaurenoico (Humphrey *et al.*, 2006). La divergencia de la biosíntesis de esteviol de la biosíntesis de giberelina ocurre con la hidroxilación del ácido kaurenoico en esteviol catalizada por ácido kaurenoico (Hanson y White, 1968; Kim *et al.*, 1996). Este es el primer paso específico hacia la biosíntesis de los glucósidos de esteviol (Brandle y Telmer, 2007).

En la tercera etapa se produce la glucosilación de esteviol a rebaudiósido-A por cuatro glicosiltransferasas dependientes de uridina difosfato específicas (UGT). Sin embargo, en *S. rebaudiana* solo se han identificado tres hasta ahora, a saber, UGT85C2, UGT74G1 y UGT76G1 (Brandle y Telmer, 2007). Estos UGT transfieren las moléculas de azúcar de un donante activado a una molécula aceptora y, por lo tanto, la concentración de azúcar influye en la glucosilación del entureceurínico que forma los glucósidos de esteviol (Richman *et al.*, 2005). Se sugirió que la glucosilación de esteviol por UGT85C2 es un paso limitante de la velocidad (Mohamed *et al.*, 2011). Tanto UGT74G1 como UGT76G1 son necesarios para la síntesis de esteviósido y rebaudiósido-A, respectivamente (Humphrey *et al.*, 2006).

1.2.3. El cultivo de *S. rebaudiana* en México

La *S. rebaudiana* fue introducida en México en 2010 a través del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) para estudiar su adaptación y potencialidad, que representa una gran oportunidad económica para el sector agrícola (Ramírez-Jaramillo *et al.*, 2021). No obstante, desde 1970 en algunos países asiáticos ya se explotaba este cultivo. En 2011, en México donde se sembró *S. rebaudiana* por primera vez, fueron en los estados de: Yucatán y Quintana Roo con 25 y 11 ha, respectivamente. En 2013 se reportan 2 ha en Chiapas y 1 ha en Veracruz (Ramírez-Jaramillo *et al.*, 2021).

Actualmente, estados como Nayarit cuentan con una extensión de cultivo importante, su producción en 2017 fue de 324 toneladas, que representaron el 64.7% del total de la producción a nivel nacional (SIACON NG, 2017). Sin embargo, en México existen otras zonas con condiciones agroecológicas óptimas para producir *S. rebaudiana*, como, el estado de Sinaloa, donde su latitud norte (22°-27" N) coincide con la latitud sur de la región de

donde es nativa la *S. rebaudiana*, por lo tanto, tiene condiciones agroecológicas adecuadas para el establecimiento y crecimiento del cultivo (CEDRSSA, 2018).

En el 2018 la superficie sembrada reportada para este cultivo en México fue de 40.55 ha, con 34.55 ha cosechadas y un rendimiento de 10.73 ton ha⁻¹ (SIACON NG, 2018). Para 2019 se reportaron 76.20 ha y un rendimiento de 206.62 ton por año (SIACON NG, 2019) y, en 2020 ya se contaba con 880.53 ha con rendimientos de 668 ton por año (SIACON NG, 2020). Según el INIFAP, México cuenta con 4,487,902 ha de superficie potencial para extender el cultivo, y el estado de Yucatán con 360,779 ha de superficie con condiciones óptimas para producir de *S. rebaudiana* (CEDRSSA, 2018).

1.2.4. Alternativa sostenible para la producción de esteviósido y rebaudiósido-A en *S. rebaudiana*.

Identificar los principales factores previos a la cosecha que afectan la concentración de esteviósido y rebaudiósido-A en la *S. rebaudiana* es clave para mejorar su productividad y las cantidades de compuestos activos beneficiosos en sus hojas (Tavarini *et al.*, 2018). En consecuencia, se han realizado esfuerzos para aumentar la concentración de estos glucósidos de esteviol. Se sabe que la disponibilidad de fósforo en el suelo y la capacidad de la planta en la toma de este importante nutriente afectan significativamente la concentración tanto del esteviósido como del rebaudiósido-A (Mandal *et al.*, 2013; Tavarini *et al.*, 2018; Sarmiento-López *et al.*, 2020).

En las plantas, existen dos modos de absorción del fósforo; uno por medio de las propias proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana de la epidermis de las raíces, pero que están limitadas por la disponibilidad y movilidad del fósforo, y el otro modo ocurre a través de la simbiosis de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) a través de transportadores de fosfato específicos de micorrizas y tiene lugar en los arbusculos (Sarmiento-López *et al.*, 2020). Los HMA son microorganismos benéficos del suelo que translocan fósforo a las plantas (Nouri *et al.*, 2015). En su condición de biotrofos obligados, su ciclo de vida no puede completarse en ausencia de plantas hospedantes, es así como,

establecen una asociación simbiótica y mutualista con las raíces de las plantas, además, juegan un papel clave en el mantenimiento de la fertilidad del suelo a largo plazo (Giovannini *et al.*, 2020).

Los HMA pertenecen al filo Glomeromycota constituido con diez familias; Acaulosporaceae, Ambisporaceae, Archaesporaceae, Claroidoglomeraceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae, Pacisporaceae, Paraglomeraceae y Sacculosporaceae y 323 especies (Redecker *et al.*, 2013), aunque, solo unas pocas como *Rhizophagus irregularis* y *Funneliformis mosseae* han sido investigadas por su diversidad funcional y presencia en la mayoría de los suelos agrícolas y condiciones climáticas, con el fin de seleccionar los mejores aislados para su uso en la agricultura (Giovannini *et al.*, 2020).

1.2.5. Capacidad de colonización de los HMA en la simbiosis con las plantas

La capacidad de colonización se refiere a la capacidad del hongo de una rápida y extensa colonización de raíces (Giovannetti, 2000). Comienza con una fase asimbiótica, donde las esporas que se encuentran en el suelo germinan en respuesta a factores físicos como la humedad, la temperatura y el pH, produciendo hifas con vida útil limitada (Giovannetti y Avio, 2002). En presencia de exudados radicales de las plantas, se produce una morfogénesis hifal diferencial, con hifas germinantes que reorientan la dirección de elongación e inician un patrón de ramificación diferencial (Sbrana y Giovannetti, 2005), esta fase presimbiótica es seguida por el contacto físico entre las hifas de los HMA y las raíces de la planta hospedante para la diferenciación de apresorios. Ésta es la primera indicación del reconocimiento entre el hongo y la planta (Giovannetti *et al.*, 2010).

Los apresorios dan lugar a hifas que crecen intercelularmente dentro de la corteza de la raíz, penetrando eventualmente en las células y produciendo estructuras hifales ramificadas, similares a árboles (arbuscúlos). Los arbuscúlos son estructuras donde tiene lugar el intercambio de nutrientes entre los simbioses (Kiers *et al.*, 2011; Luginbuehl *et al.*, 2017).

La mayoría de los estudios realizados sobre HMA en suelos agrícolas, han detectado una colonización de tipo “Arum” (Smith y Read, 2010), en la cual, el HMA se propaga intercelularmente entre las células de la raíz cortical, formando arbuscúlos terminales en las ramas de las hifas intracelulares (Smith y Smith, 1997). Además de los arbuscúlos, varias especies de HMA producen vesículas intrarradicales, que son estructuras de almacenamiento similares a esporas que contienen lípidos.

Después de recibir carbono de la planta hospedante, el HMA puede crecer extrarradicalmente en el suelo, absorber nutrientes minerales para transferirlos a la planta hospedante, interactuar con los microorganismos del suelo, colonizar las raíces de otras plantas, incluso diferentes a su hospedante y translocar nutrientes de un hospedante a otro (Giovannetti *et al.*, 2004). El ciclo de vida se cierra con la formación de esporas asexuales por hifas extrarradicales (Mikkelsen *et al.*, 2008).

1.2.6. Contribución de los HMA en el cultivo de *S. rebaudiana*.

La micorriza se considera como un compartir mutuo entre el simbiote y el hospedante. El hongo es el principal socio de la planta, tiene el deber de suministrar nutrientes minerales, particularmente fosfato inorgánico, hormonas de crecimiento y protección a la raíz contra patógenos. A cambio, reciben carbono orgánico de la planta hospedante (Alizadeh, 2011). Los HMA son componentes clave en la biota del suelo, representan alrededor del 25% de la biomasa microbiana y juegan un papel importante para influir en las propiedades físicas del suelo y la nutrición de las plantas (Montaño *et al.*, 2012).

Los efectos de los HMA sobre el crecimiento, producción de biomasa y modulación fisiológica en las plantas, se han estudiado ampliamente en muchas especies, incluida *S. rebaudiana* (Tavarini *et al.*, 2018; Sarmiento-López *et al.*, 2020). La simbiosis de HMA que es importante en la producción de cultivos, es una estrategia biotecnológica para mejorar la síntesis de fitoquímicos (Alizadeh, 2011). En *S. rebaudiana*, la inoculación de HMA, mejora los parámetros de crecimiento y la absorción de nutrientes importantes como el nitrógeno y el fósforo en comparación a plantas sin HMA (Mandal *et al.*, 2013). Esta estimulación del

crecimiento está relacionada con el hecho de que los HMA extienden la red de absorción más allá de las zonas de agotamiento de nutrientes de la rizosfera, lo que permite el acceso a un mayor volumen de suelo (Smith y Smith, 2011). Además, las hifas fúngicas son mucho más delgadas que las raíces y pueden penetrar poros más pequeños y absorber más nutrientes y agua (Ruth *et al.*, 2011). Los HMA contribuyen aproximadamente en un 20% en la absorción total de agua por las plantas, por lo que, mejoran significativamente su crecimiento y metabolismo (Ruth *et al.*, 2011).

Estudios mostraron que los HMA también aumentan la biomasa vegetal en cultivos económicamente importantes, como *Solanum lycopersicum* (Cervantes-Gámez *et al.*, 2016) y *Zea mays* (Real-Santillán *et al.*, 2019). En este sentido, *S. rebaudiana* ha respondido con éxito a la colonización de HMA. Sarmiento-Lopez *et al.* (2020) reportaron que las plantas colonizadas con *R. irregularis* presentaron un aumento en el crecimiento de 2.6 veces en comparación con plantas no colonizadas. Así mismo, mostraron una mejora significativa en la adquisición de nutrientes, producción de biomasa y densidad de tricomas glandulares. En otros casos, la simbiosis de HMA indujeron cambios en los perfiles de metabolitos secundarios de las plantas, provocando la acumulación de glucósidos de esteviol (Zubek *et al.*, 2015; Hazzoumi *et al.*, 2017).

La colonización de *Rhizophagus* spp. en plantas de *S. rebaudiana*, no solo mejoró el rendimiento de biomasa seca de hoja (Mandal *et al.*, 2013), y la eficiencia del uso de agua (Cauch-Cauch *et al.*, 2018), también la concentración de esteviósido y rebaudiósido-A (Mandal *et al.*, 2015). Además, mejoró la producción de otros fitoquímicos como terpenos, flavonoides y compuestos fenólicos (Mandal *et al.*, 2013; Spatafora *et al.*, 2016).

Otros resultados indican que, la simbiosis de HMA también aumentó la transcripción de once genes involucrados en la biosíntesis de glucósidos de esteviol en *S. rebaudiana*, como consecuencia de una mejora en el estado nutricional y el aumento de la fotosíntesis en la planta (Mandal *et al.*, 2015). La fertilización con 25 mg de P_2O_5 kg^{-1} de suelo en asociación con la inoculación de *R. irregulare* mejoró el rendimiento de glucósidos de esteviol, la absorción de fósforo y la eficiencia del uso de nutrientes (Tavarini *et al.*, 2018). Este

resultado resalta la importancia de la nutrición con fósforo y la simbiosis de HMA para influir en la concentración de esteviósido y rebaudiósido-A (Sarmiento-López *et al.*, 2020).

1.2.7. Papel del fósforo en la simbiosis HMA - planta

La principal función de los HMA es proveer las necesidades de fósforo a la planta, debido a que éste nutriente es extremadamente inmóvil en el suelo (Smith y Read, 2010). En la rizosfera, el fosfato inorgánico generalmente se agota, porque, las tasas de absorción exceden las de reemplazo en el suelo (Ezawa y Saito, 2018). Además, las formas existentes del fósforo en el suelo son poco solubles en agua, por lo tanto, su concentración es muy pequeña en la solución del suelo, sin embargo, los HMA son capaces de acceder al fosfato más allá de la zona de agotamiento a través de redes de hifas extrarradicales y entregar fosfato inorgánico a la planta hospedante (Ezawa y Saito, 2018). En *S. rebaudiana*, el fósforo es un elemento esencial para su crecimiento y metabolismo, ya que interviene en los procesos bioquímicos vegetales más importantes como la biosíntesis de fitoquímicos y forma parte de la estructura química de las enzimas involucradas en la síntesis de glucósidos de esteviol (Cordoba *et al.*, 2009).

La traslocación y exportación del fosfato desde la solución del suelo hacia la planta, se presenta cuando el fosfato es captado por las hifas extrarradicales del HMA y es traslocado por medio de transportadores de fosfato específicos de micorrizas (Harrison *et al.*, 2002). Las hifas extrarradicales de los HMA transfieren fosfato a las raíces desde varios centímetros de distancia. Sin embargo, se ha demostrado, que la supresión de la transpiración en las plantas desacelera la transferencia de fosfato por HMA, lo que sugiere, que existe un mecanismo de transporte de fosfato impulsado por la transpiración (Kikuchi *et al.*, 2016).

Los transportadores de fosfato se consideran marcadores generales de la simbiosis en diferentes plantas modelo y son una característica clave de la simbiosis micorrícica (Bucher, 2007; Becquer *et al.*, 2014). El fosfato es transferido hacia el citoplasma, o bien, es acumulado en las vacuolas en forma de gránulos de polifosfato, donde es impulsado a través

de las hifas intraradicales hacia los arbuscúlos, en donde la polifosfato es degradado y el ion fósforo es transferido a la célula hospedadora vegetal (Ezawa y Saito, 2018).

El nivel de fósforo en la solución del suelo está directamente relacionado con la capacidad de colonización de los HMA, es decir, a bajas concentraciones de fósforo en el suelo, habrá bajos niveles de fosfolípidos en la membrana vegetal de la raíz, lo que conduce a una mayor exudación radicular y estimulación en la germinación y colonización del HMA.

Al encontrarse altas concentraciones de fósforo, se interfiere la simbiosis y se inhibe la colonización (Bagyaraj *et al.*, 2015). La simbiosis entre *S. rebaudiana* y *R. irregularis* se vio afectada por concentraciones de fosfato. Una baja concentración de fosfato indujo a un alto porcentaje de colonización (Sarmiento-López *et al.*, 2020). La adición de bajas dosis de fertilizante fosfatado es compatible, e incluso beneficia la capacidad y eficiencia del porcentaje de colonización. Sin embargo, las diferentes especies de HMA muestran distintos grados de resistencia a la aplicación de fertilizantes fosfatados y productos fitosanitarios (Guerra-Sierra, 2008).

1.3. HIPÓTESIS

Los consorcios de hongos micorrícicos arbusculares nativos en interacción con el 25% de fósforo del recomendado en *Stevia rebaudiana* Berton, mejoran la producción de biomasa, el rendimiento y la concentración de esteviósido y rebaudiósido-A en comparación con la fertilización convencional, al aumentar el nivel de transcripción de genes clave en la biosíntesis de glucósidos de esteviol.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. General

Evaluar consorcios de hongos micorrícicos arbusculares nativos, en interacción con niveles de fósforo, para promover el crecimiento, aumentar la producción de biomasa y la expresión de genes clave que estimulan la concentración de esteviósido y rebaudiósido-A en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertonii.

1.4.2. Específicos

Obtener consorcios de hongos micorrícicos arbusculares nativos provenientes de suelos del estado de Yucatán.

Evaluar el efecto de consorcios de hongos micorrícicos arbusculares nativos en interacción con niveles de fósforo en la promoción del crecimiento, biomasa y tasa fotosintética de *S. rebaudiana* en condiciones de invernadero.

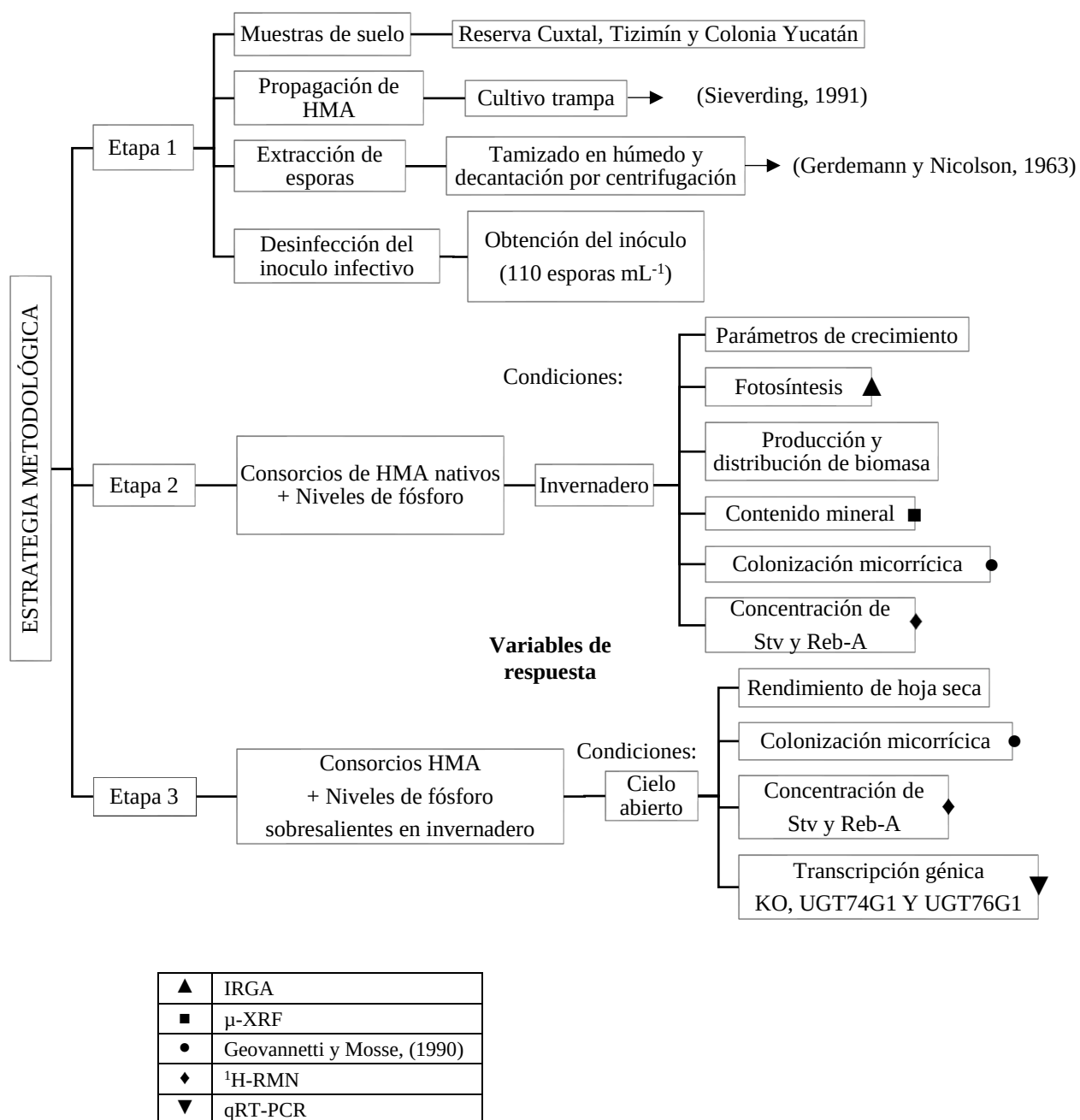
Determinar la concentración de esteviósido y rebaudiósido-A en hojas de *S. rebaudiana*.

Estimar el efecto del consorcio de hongos micorrícicos arbusculares y niveles de fósforo sobresalientes en invernadero, en el rendimiento de *S. rebaudiana* en condiciones de cielo abierto.

Determinar los niveles de expresión de los genes kaureno oxidasa y glicotransferasas UGT74G1 y UGT76G1 involucrados en la ruta de biosíntesis de esteviósido y rebaudiósido-A en *S. rebaudiana*.

1.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El diseño metodológico de este estudio se sintetiza en el siguiente esquema (Figura 1.1):



Esquema general del diseño metodológico

1.6. LITERATURA CITADA

- Abbas Momtazi-Borojeni, A., Esmaeili, S. A., Abdollahi, E., and Sahebkar, A. 2017. A review on the pharmacology and toxicology of steviol glycosides extracted from *Stevia rebaudiana*. *Current pharmaceutical design*, 23(11), 1616-1622.
- Abou-Arab, E. A., and Abu-Salem, F. M. 2010. Evaluation of bioactive compounds of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 1(4), 209-224.
- Adolfsson, L., Solymosi, K., Andersson, M. X., Keresztes, Á., Uddling, J., Schoefs, B., and Spetea, C. 2015. Mycorrhiza symbiosis increases the surface for sunlight capture in *Medicago truncatula* for better photosynthetic production. *PLoS One*, 10(1), e0115314.
- Ahmad, J., Khan, I., Blundell, R., Azzopardi, J., and Mahomoodally, M. F. 2020. *Stevia rebaudiana* Bertoni.: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety. *Trends in Food Science and Technology*, 100, 177-189.
- Ahmed, B., Hossain, M., Islam, R., Kumar Saha, A., and Mandal, A. 2011. A review on natural sweetener plant–*Stevia* having medicinal and commercial importance. *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 73(1-2), 75-91.
- Alizadeh, O. 2011. Mycorrhizal symbiosis. *Stud Biol*, 6(3), 273-281.
- Alonzo-Torres M. 2007. Uso del Ka´a He´e en la horticultura. En: Producción de hortalizas todo el año. Mod. IV. Producción de Kaa Hee. Provincia de Formosa. Argentina. 13 p.
- Bagyaraj, D. J., Sharma, M. P., and Maiti, D. 2015. Phosphorus nutrition of crops through arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Science*, 1288-1293.
- Becquer, A., Trap, J., Irshad, U., Ali, M. A., and Claude, P. 2014. From soil to plant, the journey of P through trophic relationships and ectomycorrhizal association. *Frontiers in plant science*, 5, 548.

- Brandle J. E., and Telmer P. G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68 (14), 1855-1863.
- Bucher, M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist*, 173(1), 11-26.
- Cauich Cauich, R., Pérez Gutiérrez, A., Lozano Contreras, M. G., Garruña, R., and Ruíz Sánchez, E. 2018. Productivity of *Stevia rebaudiana* Bertoni with different irrigation slides and microbial inoculants. *Nova scientia*, 10(20), 30-46.
- Cauich-Cauich, R., Tun-Suárez, J., M., Herrera-Parra, E., Cristóbal-Alejo, J., and Lozano-Contreras, M., G. 2022. Arbuscular mycorrhizal symbiosis as sustainable alternative in the *Stevia rebaudiana* Bertoni production. *Agroproductividad*, 15(1), 1-9.
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA). 2018. Oportunidades para la agricultura en México: La estevia. Poder Legislativo Federal Cámara de Diputados. CDMX, México. Pp: 13. Disponible en <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/92Estevia.pdf>. (Consulta: 11/nov/2021).
- Cervantes-Gámez, R. G., Bueno-Ibarra, M. A., Cruz-Mendivil, A., Calderón-Vázquez, C. L., Ramírez-Douriet, C. M., Maldonado-Mendoza, I. E., and López-Meyer, M. 2016. Arbuscular mycorrhizal symbiosis-induced expression changes in *Solanum lycopersicum* leaves revealed by RNA-seq analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(1), 89-102.
- Copetta A., Lingua G., and Berta G. 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. *Mycorrhiza* 16, 485–494.
- Cordoba, E., Salmi, M., and León, P. 2009. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *Journal of experimental botany*, 60(10), 2933-2943.
- Das, K., Dang, R., and Shivananda, T. N. 2008. Influence of bio-fertilizers on the availability of nutrients (N, P and K) in soil in relation to growth and yield of *Stevia rebaudiana*

- grown in South India. International Journal of Applied Research in Natural Products, 1(1), 20-24.
- Ezawa, T., and Saito, K. 2018. How do arbuscular mycorrhizal fungi handle phosphate? New insight into fine-tuning of phosphate metabolism. New phytologist, 220(4), 1116-1121.
- Fronza D. and Folegatti M. 2003. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton) crop estimated through microlysimeter. Scientia Agricola. 60(3), 595-599.
- Gerdemann, J. W., and Nicolson, T. H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological society, 46(2), 235-244.
- Geuns J. M. C. 2003. Stevioside. Phytochemistry 64, 913–921.
- Gianinazzi S., Gollotte A., Binet M. N., van Tuinen D., Redecker D., and Wipf D. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. Mycorrhiza 20, 519–530.
- Giovannini, L., Palla, M., Agnolucci, M., Avio, L., Sbrana, C., Turrini, A., and Giovannetti, M. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbiota as plant biostimulants: research strategies for the selection of the best performing inocula. Agronomy, 10(1), 106.
- Giovannetti, M., Avio, L., and Sbrana, C. 2010. Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth—physiological and genetic aspects. In Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. 3-32. Springer, Dordrecht.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., and Strani, P. 2004. Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. New Phytologist, 175-181.
- Giovannetti, M., and Avio, L. 2002. Biotechnology of arbuscular mycorrhizas. In Applied mycology and biotechnology. 2. 275-310. Elsevier

- Giovannetti, M. 2000. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. In *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. 47-68. Springer, Dordrecht.
- González-Moralejo A. 2011. Aproximación a la comprensión de un endulzante natural alternativo, la *Stevia rebaudiana* Bertoni: producción, consumo y demanda potencial. *Revista agroalimentaria*. 17(32), 57-69.
- Goyal, S. K., Samsher, and Goyal, R. K. 2010. *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: a review. *International journal of food sciences and nutrition*, 61(1), 1-10.
- Guerra-Sierra, B. E. 2008. Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Revista Tecnología en Marcha*, 21(1), 191.
- Gupta P., Sharma S., and Saxena S. 2014. Effect of salts (NaCl and Na₂ CO₃) on callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* for steviol glycoside production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(6), 2894-2906.
- Hanson, J. R., and White, A. F. 1968. Studies in terpenoid biosynthesis—II: The biosynthesis of steviol. *Phytochemistry*, 7(4), 595-597.
- Harrison, M. J., Dewbre, G. R., and Liu, J. 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell*, 14(10), 2413-2429.
- Hazzoumi, Z., Moustakime, Y., and Joutei, K. A. 2017. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and water stress on ultrastructural change of glandular hairs and essential oil compositions in *Ocimum gratissimum*. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 1-13.
- Hossain, M. F., Islam, M. T., Islam, M. A., and Akhtar, S. 2017. Cultivation and uses of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): A review. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 17(4), 12745-12757.
- Huang X., Fu J., and Di D. 2010. Preparative isolation and purification of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni using high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*. 71, 220-224.

- Humphrey, T. V., Richman, A. S., Menassa, R., and Brandle, J. E. 2006. Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis. *Plant molecular biology*, 61(1), 47-62.
- Kapoor R., Chaudhary V., and Bhatnagar A.K. 2007. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza* 17, 581-587.
- Kemp, L. E., Alphey, M. S., Bond, C. S., Ferguson, M. A., Hecht, S., Bacher, A., and Hunter, W. N. 2005. The identification of isoprenoids that bind in the intersubunit cavity of *Escherichia coli* 2C-methyl-D-erythritol-2, 4-cyclodiphosphate synthase by complementary biophysical methods. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 61(1), 45-52.
- Kiers, E. T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J. A., Franken, O., Verbruggen, E., and Bücking, H. 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *science*, 333(6044), 880-882.
- Kim, K. K., Sawa, Y., and 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*, 332(2), 223-230.
- Kim J. H., Sung N. Y., Know S. K., Jung P. M., Choi J. I., Yoon Song B. S., Yoon T. Y., Kee H. J. and Lee J. W. 2010. Antioxidant activity of *stevia* leaf extracts prepared by various extraction methods. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 39(2), 313-318.
- Kikuchi, Y., Hijikata, N., Ohtomo, R., Handa, Y., Kawaguchi, M., Saito, K., and Ezawa, T. 2016. Aquaporin-mediated long-distance polyphosphate translocation directed towards the host in arbuscular mycorrhizal symbiosis: application of virus-induced gene silencing. *New Phytologist*, 211(4), 1202-1208.
- Kovačević, D. B., Maras, M., Barba, F. J., Granato, D., Roohinejad, S., Mallikarjunan, K., and Putnik, P. 2018. Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: A review. *Food chemistry*, 268, 513-521.

- Kumar, H., Kaul, K., Bajpai-Gupta, S., Kaul, V. K., and Kumar, S. 2012. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene*, 492(1), 276-284.
- Kuzuyama, T., Takagi, M., Takahashi, S., and Seto, H. 2000. Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 182(4), 891-897.
- Khaosaad T., Vierheilig H., Nell M., Zitterl-Eglseer K., and Novak J. 2006. Arbuscular mycorrhiza alters the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp. Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16, 443–446.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Rojas, P., Stucken, K., Delporte, C., Valenzuela-Barra, G. and Pasten, A. 2018. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory potential of *Stevia rebaudiana* leaves: effect of different drying methods. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 11, 37-46.
- Lemus-Mondaca, R., Ah-Hen, K., Vega-Gálvez, A., Honores, C., and Moraga, N. O. 2016. *Stevia rebaudiana* leaves: effect of drying process temperature on bioactive components, antioxidant capacity and natural sweeteners. *Plant foods for human nutrition*, 71(1), 49-56.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., and 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.
- Luginbuehl, L. H., Menard, G. N., Kurup, S., Van Erp, H., Radhakrishnan, G. V., Breakspear, A., and Eastmond, P. J. 2017. Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science*, 356(6343), 1175-1178.
- Madan S., Ahmad S., Singh G. N., Kohli K., Kumar Y., Singh R., and Garg M. 2010. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni—a review. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 1,267–286.

- Mamta R. P., Pathania V., Gulati A., Singh B., Bhanwra R. K., and Tewari R. 2010. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, steviol and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Appl. Soil Ecol.* 46, 222–229.
- Mandal, S., Upadhyay, S., Singh, V. P., and 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.
- Mandal, S., Evelin, H., Giri, B., Singh, V. P., and Kapoor, R. 2013. Arbuscular mycorrhiza enhances the production of steviol and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. *Applied soil ecology*, 72, 187-194.
- Mikkelsen, B. L., Rosendahl, S., and Jakobsen, I. 2008. Underground resource allocation between individual networks of mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 180(4), 890-898.
- Mohamed, A. A., Ceunen, S., Geuns, J. M., Van den Ende, W., and De Ley, M. 2011. UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides. *Journal of plant physiology*, 168(10), 1136-1141.
- Montaño, N. M., Alarcón, A., Camargo-Ricalde, S. L., Hernández-Cuevas, L. V., Álvarez-Sánchez, J., González-Chávez, M. A., and Ferrera-Cerrato, R. 2012. Research on arbuscular mycorrhizae in Mexico: an historical synthesis and future prospects. *Symbiosis*, 57(3), 111-126.
- McGarvey, D. J., and Croteau, R. 1995. Terpenoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1015.
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., and Swan, J. A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist*, 115(3), 495-501.
- Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U., and Reinhardt, D. 2015. Correction: Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS One*, 10(4), e0127472.

- Okada, A., Shimizu, T., Okada, K., Kuzuyama, T., Koga, J., Shibuya, N., and Yamane, H. 2007. Elicitor induced activation of the methylerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. *Plant molecular biology*, 65(1), 177-187.
- Pal, P. K., Prasad, R., and Pathania, V. 2013. Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Plant Physiology*, 170(17), 1526-1535.
- Ramírez-Jaramillo, G., Lozano-Contreras, M. G., Moguel-Ordoñ, Y. B., Aviles-Baeza, W. I., and Ramírez-Silva, J. H. 2021. A Review of Research Results on *Stevia rebaudiana* Bertoni in Yucatan Mexico from 2010 to 2017. *Open Access Library Journal*, 8(12), 1-15.
- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S. L., Morton, J. B., and Walker, C. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*, 23(7), 515-531.
- Real-Santillán, R. O., Del-Val, E., Cruz-Ortega, R., Contreras-Cornejo, H. Á., González-Esquivel, C. E., and Larsen, J. 2019. Increased maize growth and P uptake promoted by arbuscular mycorrhizal fungi coincide with higher foliar herbivory and larval biomass of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Mycorrhiza*, 29(6), 615-622.
- Richman, A., Swanson, A., Humphrey, T., Chapman, R., McGarvey, B., Pocs, R., and Brandle, J. 2005. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *The Plant Journal*, 41(1), 56-67.
- Richman, A. S., Gijzen, M., Starratt, A. N., Yang, Z., and Brandle, J. E. 1999. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *The Plant Journal*, 19(4), 411-421.
- Ruiz-Ruiz, J. C., Moguel-Ordonez, Y. B., Matus-Basto, A. J., and Segura-Campos, M. R. 2015. Nutritional, amylolytic enzymes inhibition and antioxidant properties of bread incorporated with *Stevia rebaudiana*. *International journal of food sciences and nutrition*, 66(6), 649-656.

- Ruth, B., Khalvati, M., and Schmidhalter, U. 2011. Quantification of mycorrhizal water uptake via high-resolution on-line water content sensors. *Plant and soil*, 342(1), 459-468.
- Sarmiento-López, L. G., López-Meyer, M., Sepúlveda-Jiménez, G., Cárdenas, L., and 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, 1-23.
- Sato N. 2003. The miracles and mysteries of *Stevia*. The Anti-oxidizing Plant. Tokyo: Seishun Shuppanasha.
- Sieverding, E., Friedrichsen, J., and Suden, W. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Sonderpublikation der GTZ (Germany).
- Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. Nueva Generación (SIACON NG). Reporte anual estadístico de Agricultura. SADER. Disponible en <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430>. (Consulta: 17/Marzo/2022).
- Silverstone, A. L., Chang, C. W., Krol, E., and Sun, T. P. 1997. Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene GA1 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 12(1), 9-19.
- Sbrana, C., and Giovannetti, M. 2005. Chemotropism in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*, 15(7), 539-545.
- Sharma, S., Walia, S., Singh, B., and Kumar, R. 2016. Comprehensive review on agro technologies of low-calorie natural sweetener stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): a boon to diabetic patients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(6), 1867-1879.
- Smith, S. E., and Read, D. J. 2010. Mycorrhizal symbiosis. Academic press. 13-18.
- Smith, S. E., and Smith, F. A. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review of plant biology*, 62, 227-250.

- Smith, F. A., and Smith, S. E. 1997. Tansley review no. 96 structural diversity in (vesicular)–arbuscular mycorrhizal symbioses. *The New Phytologist*, 137(3), 373-388.
- Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F., and Kaul, V. K. 2013. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Complications*, 27(2), 103-113.
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., and Stajich, J. E. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028-1046.
- Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H., and Seto, H. 1998. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 9879-9884.
- Tavarini, S., Passera, B., Martini, A., Avio, L., Sbrana, C., Giovannetti, M., and Angelini, L. G. 2018. Plant growth, steviol glycosides and nutrient uptake as affected by arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorous fertilization in *Stevia rebaudiana* Bert. *Industrial Crops and Products*, 111, 899-907.
- Toussaint J. P., Smith F. A., and Smith S. E. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. *Mycorrhiza* 17, 291–297.
- Wanke, M., Skorupinska-Tudek, K., and Swiezewska, E. 2001. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. *Acta Biochimica Polonica*, 48(3), 663-672.
- Wölwer-Rieck, U. 2012. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(4), 886-895.
- Zeng Y., Guo L. P., Che D. B., Hao Z. P., Wang J. Y., Huang L. Q., Yang G., Cui X. M., Yang L., Wu Z. X., Chen M. L., and Zhang Y. 2013. Arbuscular mycorrhizal

symbiosys and active ingredients of medicinal plants: current research status and perspectives. *Mycorrhiza* 23, 253–265.

Zubek, S., Rola, K., Szewczyk, A., Majewska, M. L., and Turnau, K. 2015. Enhanced concentrations of elements and secondary metabolites in *Viola tricolor* L. induced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 390(1), 129–142.

Zubek S., Mielcarek S., and Turnau K. 2012. Hypericin and pseudohypericin concentrations of a valuable medicinal plant *Hypericum perforatum* L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 22, 149–156.

II. CAPITULO 2. EVALUACIÓN DE CONSORCIOS MICORRÍCICOS ARBUSCULARES NATIVOS EN INTERACCIÓN CON NIVELES DE FÓSFORO EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO Y FOTOSÍNTESIS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni EN CONDICIONES DE INVERNADERO

Rodrigo A. Cauich-Cauich¹, José M. Tun-Suárez¹, Jairo Cristóbal-Alejo¹, Elizabeth de J. Herrera-Parra², Rubén H. Andueza-Noh¹, Mónica G. Lozano-Contreras²

¹Departamento de Estudios de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México, Conkal, Yucatán, México.

²Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Mocochoá, Yucatán, México.

Artículo publicado en la Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, año 2023

<https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1765>

Tesista: rodrigo.cauich@itconkal.edu.mx

Director: jose.tun@itconkal.edu.mx

Autor de correspondencia: lozano.monica@inifap.gob.mx

2.1. RESUMEN Y ABSTRACT

La creciente demanda tanto de hojas como de glucósidos de esteviol purificados de *Stevia rebaudiana* Bertoni como edulcorante natural, exige la búsqueda de sistemas de producción más sostenibles, con el fin de garantizar la disponibilidad y calidad de las materias primas agrícolas. El fósforo es indispensable en este cultivo, al estar involucrado en procesos de transformación de energía y biosíntesis de fitoquímicos, su poca disponibilidad retarda el crecimiento y trae como consecuencia una baja producción del cultivo. La simbiosis de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) representa una vía sostenible para aumentar la producción de los cultivos, gracias a una mejor absorción de nutrientes, particularmente de fósforo (P). Si bien se ha demostrado que los HMA mejoran el crecimiento y la producción de biomasa en varios cultivos de interés, no se ha estudiado el efecto de consorcios de HMA nativos sobre *S. rebaudiana*. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de consorcios de HMA nativos en interacción con niveles de fósforo en *S. rebaudiana*, para

promover su crecimiento y producción de biomasa en condiciones de invernadero. Los tratamientos consistieron en la fertilización con 0, 25, 50, 75 y 100 % de fósforo en base a su requerimiento nutricional, en plantas previamente inoculadas con los consorcios nativos RC, TZ y CY, nombrados según su lugar de origen. Los resultados indicaron que, a bajas concentraciones de fósforo, hay mayor colonización micorrícica. Los tratamientos RC+25%P y CY+25%P aumentaron el crecimiento, mejoraron la arquitectura aérea de las plantas y la producción de biomasa, derivado de un mayor contenido de clorofila, mejor tasa fotosintética y mayor absorción de nutrientes con respecto a plantas no inoculadas.

Palabras Clave: hoja dulce, edulcorante natural, asociación, colonización, fosfato.

The growing demand for both leaves and purified steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural sweetener requires the search for more sustainable production systems, to guarantee the availability and quality of agricultural raw materials. Phosphorus is essential in this crop, as it is involved in processes of energy transformation and biosynthesis of phytochemicals, its low availability retards growth and results in low crop production. The symbiosis of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) represents a sustainable way to increase crop production, thanks to a better absorption of nutrients, particularly phosphorus (P). Although AMFs have been shown to improve growth and biomass production in several crops of interest, the effect of native AMF consortia on *S. rebaudiana* has not been studied. The objective of the present study was to evaluate the effect of native AMF consortia in interaction with phosphorus levels in *S. rebaudiana*, to promote its growth and biomass production under greenhouse conditions. The treatments consisted of fertilization with 0, 25, 50, 75 and 100% phosphorus based on their nutritional requirement, in plants previously inoculated with the native consortia RC, TZ and CY, named according to their place of origin. The results indicated that, at low phosphorus concentrations, there is greater mycorrhizal colonization. The RC+25%P and CY+25%P treatments increased growth, improved aerial architecture of plants and biomass production, derived from higher chlorophyll content, better photosynthetic rate and higher nutrient absorption compared to plants not inoculated.

Keywords: sweet grass, natural sweetener, association, colonization, phosphate.

III. CAPITULO 3. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE ¹H-RMN DE ESTEVIÓSIDO Y REBAUDIÓSIDO-A EN *Stevia rebaudiana* Bertoni EN INTERACCIÓN CON MICORRIZAS ARBUSCULARES Y FÓSFORO.

Rodrigo A. Cauich-Cauich¹, Emanuel Hernández-Núñez², Mónica G. Lozano-Contreras³,
José M. Tun-Suárez¹, Hugo Pilotzi-Xahuetital², Rubén H. Andueza-Noh¹, Carlos J.
Alvarado-López¹

¹Departamento de Estudios de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México, Conkal, Yucatán, México.

Departamento de Recursos de Mar, Cinvestav-IPN Unidad Mérida, Yucatán, México.

³Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Mocochoá, Yucatán, México.

Artículo aceptado en la Revista Biotecnia, año 2024

Tesista: rodrigo.cauich@itconkal.edu.mx

Director: jose.tun@itconkal.edu.mx

3.1. RESUMEN Y ABSTRACT

Stevia rebaudiana produce glucósidos de esteviol en sus hojas, el esteviósido y rebaudiósido-A son los de mayor importancia por su propiedad edulcorante. El fósforo es un elemento esencial en la producción de glucósidos ya que se encuentra involucrado en la biosíntesis. Las micorrizas arbusculares pueden promover la concentración de glucósidos por su afinidad en la traslocación de fósforo. Por tanto, se determinó por resonancia magnética nuclear (¹H-RMN) el contenido de esteviósido y rebaudiósido-A en plantas previamente inoculadas con consorcios de micorrizas arbusculares (consorcios RC, TZ y CY) y fertilizadas con diferentes dosis de fósforo (25, 50, 75 y 100%). Los resultados mostraron que hubo un 76% de colonización micorrícica con el tratamiento RC más 25% de fósforo, donde también se registró mayor cantidad de fósforo foliar y alto contenido de esteviósido y rebaudiósido-A en mg g⁻¹ de hoja seca, superando significativamente a la fertilización convencional. Esta combinación fue la más efectiva para lograr un mayor rendimiento de esteviósido y rebaudiósido-A en hojas de *S. rebaudiana*. Además, se destaca que el método ¹H-RMN se

utilizó como una alternativa viable a la HPLC para cuantificar los principales glucósidos de esteviol. Este método proporciona resultados cuantitativos en menos tiempo y con la misma precisión.

Palabras clave: metabolitos, estevia, HMA, fósforo, RMN.

Stevia rebaudiana produces steviol glycosides in its leaves, stevioside and rebaudioside-A are the most important due to their sweetening property. Phosphorus is an essential element in the production of glycosides since it is involved in biosynthesis. Arbuscular mycorrhizae can promote glycoside concentration due to their affinity for phosphorus translocation. Therefore, the content of stevioside and rebaudioside-A was determined by ^1H -NMR in plants previously inoculated with arbuscular mycorrhizal consortia (RC, TZ and CY consortia) and fertilized with different doses of phosphorus (25, 50, 75 and 100%). The results showed that there was 76% mycorrhizal colonization with the RC treatment plus 25% phosphorus, where a greater amount of foliar phosphorus and high content of stevioside and rebaudioside-A in mg g^{-1} of dry leaf were also recorded, significantly exceeding to conventional fertilization. This combination was the most effective to achieve a higher yield of stevioside and rebaudioside-A in *S. rebaudiana* leaves. Furthermore, it is highlighted that the ^1H -NMR method was used as a viable alternative to HPLC to quantify the main steviol glycosides. This method provides quantitative results in less time and with the same precision.

Keywords: metabolites, stevia, HMA, phosphorus, NMR.

IV. CAPÍTULO 4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR DE GENES BIOSINTÉTICOS DE ESTEVIÓSIDO Y REBAUDIÓSIDO-A EN PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni EN INTERACCIÓN CON HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES Y FÓSFORO EN CONDICIONES DE CIELO ABIERTO.

Rodrigo A. Cauich-Cauich¹, Aída Martínez Hernández², Emanuel Hernández-Núñez³,
Mónica G. Lozano-Contreras⁴, José M. Tun-Suárez¹, Elizabeth de J. Herrera-Parra⁴

¹Departamento de Estudios de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México, Conkal, Yucatán, México.

²Colegio de Postgraduados campus Campeche, Champotón, Campeche, México.

³Departamento de Recursos de Mar, Cinvestav-IPN Unidad Mérida, Yucatán, México.

⁴Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Mococho, Yucatán, México.

Artículo en revisión

Tesista: rodrigo.cauich@itconkal.edu.mx

Director: jose.tun@itconkal.edu.mx

4.1. RESUMEN Y ABSTRACT

Stevia rebaudiana Bertoni produce glucósidos de esteviol; esteviósido (Stv) y rebaudiósido-A (Reb-A) que se valoran en la industria alimentaria como edulcorantes naturales sin calorías. La inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en las plantas, puede hacer eficiente la asimilación de fosforo y aumentar la producción de Stv y Reb-A en las hojas aumentando el nivel de expresión de genes, sin embargo, se sabe que altas concentraciones de P puede afectar la colonización de HMA y el efecto depende de la especie de planta. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la inoculación con un consorcio nativo de HMA junto con niveles de P en el contenido de Stv y Reb-A y el nivel de expresión de los genes Kaureno oxidasa (KO), glucosiltransferasas UGT74G1 y UGT76G1 involucrados en la ruta de biosíntesis en plantas de *S. rebaudiana*, variedad Ch'ujuk crecidas en condiciones a cielo abierto. Los resultados indicaron que la baja concentración de P indujo 64% de colonización por HMA en raíces de *S. rebaudiana* var.

Ch'ujuk. La transcripción de los genes KO y UGT76G1 fue mayor en plantas fertilizadas con 25 y 75% de P, la expresión de UGT74G1 fue mayor solo con 25% de P, mientras que en las plantas colonizadas por HMA no hubo efectos significativos en los niveles de expresión génica, lo que fue consistente con las tendencias observadas en el contenido de Stv y Reb-A. La inoculación de HMA en consorcio no favoreció la expresión génica en *S. rebaudiana* variedad Ch'ujuk. La fertilización con 25% de P mejoró el contenido de Stv y Reb-A regulando la transcripción de los genes KO, UGT74G1 y UGT76G1 que participan en la síntesis de Stv y Reb-A en *S. rebaudiana* variedad Ch'ujuk.

Palabras clave: genes, glucósidos, estevia, HMA, fósforo.

Stevia rebaudiana Bert. produces steviol glycosides; Stevioside (Stv) and Rebaudioside-A (Reb-A) which are valued in the food industry as natural zero-calorie sweeteners. The inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in plants can make phosphorus assimilation efficient and increase the production of Stv and Reb-A in the leaves by increasing the level of expression of biosynthetic genes, however, it is known that high concentration of P can affect AMF colonization and the effect depends on the plant species. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of inoculation with a native AMF consortium together with P levels on the content of Stv and Reb-A and the expression level of the genes Kaureno oxidase (KO), glucosyltransferases UGT74G1 and UGT76G1 involved in the biosynthesis pathway in *S. rebaudiana* Bertoni plants, variety Ch'ujuk grown in open air conditions. The results indicated that the low concentration of P induced a high percentage of colonization by AMF in roots of *S. rebaudiana* var. Ch'ujuk. The transcription of the KO and UGT76G1 genes was higher in plants fertilized with 25 and 75% P, the expression of UGT74G1 was higher only with 25% P, while in plants colonized by AMF there were no significant effects on the levels of gene expression, which was consistent with the trends observed in Stv and Reb-A content. AMF inoculation in consortium did not favor gene expression in *S. rebaudiana* variety Ch'ujuk. Fertilization with 25% P improved the content of Stv and Reb-A by regulating the transcription of the KO genes, UGT74G1 and UGT76G1 that participate in the synthesis of Stv and Reb-A in *S. rebaudiana* variety Ch'ujuk.

Keywords: genes, glycosides, stevia, HMA, phosphorus.