

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO UNIVERSITARIO DE SAN MARCOS
CARRERA DE INGENIERO AGRÓNOMO CON ORIENTACIÓN EN
AGRICULTURA SOSTENIBLE



TÍTULO:

REPRODUCCIÓN IN VITRO Y ACLIMATACION BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DEL CULTIVO DE STEVIA (*Stevia rebaudiana Bertoni.*) EN EL MUNICIPIO DE SAN PEDRO SACATEPÉQUEZ, DEPARTAMENTO DE SAN MARCOS.

PRESENTADA POR:

ALMA YESENEA LUX CARDONA

CARNÉ: 201140575

ASESORES

Ing. Agr. Osberto Maldonado De León

Inga. Agr. Danna Del Rosario Díaz Méndez

SAN MARCOS, GUATEMALA 2018

TITULO

REPRODUCCIÓN IN VITRO Y ACLIMATACION BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DEL CULTIVO DE STEVIA (*Stevia rebaudiana Bertoni.*) EN EL MUNICIPIO DE SAN PEDRO SACATEPÉQUEZ, DEPARTAMENTO DE SAN MARCOS.

INDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
II	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
III	JUSTIFICACIÓN.....	4
IV	MARCO TEÓRICO	6
4.1	DESCRIPCIÓN MORFOLOGIA DE LA PLANTA DE STEVIA.....	6
4.2	ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN	7
4.3	CONSIDERACIONES MÉDICAS	8
4.3.1	Efecto en la diabetes	8
4.3.2	Otros efectos biológicos y aplicaciones terapéuticas de la Stevia.....	9
4.3.3	Características químicas de los Steviósidos	10
4.4	ASPECTOS AGROECOLOGICOS.....	11
4.4.1	Precipitación	11
4.4.2	Temperatura.....	11
4.4.3	Humedad.....	11
4.4.4	Luminosidad.....	11
4.4.5	Suelo.....	12
4.5	VARIEDADES	12
4.6	MÉTODOS DE PROPAGACIÓN DE STEVIA.....	13
4.6.1	Propagación sexual	13
4.6.2	Propagación asexual	14
4.6.3	Micropropagación en la producción de plantas	14
4.6.4	Fases de la micropropagación.....	15
4.6.5	La cutícula.....	17

4.6.6	Los estomas.	17
4.6.7	Fotosíntesis.	18
4.6.8	Las raíces.	18
4.6.9	Intensidad lumínica.....	18
4.6.10	Temperatura.....	18
4.6.11	Medio de cultivo y sus componentes.....	19
4.7	INVESTIGACIONES DEL CULTIVO IN VITRO DE STEVIA	20
4.7.1	Inducción de organogénesis directa.....	20
4.7.2	Organogénesis directa a partir de puntos directos de crecimiento	21
4.8	IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	22
4.9	MERCADO DE STEVIA (<i>Stevia Rebaudiana</i>) EN GUATEMALA.....	23
4.10	METODOLOGÍA	24
4.10.1	Investigación Cualitativa Descriptiva:.....	24
4.10.2	Estadística Descriptiva:	25
V	MARCO REFERENCIAL	26
5.1	UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....	26
5.2	COLINDANCIAS.....	26
5.3	OROGRAFÍA	26
5.4	CLIMA.....	26
5.5	ESTRUCTURA ESPACIAL O DISTRIBUCIÓN ACTUAL.....	27
VI	OBJETIVOS	28
6.1	GENERAL.....	28
6.2	ESPECIFICO	28
VII	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
7.1	MATERIALES Y EQUIPO.....	29

7.2	MATERIALES DE LABORATORIO	29
7.3	MATERIALES DE CAMPO.....	29
7.4	RECURSOS HUMANOS.....	30
7.5	INSTITUCIONALES	30
VIII	METODOLOGÍA.....	31
8.1	FASE I: INDUCCIÓN DEL CULTIVO IN VITRO DE STEVIA (<i>Stevia rebaudiana</i>) PARA SU MICROPROPAGACIÓN.	31
8.1.1	Etapa 0: selección de la planta madre.....	31
8.1.2	Etapa I: Selección, preparación y desinfección de los explantes.	32
8.1.3	Etapa II: preparación del medio de cultivo.....	33
8.1.4	Proceso de elaboración del medio de cultivo.	34
8.1.5	Etapa III: siembra e incubación de los explantes al medio de cultivo.....	35
8.1.6	Etapa IV: control del desarrollo de los explantes	35
8.1.7	Etapa V: resiembra de explantes para la formación de raíces	37
8.1.8	Etapa VI o Final: preparación de las plantas previo a la siembra en sustrato .	37
8.2	FASE II: ADAPTACIÓN Y ACLIMATACIÓN DEL CULTIVO DE STEVIA (<i>Stevia rebaudiana</i>) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.....	37
8.2.1	Construcción del invernadero para la adaptación del cultivo de Stevia	38
8.2.2	Instalación del cultivo de <i>Stevia rebaudiana</i> dentro del micro invernadero. ..	40
8.2.3	Control del desarrollo de adaptación de las plantas de <i>Stevia rebaudiana</i>	42
8.2.4	Periodo de la adaptación y aclimatación bajo condiciones controladas	43
8.3	FASE III: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.	44
IX	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
9.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	45
9.2	RESULTADOS FASE I: INDUCCIÓN DEL CULTIVO IN VITRO DE STEVIA (<i>Stevia rebaudiana</i>) PARA SU MICROPROPAGACIÓN.	47

9.2.1	Características del material vegetal	47
9.2.2	Desinfección superficial y preparación del material vegetal.....	48
9.2.1	ESTABLECIMIENTO DE LOS EXPLANTES	52
9.2.2	Resultados del alargamiento de los brotes por explantes	63
9.2.3	Determinación del porcentaje de enraizamiento de las microplantas de Stevia en cultivo in vitro.....	82
9.3	RESULTADOS FASE II: ADAPTACIÓN Y ACLIMATACIÓN DEL CULTIVO DE STEVIA (<i>Stevia rebaudiana</i>) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS	85
9.3.1	Uso de macrotúnel para la aclimatación de <i>Stevia rebaudiana</i> en invernadero	85
9.3.2	Transferencia de las vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> al macrotúnel.....	86
X	CONCLUSIONES	104
XI	RECOMENDACIONES	107
11.1	Propias de la investigación.....	107
11.2	A instituciones, empresas privadas agrícolas y entes interesados en la producción agrícola	107
11.3	A la universidad	108
XII	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	109
XIII	PRESUPUESTO.....	110
XIV	BIBLIOGRAFIA	111
XV	ANEXO	118
XVI	GLOSARIO DE TERMINOS.....	124

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. <i>Formulación y preparación del medio nutritivo utilizado para la micropropagación in vitro de Stevia rebaudiana.</i>	34
Cuadro 2. Variables evaluadas para la tabulación de los datos del desarrollo del cultivo in vitro de Stevia rebaudiana.....	36
Cuadro 3. Observaciones para la adaptación y aclimatación de las plantas de Stevia.....	43
Cuadro 4. <i>Diferentes dosis empleadas para la desinfección de los explantes de Stevia rebaudiana con el fungicida sistémico Amistar.</i>	49
Cuadro 5 <i>Pruebas del coeficiente de Pearson</i>	61
Cuadro 6 <i>Crecimiento vegetativo de los brotes en los explantes de Stevia a los 8 días después de la siembra.</i>	64
Cuadro 7 <i>Crecimiento vegetativo de los brotes en los explantes de Stevia a los 15 días después de la siembra.</i>	67
Cuadro 8 <i>Análisis de medias para las alturas de los brotes en los explante, a los 15 días después de la siembra in vitro.</i>	69
Cuadro 9 <i>Crecimiento vegetativo de los brotes en los explantes de Stevia a los 30 días después de la siembra.</i>	70
Cuadro 10 <i>Análisis de medias para las alturas de los brotes en los explante, a los 30 días después de la siembra en in vitro.</i>	71
Cuadro 11 <i>Crecimiento vegetativo de los brotes en los explantes de Stevia a los 45 días después de la siembra.</i>	73
Cuadro 12 <i>Análisis de medias para las alturas de los brotes en los explante, a los 45 días después de la siembra en in vitro.</i>	75
Cuadro 13 <i>Efecto del tipo y nivel de auxina en el número de plantas enraizadas y el tipo de enraizamiento in vitro de Stevia rebaudiana</i>	84
Cuadro 14 <i>Altura Promedio de Vitroplantas durante la aclimatación de Stevia. Altura inicial a la altura final a los 60 días después del trasplante (ddt).</i>	94
Cuadro 15 <i>Desarrollo de hojas durante los 60 días de adaptación del cultivo de Stevia.</i> .	99
Cuadro 16. Cronograma de actividades	109
Cuadro 17 Presupuesto de la investigación.....	110

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfología de la hoja con disposición opuesta en su estado juvenil.....	6
Figura 2 Presencia de floración cuando las plantas llegan a su madurez fisiológica.	7
Figura 3. Plano del Diseño del macrotunel, dimensiones y distribución de las vitroplantas dentro del macrotunel.	39
Figura 4 Caja germinadoras (domo para pastel) para adaptación de las vitroplantas en los primeros días después del traspaso del medio de cultivo al sustrato.	40
Figura 5 Distribución de las plántulas dentro de la caja germinadora.....	40
Figura 6 Inducción del cultivo de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni para su micropropagación en cultivo <i>in vitro</i>	46
Figura 7 Proceso de adaptación y aclimatación del cultivo de <i>Stevia rebaudiana</i> bajo condiciones controladas.	46
Figura 8 Obtención de ramas y explantes con yemas axilares de <i>Stevia rebaudiana</i>	47
Figura 9 Desinfección superficial del material vegetal de <i>Stevia rebaudiana</i> con el fungicida sistémico Amistar.....	48
Figura 10 Alto porcentaje de sobrevivencia de los explantes de <i>Stevia</i> como respuesta del tratamiento A.	49
Figura 11 Presencia de oxidación o clorosis en los tratamiento con un alto grado de concentración (dosis) y tiempo de exposición del Fungicida Amistar.	50
Figura 12 Desinfección de los explantes de <i>Stevia</i> con la dosis recomendada de fungicida Amistar, para el establecimiento en el cultivo <i>in vitro</i>	52
Figura 13 Desinfección de los explantes dentro de la cámara de flujo laminar previo a la siembra en el medio de cultivo.....	53
Figura 14 Preparación del medio Murashige y Skoog a una concentración del 100% para la micropropagación del cultivo de <i>Stevia rebaudiana</i>	54
Figura 15 Siembra de los explantes de <i>Stevia</i> en tubos de ensayo dentro de la cámara de la flujo laminar bajo condiciones asépticas.	55
Figura 16 Incubación de los 100 explantes de <i>Stevia</i> en el cuarto de crecimiento.....	55
Figura 17 Presencia de hongo como contaminante en el medio de cultivo de <i>Stevia</i>	56

Figura 18 <i>Presencia de bacteria como contaminantes dentro del cultivo in vitro de Stevia.</i>	57
Figura 19 <i>Formación de brotes a los 8 días después de la siembra en los explantes de Stevia sin presencia de oxidación.</i>	60
Figura 20 <i>Brotación de los explantes de Stevia como resultado del efecto de los reguladores de crecimiento.</i>	63
Figura 21 <i>Alargamiento de las microplantas de Stevia a los 8 días después de la siembra.</i>	66
Figura 22 <i>Alargamiento de las microplantas de Stevia a los 15 días después de la siembra.</i>	69
Figura 23 <i>Alargamiento de las microplantas de Stevia a los 30 días después de la siembra.</i>	72
Figura 24 <i>Registro del crecimiento de las microplantas a los 45 días in vitro.</i>	74
Figura 25 <i>Crecimiento de las microplantas de Stevia a los 45 días después de la siembra.</i>	76
Figura 26 <i>Proceso de crecimiento de las microplantas hasta los 45 días.</i>	78
Figura 27 <i>Formación y desarrollo foliar de las microplantas de Stevia rebaudiana hasta los 45 días después del trasplante.</i>	82
Figura 28 <i>Obtención de microplantas sin presencia de raíz por el bajo Efecto del tipo y nivel de auxina en el cultivo in vitro de Stevia rebaudiana.</i>	84
Figura 29 <i>Preparación de las microplantas de Stevia rebaudiana en ácido indolbutírico para su aclimatación.</i>	86
Figura 30 <i>Siembra de las vitroplantas en los diferentes contenedores con sustrato peat moss</i>	87
Figura 31 <i>Ubicación de las vitroplantas dentro de las cajas germinadores para su adaptación dentro del macrotunel</i>	88
Figura 32 <i>Sistema de protección para la aclimatación de las vitroplantas de Stevia rebaudiana dentro del macrotunel.</i>	89
Figura 33 <i>Aumento de raíces en las plántulas de Stevia a los 30 días después del trasplante.</i>	93
Figura 34 <i>Adaptación de las vitroplantas dentro del invernadero conforme a su crecimiento (altura).</i>	96

Figura 35 <i>Crecimiento de las vitroplantas dentro de las condiciones controladas hasta los 60 días después del trasplante.</i>	98
Figura 36 <i>Formación y desarrollo de ramificaciones en las vitroplantas en el periodo de 60 días después del trasplante</i>	102
Figura 37 <i>Plantas madres de Stevia rebaudiana de tres meses de edad para la obtención de explantes para su micropropagación.</i>	118
Figura 38 <i>Uso de Cámara de flujo laminar para la esterilización de los explantes de Stevia</i>	118
Figura 39 <i>Cuarto de crecimiento de biotecnología vegetal, área de incubación de las microplantas de Stevia rebaudiana.</i>	119
Figura 40 <i>Materiales para el establecimiento del cultivo in vitro de Stevia rebaudiana.</i>	119
Figura 41 <i>Autoclave para la esterilización de los materiales y medio de cultivo MS.</i>	119
Figura 42 <i>Traslado de las microplantas de Stevia rebaudiana en el cuarto de crecimiento para su incubación.</i>	120
Figura 43 <i>Crecimiento y desarrollo de las microplantas dentro del cuarto de crecimiento hasta los 45 días después de la siembra.</i>	120
Figura 44 <i>Construcción del invernadero para la adaptación y aclimatación de las microplantas del cultivo de Stevia rebaudiana.</i>	121
Figura 45 <i>Registro de temperatura y humedad relativa dentro del sistema de adaptación y aclimatación de las vitroplantas de Stevia rebaudiana.</i>	121
Figura 46 <i>Altura de las microplantas al momento del traspaso de la siembra al invernadero</i>	122
Figura 47 <i>Crecimiento de las vitroplantas de Stevia a los 15 días después de la siembra,</i>	122
Figura 48 <i>Mantenimiento de las vitroplantas de Stevia rebaudiana dentro del invernadero</i>	122
Figura 49 <i>Crecimiento de las vitroplantas de Stevia a los 60 días después de la siembra dentro del macrotúnel.</i>	123

RESUMEN

La *Stevia rebaudiana* es una planta herbácea, perteneciente a la familia Asteraceae, y es originaria del Paraguay. Es conocida como el único edulcorante natural no calórico y es aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa. Es propagada naturalmente por semilla, pero tiene baja germinación y una pérdida acelerada de la viabilidad. Además, por ser una planta alógama, tiene mucha variabilidad genética y fenotípica. La micropropagación es una alternativa para contrarrestar estas desventajas.

La propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni ha sido descrita con anterioridad en diferentes fuentes Referenciales. Sin embargo, no se informa la implicación de las investigaciones realizadas en los procesos a escala productiva. El presente trabajo se realizó en dos fases, desde la inducción de microplantas para la propagación *in vitro* de *S. rebaudiana*, hasta la obtención de las mismas aptas a condiciones *ex vitro* por medio de la fase de adaptación de las vitroplantas bajo condiciones controladas, con el objetivo de establecer una estrategia de producción del cultivo de *Stevia* en un tiempo corto con una estabilidad genética.

La fase de micropropagación *in vitro* se realizaron estudios en el establecimiento, la inducción de plántulas así como en el enraizamiento. Se determinó el efecto del uso de absorbente orgánico para el manejo de la oxidación en los explantes cultivados, así como el efecto de reguladores de crecimiento con el fin de incrementar la producción de plántulas cultivadas *in vitro*. Se logró el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Stevia rebaudiana* con un 97% de supervivencia libres de contaminantes microbianos con el uso de fungicida sistémico Amistar a una concentración de 1 ml L⁻¹ de fungicida con 2 horas de exposición, con una presencia de recubrimiento de oxidación en los explantes con el uso de Carbón Activado como absorbente. En la etapa de establecimiento se evaluó la consistencia del medio (sólido), la concentración de macroelementos (100%), el tipo y nivel de Auxina y Citocinina (6-BAP + AIB a 1 mg L⁻¹) combinadas en el medio basal de Murashige y Skoog. Secciones de entrenudos tomados de plantas de *Stevia rebaudiana* establecidas en condiciones *in vitro* fueron inducidos a formar plantas por cada yema axilar presente en presencia de concentración de Bencilaminopurina (BAP) combinada con ácido indolbutírico (AIB) evaluándose su efecto sobre el porcentaje de inducción de microplantas y formación de órganos, permitiendo la formación de plantas del 100% en estas concentraciones a una altura de 5 cm a los 45 días después de la siembra con un óptimo desarrollo.

En el proceso de aclimatación se obtuvo que a los 8 y 15 días la sobrevivencia fue de 97% y un 93 % entre los 30 y 45 días el incremento en altura fue de 0.47 cm, mientras que los 8 y 15 días de aclimatación fueron críticos obteniendo una altura promedio de 0.1 cm. Además de obtener resultados favorables con el uso de un macrotunel que permitió el control de un ambiente controlado en el periodo de aclimatación de las microplantas de los factores: intensidad lumínica, regulación de la temperatura, control de la humedad y riego; con el objeto de permitir la rehabilitación de los estomas, lignificación, cubiertas cuticulares y estructuras fotosintéticas así como su desarrollo, principalmente.

Estos resultados permiten proponer una estrategia que reduce el tiempo de obtención de plántulas de Stevia por lo que su aproximación a un esquema de producción a escala lo hace útil para su implementación en la rápida micropropagación de clones élites y la producción de material vegetal de siembra de Stevia en una escala comercial.

Palabras clave: Stevia, escala, reguladores de crecimiento, Cultivo de tejidos, micropropagación, aclimatación.

I INTRODUCCIÓN

La Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*), es una especie perteneciente a la familia Asteraceae, cuyo epicentro de origen es Paraguay, que ha tomado una gran importancia en los últimos años, ya que es la única planta que produce edulcorantes naturales no calóricos denominados steviosido y rebaudiosido A, siendo 300 veces más dulce en presentación cristalina (en polvo), sus hojas molidas 30 veces más dulces y la hoja entera deshidratada 15 veces más que el azúcar de caña común (Álvarez, 2006), es una planta con propiedades extremadamente favorables para la salud humana constituyendo una prometedora alternativa, en el rango de edulcorantes naturales, más aun cuando los endulzantes sintéticos están seriamente cuestionados por los efectos de su consumo a corto y largo plazo (Jiménez T., 2010).

Debido a las propiedades endulzantes de la Stevia y su alto valor económico, su demanda ha ido en aumento tomado alta acogida tanto en mercados nacionales como internacionales. Por tratarse de una planta que se reproduce sexualmente por fecundación cruzada (alógama), no debe extrañarse la diversidad fenotípica (apariencia) y genotípica (genes) que se observa en las poblaciones nativas en Paraguay esto provoca una gran diferencia de contenido de edulcorantes entre las distintas plantas y/o clones, lo que también ha ocasionado que los países busquen nuevas alternativas de reproducción con mayor contenido de steviosido y rebaudiosido (Secretaría de Agricultura de Antioquia, 2000). Esta alta variabilidad se reduce mediante técnicas alternativas de reproducción vegetativa como la propagación in vitro, seleccionando y multiplicando plantas morfológicamente idóneas y con niveles elevados de sustancias edulcorantes que garanticen la rentabilidad del cultivo (Álvarez, 2006)

Considerando lo anterior la importancia de este estudio radicó en explorar el medio de reproducción (cultivo in vitro) y una producción eficaz bajo condiciones controladas, con el propósito de ser guía y apoyo a diferentes instituciones interesadas en su producción de este cultivo proponiendo un posible rumbo comercial, así mismo parámetros para la obtención del cultivo tanto a consumidores como a productores del sector agrícola que estén buscando un componente alternativo y natural para su producción.

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La demanda de la Stevia se está transformando en un mercado creciente a nivel mundial, países tan desarrollados como Japón e Israel la utilizan desde hace más de 40 años. Actualmente se producen 3.000 toneladas de azúcar granulada (en polvo) en el mundo, consumidos en su totalidad; la demanda del producto final supera al desarrollo agrícola. En Guatemala ha llamado la atención de algunos sectores agrícolas, tal es el caso que actualmente se está cultivando en Quetzaltenango, Totonicapán, Villa Canales, San Marcos y algunos lugares del oriente han empezado a cultivarla (Prensa Libre, 2012). En Guatemala no se han encontrado datos oficiales sobre la producción de Stevia, sin embargo es una planta con un futuro prometedor y un potencial tanto para el uso del consumo masivo, industrial y medicinal.

La creciente demanda actual de esta planta requiere buscar nuevas alternativas de producción en función a su reproducción y aumento de su contenido de glucósidos, steviosido y rebaudiosido que proporcionan el sabor dulce a la planta, tales compuesto edulcorantes de la Stevia depende del genotipo, del método de propagación de la planta y de las técnicas agronómicas empleadas. La planta se puede propagar naturalmente mediante esquejes y por semillas. Sin embargo, el bajo porcentaje de germinación de sus semillas y el bajo número de esquejes que se obtienen en los procesos de propagación vegetativa son factores limitantes para su cultivo a gran escala. Consecuentemente, la micropropagación puede proveer grandes cantidades de plantas genéticamente uniformes lo cual representa una técnica alternativa para la rápida multiplicación de plántulas de estevia. En este contexto, la propagación clonal in vitro de estevia ha sido descrita usando explantes como hojas, segmentos internodales y ápices. Estos procesos se ha descrito la formación de estructuras callosas en las plántulas micropropagadas por ende una gran variabilidad genética en las microplantas Por otra parte, las posibilidades que ofrece la biotecnología y particularmente a través de las técnicas de cultivo in vitro tienen también un potencial uso en la producción industrial de metabolitos bioactivos (ZAMORANO, 2001)

Sin embargo, aun cuando se han desarrollado estudios de micropropagación de plantas de Stevia, se necesita mayor investigación, ya que la naturaleza heterogénea de esta planta requiere establecer estudios de regeneración in vitro para cada genotipo, como ha sido reconocido por otros autores (Baxcajay L. V., 2012).

Considerando lo anterior la importancia de este estudio fue establecer una estrategia para la propagación in vitro de *Stevia rebaudiana*. y una producción eficaz bajo condiciones controladas, con el propósito de ser guía y apoyo a nivel productivo a diferentes instituciones interesadas en su producción de este cultivo con el fin de reducir el tiempo del cultivo, con una gran estabilidad genética de las microplantas proponiéndose como un posible rumbo comercial, así mismo parámetros para la obtención del cultivo tanto a consumidores como a productores del sector agrícola que estén buscando un componente alternativo y natural para su producción. Por lo que la problemática encontrada nos llevó a la siguiente pregunta principal:

¿Cómo se desarrolla el proceso de reproducción in vitro del cultivo de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) y su aclimatación bajo condiciones controladas para obtención de una buena producción en campo definitivo?

III JUSTIFICACIÓN

Stevia rebaudiana constituye una alternativa prometedora principalmente a escala industrial gracias al contenido de edulcorantes naturales más aun cuando los endulzantes sintéticos están siendo seriamente cuestionados por los efectos de su consumo a corto y largo plazo (FAO-OMM, 2012).

Aunado a ello, actualmente a nivel mundial existe una creciente demanda que ha provocado el desarrollo de nuevas alternativas en función a su método de reproducción y aumento de su contenido de endulcorante característico de esta planta (Jiménez T., 2010). Se han recurrido a métodos tradicionales siendo estos por semilla y reproducción asexual para tratar de obtener materiales homogéneos; sin embargo, los métodos ineficientes de propagación sexual y asexual no satisfacen la demanda actual de propágulos necesarios para su cultivo comercial. Las plantas de *Stevia* propagadas por semilla generalmente presentan una amplia variación en el contenido de steviosido (5-15% del peso seco), así como en las características morfológicas, como la forma y el color de las hojas. Esta situación ha propiciado el uso de semilla vegetativa para la siembra de cultivos comerciales, la cual es recomendable sólo en plantaciones pequeñas debido a las bajas tasas de multiplicación por estacas y presencia de enfermedades; lo que ha obligado a la utilización de técnicas de micropropagación para hacer más eficiente el proceso de multiplicación (Suárez et al., 2006) reporta por medio de la micropropagación una tasa de multiplicación de 3 a 4 en cada subcultivo, utilizando ápices meristemáticos. El número de subcultivos promedio que se reporta es de 5, para un total aproximado de 3200 plantines por explante en un periodo de 8 meses, considerando un 85% de sobrevivencia.

Por esta razón, el cultivo de tejidos in vitro representa una buena alternativa promisoriosa para solucionar esta problemática para el aumento de la tasa de multiplicación de vegetales (Baxcajay L. V., 2012), genéticamente uniformes con una mejor calidad y mayor cantidad de glucósidos de mayor poder edulcorante, así como para lograr plantas con mayor rendimiento en hojas que facilite su crecimiento y rendimiento normal que dará paso a su producción en el campo definitivo (Isidro E. Suárez1, 2008). Además de tener un impacto significativo en la producción acelerada de clones de *Stevia* del genotipo seleccionado con menor costo, contribuyendo en ahorrar mano de obra en las prácticas de propagación tradicional para la obtención de plantas sanas (J, 2006).

En este sentido se desarrolló la propagación in vitro del cultivo de Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) y su aclimatación en invernadero bajo condiciones controladas a partir de segmentos nodales (partes meristematicas) proponiendo el desarrollo de un estudio de regeneración, que pueda constituirse como una solución a la producción masiva, y respuesta a los altos requerimientos de sanidad y rentabilidad de las plantas. Además de proporcionar información técnica y confiable que podrá ser utilizada como guía de producción por instituciones gubernamentales y no gubernamentales, productores directamente relacionados con el tema de producción de cultivos agrícolas que estén interesados en su comercialización e industrialización a gran escala, ya que actualmente se cuenta con poca información técnica científica del manejo agronómico de la Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) dirigido a su reproducción y producción a gran escala que den a conocer el procedimiento adecuado y éxito de este proceso, adicionado a esto contribuir indirectamente con mejorar de la salud del consumidor como alternativa del azúcar industrial y los endulzantes artificiales.

IV MARCO TEÓRICO

4.1 DESCRIPCIÓN MORFOLOGÍA DE LA PLANTA DE STEVIA

Stevia rebaudiana pertenece a la familia Asteraceae es una planta herbácea perenne, tallo erecto, subleñoso, pubescente; durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo, llegando a producir hasta 20 tallos en tres a cuatro años;

Hábito: Planta arbustiva, cultivadas alcanzan aproximadamente 60 cm y en su hábitat natural 90cm y en los trópicos puede llegar a tener alturas superiores a 100 cm.

Hoja: simple, sésil, oblonga-lanceolada, aproximadamente el 50% de la longitud de la hoja es dentada hacia el ápice y lisa hacia la base. Nervadura pinnada, reticulada, prominente en el envés, ligeramente marcada en el haz, densamente pubescente en ambas caras. 3 nervios nacen desde la base. Se observan pelos persistentes en todo el margen de la hoja y a lo largo de todas las nervaduras, en especial de la principal. Borde de la hoja engrosada. Presentan disposición opuesta en sus estados juveniles, y alternas cuando las plantas llegan a su madurez fisiológica, previa a la floración. La hoja es el órgano con mayor contenido de steviósidos y la raíz es el único órgano que no contiene steviósidos.

Figura 1 Morfología de la hoja con disposición opuesta en su estado juvenil.



Tallo: ramificación lateral como en las espermatófitas, en el extremo y en los distintos niveles, simpódico. Pubescente. En sus primeras fases de desarrollo presenta un tallo único, en su fase final

puede presentar numerosos tallos que salen de un mismo sistema radicular. Su raíz es muy ramificada y fibrosa, filiforme, y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie.

Flor: blanca a color crema, pentámera, tubular, pubescencia densa en el cáliz. Pétalos blanquecinos. Inflorescencia en capítulo, con pedicelos cortos (Figura 1).

Fruto: aquenio delgado y plumoso (Figura 2).

Figura 2 Presencia de floración cuando las plantas llegan a su madurez fisiológica.



La planta es auto incompatible (protandria), por lo que la polinización es entomófila; se dice que es de tipo esporofítico y clasificada como apomíctica obligatoria (Monteiro, 2006) . El fruto es un aquenio que puede ser claro (estéril) u oscuro (fértil) y es diseminado por el viento. Se clasifica como una planta de día corto, situando el fotoperiodo crítico de 12 a 13 horas según el ecotipo. Durante el invierno la parte aérea de la planta se seca, rebrotando desde la base en primavera. La planta resiste la humedad pero no la sequía, y esto puede explicarse por la morfología de su sistema radicular; se desarrolla mejor donde la estación de crecimiento es larga, cuando la intensidad de luz es alta, con temperaturas tibias, riesgos mínimos de heladas después la brotación y sin períodos largos de sequía.

4.2 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Stevia rebaudiana Bertonii es una planta originaria del Sudeste de Paraguay, de la parte selvática subtropical de Alto Paraná. Esta planta fue usada ancestralmente por sus aborígenes, como edulcorante y medicina. Sin embargo, el género *Stevia* consta de más de 240 especies de plantas nativas de Sudamérica, Centroamérica y México, con muchas especies encontradas en

lugares tan lejanos como Arizona, Nuevo México y Texas. Por siglos las tribus Guaraníes de Paraguay y Brasil usaron diferentes especies de Stevia y, principalmente, *Stevia rebaudiana*; ellos la llamaron **ka'a he'ê** o yerba dulce.

El botánico suizo Moisés Santiago Bertoni fue el primero que la describió, en 1887, detallando su sabor dulce. En 1900 el químico paraguayo Ovidio Rebaudi, logró aislar dos principios activos: uno dulce y otro amargo. Posteriormente, estos compuestos fueron llamados esteviósido y rebaudiosido, que son de 200 a 300 veces más dulces que la sucrosa, estables al calor y no fermentan. Cabe señalar que *S. rebaudiana* cuenta con más de 144 variedades a nivel mundial, destacando a Morita 2; además esta especie presenta numerosos ecotipos; también la variedad Ariete es actualmente muy cultivada debido a su mayor edulcorancia.

4.3 CONSIDERACIONES MÉDICAS

Algunos estudios, han demostrado cualidades de la Stevia para su utilización en personas con problemas de diabetes, al mostrar que las curvas de tolerancia a la sobrecarga de glucosa postprandial (prueba en la cual se analiza el nivel de glucosa 2 horas después de la ingestión de alimentos) en pacientes diabéticos obesos fue mejor en aquellos que habían sido tratados previamente con 130-140 mg de extracto de estevia, que en aquellos que habían recibido 280-300 mg del hipoglucemiante de síntesis glibenclamida. El porcentaje de descenso fue en promedio del 35 % respecto a los niveles basales al cabo de 6-8 horas. El efecto hipoglucemiante como el incremento en la tolerancia a la glucosa también se evidenció en las personas euglucémicas, durante y después de la toma de un extracto acuoso elaborado con 5 g de hojas de estevia (Monteiro, 2006)

4.3.1 Efecto en la diabetes

La diabetes mellitus de tipo 2 es un desorden metabólico crónico resultado de defectos en la secreción de insulina de las células β y en la acción de la insulina, también contribuyen la disfunción de las células α del páncreas y el exceso relativo de glucagón. La hiperglicemia

postprandial observada en la diabetes de tipo 2 es debido a un incremento de la producción de glucosa hepática basal y una disminución de glucosa periférica.

Por lo tanto, la corrección de este desequilibrio bien sea a la entrada o la salida de la glucosa plasmática debe ayudar a corregir esta afección patológica. El esteviósido en dosis altas (5mM) no tiene efecto inhibitorio sobre la absorción de glucosa. Sin embargo, 1mM de steviol inhibe la absorción de glucosa aproximadamente un 40%. Estos resultados sugieren que el lugar de la acción inhibitoria del steviol podría ser en la parte de la mucosa y/o en los orgánulos intracelulares de las células de absorción intestinales. Los investigadores sugirieron que la inhibición de la absorción de la glucosa por el steviol se debe a la reducción del contenido de ATP en la mucosa intestinal, lo que es una consecuencia de la disminución de las actividades enzimáticas mitocondriales en el intestino al nivel de fosforilación y alteraciones morfológicas de las células de absorción intestinales. De hecho, la inhibición por steviol de la absorción de glucosa en células intestinales podría resultar en una bajada del nivel de glucosa plasmática, lo que sería indeseable en individuos sanos.

4.3.2 Otros efectos biológicos y aplicaciones terapéuticas de la Stevia

- **Efecto en la Acción Anticaries:** En la Universidad de Purdue se demostró que el esteviósido es 100% compatible con el fluoruro, inhibe el crecimiento de placas bacterianas y reduce la caries dental, enjuagatorios bucales, gomas de mascar, para proteger el esmalte dental (Osorio, 2007)
- **Efecto en la Acción Antioxidante:** El extracto líquido de Stevia tiene componentes con poder antioxidante en el organismo. Los individuos que la consumen tienen menor incidencia de resfriados y gripes.
- **Efectos sobre la ansiedad:** El consumo de Stevia ayuda a reducir la ansiedad por el tabaco y el consumo del alcohol.
- **Efecto en la Obesidad:** La Stevia puede ayudar a reducir la ansiedad por las comidas y la apetencia por dulces, chocolates, grasas, entre otros. Dicho efecto, disminuye calorías (glucosa). También regula insulina y por ello el organismo engorda menos, es decir, almacena menos grasas. (Gállego, 2012)

- **Efectos en el sistema digestivo:** Consumida como un té de hierbas, la Stevia beneficia la digestión y la función gastrointestinal y alivia las molestias estomacales (Alfredo de Jesús Jarma O.1, 2010)
- **Efectos Estéticos:** Los endulzantes a base de Stevia benefician no solo salud, sino que también aportan al buen cuidado de su bienestar físico. La Stevia contiene proteínas, fibra, vitaminas y minerales, pero no aporta ninguna caloría, convirtiéndola en un endulzante ideal para controlar o bajar peso. La Stevia también ayuda a disminuir la comida al reducir el hambre y los antojos por el azúcar y las comidas grasosas. La sensación de hambre también es minimizada si se consume 20 minutos antes de las principales comidas del día.

4.3.3 Características químicas de los Steviósidos

El químico paraguayo Ovidio Rebaudi realizó los primeros estudios en 1905 sobre la composición química de la planta e identificó sus compuestos dulces. Los steviósidos se caracterizan por ser edulcorantes naturales no nitrogenados compuestos solamente de Carbono, Hidrógeno y Oxígeno, siendo su fórmula química $C_{38}H_{60}O_{18}$, a diferencia de la sacarosa cuya composición química es $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Ministerio de Agricultura y Ganadería de (Paraguay, 1994) ; Los compuestos edulcorantes son diterpenoides formados por nueve glucósidos bajos en calorías, cuyo contenido promedio en las hojas son los siguientes; Steviosido (10 %); Rebaudiosidos A, C, D, E, F (3 a 4 %); Dulcósidos A, B; Isosteviol, Steviol-glicósido (en proporciones menores al 1 %). Actualmente, se denomina steviósidos totales al conjunto de todos estos componentes. Entre estos componentes, el Rebaudiosido A, es el que presenta mayor grado de dulzor siendo aproximadamente 400 veces más dulce que la sacarosa.

Estas sustancias químicas en conjunto representan aproximadamente 5–10 % del peso de las hojas secas. Los steviósidos poseen estabilidad térmica a valores de pH entre 2 y 8 a una temperatura entre 5 y 90o C sin presentar alteraciones en las moléculas del steviol, lo que indica que presenta estabilidad durante la cocción y el almacenamiento. Esta propiedad hace más apta a la estevia para ser utilizada en productos horneados, debido a que muchos de los otros edulcorantes se descomponen con el calor.

4.4 ASPECTOS AGROECOLOGICOS

4.4.1 Precipitación

La exigencia de humedad de esta especie es alta y de manera continua; es decir, no debe faltar agua durante las diferentes etapas de su desarrollo. De ahí que la distribución natural de este cultivo se observe en zonas donde las precipitaciones medias anuales son altas (1,400 mm a 1,600 mm) y por lo regular uniformes entre 100 a 120 mm mensuales. La estevia no tolera periodos largos de sequía, de tal manera que en zonas en donde la precipitación anual sea inferior a los 1,400 mm es necesario la utilización de sistemas de irrigación. (Casaccia y Álvarez, 2006).

4.4.2 Temperatura.

La estevia es una especie originaria de la zona subtropical, semihúmeda con temperaturas extremas de -6 a 43°C, con promedio de 24 °C, no obstante se reporta que prospera muy bien entre los 24 y 28°C.

4.4.3 Humedad.

Para la estevia, el porcentaje de humedad relativa debe ser menor del 85%. Este factor influye directamente sobre la temperatura del aire y del suelo y sobre el contenido del vapor de agua en el ambiente; además es un factor determinante en la incidencia de enfermedades.

4.4.4 Luminosidad.

Los fotoperiodos largos aumentan la longitud de los entrenudos, el área foliar el peso seco y aceleran la aparición de las hojas. La materia seca se reduce a la mitad con fotoperiodos de días cortos. El fotoperiodo crítico para el desarrollo de la estevia es de 12 horas, pero existe una gran variabilidad genética entre ecotipos.

Brandle y Rosa 1992, reportaron que la alta relación hoja/tallo fue una función del genotipo cuando las plantas se sometieron a días largos. Por su parte, Ramesh et al., (2006) afirmaron que el crecimiento vegetativo, área foliar, peso seco de hojas y rendimiento de glucósidos variaron de

acuerdo a la duración del día, y que estos parámetros fueron mayores en días largos que en días cortos, principalmente la concentración de steviósidos aumentó en un 50 %. Así mismo, se ha reportado que el crecimiento vegetativo de estevia se reduce cuando las temperaturas están por debajo de 20 °C y cuando la longitud del día es menor a 12 horas.

4.4.5 Suelo.

El suelo ideal es areno-arcillosa, francos y franco-arenosos, con regular proporción de humus. Se adapta bien a suelos con buen drenaje, no así en lugares con exceso de humedad. Prospera bien en suelos de pH ácido, pero crece bien entre 6.5 a 7.5, siempre que sean no salinos.

La planta se mantiene varios años en el mismo sitio y además es buena competidora con malezas. Asimismo, existen estudios enfocados al reconocimiento de enfermedades que son limitantes en el cultivo y causales de bajos rendimientos, las cuales son causadas por: *Sclerotium*, *Fusarium*, *Choanephora*, *Curvularia* y *Corynespora*.

4.5 VARIEDADES

En el cultivo de la *Stevia* existen materiales criollos principalmente provenientes de Paraguay y Brasil; cuando las plantaciones se realizan provenientes de estos materiales se tienen plantas que presentan diferencias morfológicas y fenológicas, por lo tanto existe variabilidad en sus componentes de rendimiento como son tamaño de planta, longitud y ancho de hoja, así como época de floración y cosecha. (INIFAP, 2011)

4.5.1.1 Variedad Criolla:

La variedad Criolla, esta constituida por una mezcla de varios tipos de plantas (varios genotipos), que varían en sus características morfológicas y fenológicas. Por esta razón, esta variedad presenta florecimiento heterogéneo afectando esto, negativamente la calidad de las hojas producidas, debido a que el productor no puede realizar en el momento oportuno la cosecha de las mismas. En su conjunto presenta un porte bajo, llegando a alcanzar un promedio de altura de 60 cm. en los meses de Diciembre o Enero. (PARAGUAY, 2006)

Presenta un potencial de rendimiento, en condiciones experimentales, en el primer año de cultivo, de 1.889 Kg./ha./año (en tres cortes). Este rendimiento es sin riego y con una densidad de 100.000 plantas/ha. A nivel de cultivo comercial manejado con buenas prácticas agrícolas, el promedio de rendimiento es de 1.000 a 1.200 kg./ha/año. El contenido promedio de la suma de Esteviósido y Rebaudiósido A, alcanza valores de 14%, en la segunda cosecha, que es la cosecha más productiva y con mayor contenido de glicósidos totales. Del total de ambos glicósidos, el 11% corresponde al Esteviósido; por su parte el Rebaudiosido A observa valores de 3 %; por lo que se deduce que solamente el 21 % del total de glicósidos corresponde al Rebaudiosido A. y el 79 % corresponde al Esteviósido, que es conocido de su sabor dulce pero amargo, lo cual se refleja en el sabor de las hojas de esta variedad. A nivel de campo en finca de agricultores, es común observar valores de 12 % de glicósidos totales, pues el producto cosechado viene mezclado con ramillas u otras impurezas, que inciden en la calidad final del producto. (J. Casaccia & E. Álvarez, 2006)

4.6 MÉTODOS DE PROPAGACIÓN DE STEVIA

4.6.1 Propagación sexual

La flor de la estevia es hermafrodita, pequeña y blanquecina, en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas. La polinización es entomófila (Polinización cuyos agentes son los insectos), autoincompatible (tiene barreras genéticas y fisiológicas que impiden la germinación del propio polen o el desarrollo del tubo polínico), protandria (fenómeno reproductivo de las plantas en las cuales ocurre la maduración de los gametos masculinos antes que los gametos femeninos); de tipo esporofítico o con polinización cruzada entre dos variedades o biotipos de distinta época de floración.

La recolección de la semilla es lenta y muy difícil, debido a que la floración no es uniforme, lo que afecta a la maduración de la semilla; además, el porcentaje de germinación es bajo entre el 10 y 38 %.

La reproducción sexual de Stevia, presenta ciertas desventajas que pueden afectar de forma negativa la eficiencia del cultivo, así como causar alta heterogeneidad de las poblaciones resultantes, baja eficiencia de germinación debido al alto porcentaje de semillas estériles y la ineficiencia en la recolección de la semilla por la desuniformidad en la floración y la maduración de la misma. Además, la variabilidad genética y fenotípica de la Stevia), también podría afectar el contenido de glucósidos diterpenicos.

4.6.2 Propagación asexual

Debido a las desventajas que presenta la propagación sexual, se ha propiciado el uso de la reproducción asexual, que implica el empleo de partes vegetativas de la planta original. La propagación asexual puede llevarse a cabo por hijuelos, estacas, esquejes, injertos y por cultivo de tejidos. Para la siembra de cultivos comerciales, la cual no está exenta de problemas debido a las bajas tasas de multiplicación por estacas, lo que ha obligado a la utilización de técnicas de cultivo de tejidos para hacer más eficiente el proceso de multiplicación ya que entre otras cosas permite la multiplicación masiva de plantas con características uniformes (micropropagación) (Isidro E. Suárez¹, 2008); (J. Casaccia & E. Álvarez, 2006)

4.6.3 Micropropagación en la producción de plantas

La necesidad de producir poblaciones de Stevia genéticamente uniformes para la obtención de mejor calidad y mayor cantidad de steviosido ha hecho que muchos investigadores enfatizen cada vez más en las técnicas de micropropagación. El “Cultivo de tejidos” involucra técnicas de producción clonal de órganos, tejidos, células y protoplastos vegetales en un medio nutritivo bajo condiciones asépticas y un ambiente controlado (Pierik, 1990). Las técnicas de cultivo de tejidos son una alternativa no convencional de clonación masiva de plantas de Stevia con alto contenido de edulcorante.

La micropropagación constituye además una alternativa para la producción no estacional de plantas con precios mucho más competitivos que las producidas mediante técnicas in vivo (Pierik, 1990) Varias técnicas de cultivo de tejido exitosas han sido reportadas, no obstante un limitado número de ellas han sido publicadas en forma clara.

4.6.4 Fases de la micropropagación

La micropropagación vegetal o cultivo de tejidos propuesto por Gottlieb Haberlandt en 1898 como el padre de cultivo de tejidos, y de White en Estados Unidos y Gautheret en Francia en 1934, donde demostraron de forma definitiva la posibilidad de cultivar células vegetales in vitro y su protocolo universal.

El cultivo de tejidos vegetales es un proceso que se inicia con la escisión de un pequeño fragmento de planta madre al que se le denomina explante y termina con la obtención de nuevas plantas completas a partir de éste fragmento, también conocidas como vitroplantas. El proceso involucra una serie de etapas, (ICTA, 1996) las cuales se enumeran a continuación:

4.6.4.1 Etapa 0: Selección y preparación de las plantas madres

Involucra todo el tratamiento que se le da a la planta madre con el objetivo de reducir los niveles de contaminación del explante. Estos tratamientos incluyen mantener las plantas madres libres de plagas y enfermedades a través de un programa consciente de prevención, regar directamente en el macetero y no a la planta a manera de mantener el follaje seco. Además, se deberá mantener un programa de fertilización que cubra los requerimientos nutritivos de la planta.

4.6.4.2 Etapa I: Establecimiento o iniciación del cultivo

En esta etapa los principales procesos a controlar son el aislamiento y la desinfección de los explantes. Es indispensable que se tenga un método eficiente para eliminar esporas, tejidos fungosos, bacterias y otros contaminantes sin dañar el tejido y reducir la capacidad de regeneración del explante. Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en el laboratorio.

La desinfección requiere el empleo de sustancias químicas, que son tóxicas para los microorganismos pero relativamente inocuas para el material vegetal, tales como Hipoclorito de

Sodio y de Calcio, además se emplean algunos alcoholes (Etilico, Metílico o Isopropilico) en diferentes concentraciones, la efectividad de estas sustancias es esencialmente una respuesta tiempo-concentración, en el cual la efectividad para desinfectar aumenta con ambos factores, pero también aumenta la capacidad para dañar el tejido en consecuencia se debe de buscar un equilibrio de acuerdo al explante de que se trate. Otra sustancia química es el Cloruro de Mercurio (HgCl₂) empleando en bajas dosis y por corto tiempo; sin embargo, su uso es poco recomendable debido a su alta toxicidad.

4.6.4.3 Etapa II (Multiplicación)

Esta etapa generalmente comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. La primera implica el empleo de reguladores de crecimiento, para favorecer la desdiferenciación celular. La segunda fase, requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación.

4.6.4.4 Etapa III (Enraizamiento)

En esta etapa, se produce la formación de raíces adventicias en los brotes regenerados. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones in vitro como ex vitro. En el primer caso pueden emplearse reguladores de crecimiento (auxinas) en el medio de cultivo para promover la rizogénesis. Asimismo, los nutrientes del medio se pueden reducir a la mitad o a la cuarta parte de la composición original y la sacarosa reducir de 1-2 %. En el enraizamiento ex vitro, puede hacerse uso de sustratos como perlita o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua.

La auxina más utilizada en esta etapa es el AIB (ácido 3-indolbutírico) y el BAP (bencilaminopurina), que puede utilizarse a concentraciones de 1 a 10 mg L⁻¹ durante pocas horas. Alternativamente se pueden emplear niveles más bajos de auxinas (0.1 a 1 mg), pero manteniendo la inducción por un período más prolongado (3 a 7 días). Luego los vástagos, se transfieren a un medio de cultivo basal desprovisto de reguladores de crecimiento para permitir el desarrollo de las raíces.

4.6.4.5 Etapa IV (Aclimatación)

El trasplante de las vitroplantas del medio aséptico de cultivo al ambiente natural en el invernadero y luego a su sitio final involucra que deban pasar por un período de aclimatación para que puedan sobrevivir. Durante este período las plantitas se ven obligadas a formar raíces y brotes funcionales para volverse autótrofas. El éxito de esta etapa radica en el cuidado que se tenga controlando la susceptibilidad de las vitroplantas a la deshidratación, ya que a pesar de que se tengan condiciones controladas de temperatura, luminosidad y humedad, se puede obtener pérdidas muy cuantiosas. La duración de esta etapa depende principalmente de la rusticidad de las especies pero en general es de 30 a 60 días aproximadamente (Baxcajay L. V., 2012)

A continuación se describen ciertas modificaciones anatómicas y fisiológicas gracias a las cuales la vitroplanta tiene un gran potencial de supervivencia ex vitro. Estos cambios se encuentran asociados a la pérdida excesiva de agua, la baja luminosidad y los bajos porcentajes de humedad relativa que suceden en el momento del trasplante (Pierik, 1990)

4.6.5 La cutícula.

Es una capa de cera que cubre la epidermis de las hojas protegiéndolas de la pérdida excesiva de agua. La cutícula no se encuentra bien desarrollada en las plantas que han sido producidas en tubos de ensayo debido a la alta humedad relativa in vitro (90-100%), provocando una pérdida rápida de agua en las vitroplantas cuando son transplantadas al invernadero (Pierik, 1990).

4.6.6 Los estomas.

Son pequeñas aberturas localizadas en las hojas, encargadas del balance hídrico en las plantas así como del intercambio de gases necesario para el proceso fotosintético y la respiración. Las mayores pérdidas de agua en las vitroplantas se deben al relativo mal funcionamiento de los estomas que permanecen abiertos hasta que las plantas puedan ajustarse a un ambiente de baja humedad y mayor intensidad lumínica (Espinal-Rueda, 2002). Es importante mantener la turgencia de las plantas mediante un riego continuo al momento de pasarlas al invernadero ya que existe una reducida conductividad hídrica entre las raíces y vástagos a consecuencia de la poca conexión

vascular vigente. La turgencia además permite el alargamiento celular para el crecimiento (Pierik, 1990).

4.6.7 Fotosíntesis.

Las plantas han sido criadas bajo un ambiente heterotrófico, por lo cual, la energía y carbohidratos necesarios son obtenidos inicialmente a través de la sacarosa presente en el medio de cultivo. Eventualmente, esa energía y carbohidratos necesarios deben ser producidos mediante la fotosíntesis. Luego de aproximadamente diez días posteriores al trasplante, los plantines van iniciando normalmente sus procesos fotosintéticos (Pierik, 1990).

4.6.8 Las raíces.

La masa radical delicada generada in vitro se ve afectada in vivo debido al cambio brusco de condiciones a la que se ve expuesta al momento del trasplante ex vitro, debiendo ser reemplazadas rápidamente por otras raíces subterráneas.

4.6.9 Intensidad lumínica.

La formación de raíces adventicias depende mucho de la época del año a ciertas latitudes. Según Borys et al. (1995) el control de la luminosidad se hace determinante para el éxito de la aclimatación ya que existe una alta correlación entre la capacidad de enraizamiento in vivo, la sobrevivencia de las vitroplantas y la intensidad lumínica.

4.6.10 Temperatura.

La temperatura adecuada para la aclimatación de Stevia y la mayoría de los cultivos en el invernadero está entre los 20 y 25° C; temperaturas mayores a estas causan daños por deshidratación (Lyakhovkin, Tran, Titov, & Mai, 1993)

4.6.11 Medio de cultivo y sus componentes

El medio de cultivo tiene dos funciones principales, la primera es proporcionar los nutrientes básicos para el crecimiento continuando de los explantes aislados y los propágulos subsiguientes y la segunda, es dirigir el crecimiento y desarrollo mediante el control hormonal, el éxito del cultivo de tejidos vegetales depende del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc.

Los requerimientos nutritivos para el crecimiento in vitro óptimo varía con la especie, con el explante que se esté cultivando y la respuesta que se desea obtener. Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones para los medios de cultivo. La fórmula propuesta por Murashige y Skoog en 196, ha sido aceptada en forma general ya que ha permitido la supervivencia y crecimiento de la mayoría de los tejidos empleados (Ruiz, 1997)

4.6.11.1 Carbohidratos

Las células en cultivo in vitro generalmente no son fotosintéticamente activas por lo que requieren una fuente de carbono. Comúnmente se utiliza sacarosa o glucosa del 2 al 5 % (peso/volumen). Niveles menores se emplean en cultivo de protoplastos y mayores en cultivo de embriones y anteras. Los azúcares pueden sufrir caramelización si son esterilizados por tiempo excesivo, pueden ser degradados y formar compuestos de color café, y alto peso molecular que inhiben el crecimiento celular.

4.6.11.2 Sales minerales

Estas se dividen en dos grandes grupos: macronutrientes, grupo de elementos esenciales como N, P, K, Ca y Mg, que son requeridos normalmente en cantidades relativamente altas (g) y micronutrientes, grupo de elementos como Fe, B, Zn, Mo, Mn, Cu, Co, entre otros, que las plantas necesitan en pequeñas cantidades (mg) y que son imprescindibles en la nutrición.

4.6.11.3 Vitaminas

Las vitaminas tienen funciones catalíticas en reacciones enzimáticas y son necesarias en el metabolismo, son comúnmente las más empleadas y corresponden al grupo B, por ejemplo: Tiamina (B1), Riboflamina (B2), Piridoxina (B6), Acido Pantotético (B12) y Ácido Fólico

4.6.11.4 Agentes gelificante

Generalmente los medios nutritivos para el cultivo de tejidos son solidificados con agar. El gel debe de ser suficientemente firme para sostener el explante, pero no demasiado para no impedir un adecuado contacto entre el medio nutritivo y el tejido. Entre los geles más utilizados están el Agar-Agar y el Gelrite, la cantidad de Agar- Agar que se incorpora al medio varía de acuerdo a su grado de pureza, se puede agregar por cada litro de 2 hasta 12 g (Pierik, 1990).

4.7 INVESTIGACIONES DEL CULTIVO IN VITRO DE STEVIA

La necesidad de producir poblaciones de Stevia genéticamente uniformes para la obtención de mejor calidad y mayor cantidad de steviosido ha hecho que muchos investigadores enfatizen cada vez más en las técnicas de micropropagación. Varias técnicas de cultivo de tejido exitosas han sido reportadas, no obstante un limitado número de ellas han sido publicadas en forma clara.

Los factores que determinan el éxito del sistema de micropropagación depende de la planta que dona el explante (mientras más joven y menos diferenciado el tejido, mejor será la respuesta in vitro), el explante (partes embrionarias, brotes jóvenes y ápices meristemáticos), los factores físicos (luz y temperatura) y el medio de cultivo por su composición química y forma física.

4.7.1 Inducción de organogénesis directa.

Según (CIAT, 1993), la organogénesis directa comprende el desarrollo de yemas adventicias o de meristemas radicales adventicios a partir de los explantes directamente. Varias partes de una planta pueden responder diferentemente a idénticas condiciones de cultivo, y tales diferencias reflejan el estado fisiológico de la fuente del explante. Ferreira y Handro en 1987 establecieron un

método de micropropagación para *Stevia rebaudiana* utilizando hojas jóvenes de plantas adultas cultivadas en un medio basal Linsmaier y Skoog (LS) conteniendo benciladenina (BA) (2.0 mg/l) bajo iluminación, o ácido naftalenacético (ANA) (2.0 mg/l) en la obscuridad. Los rebrotes regenerados directamente de los explantes foliares fueron transferidos a un medio conteniendo BA (0.1 mg/l), con subcultivo continuo y aislamiento adecuado de rebrotes. La adición de AIB (0.1 g/l) al medio de enraizamiento favoreció la formación de raíces en los brotes y la sobrevivencia de las plantas a las condiciones ex vitro. (Baxcajay L. V., 2012)

4.7.2 Organogénesis directa a partir de puntos directos de crecimiento

4.7.2.1 Ápices meristemáticos.

Se ha establecido un protocolo de micropropagación para *Stevia rebaudiana* a partir de ápices meristemáticos con un pequeño número de primordios foliares, en un medio basal LS, sólido, suplementado con una alta concentración de Kin (10 mg/l). Estudio anatómico ha sugerido que se da igualmente una brotación múltiple que se origina de brotes adventicios en la base de la hoja. Innumerables brotes pueden ser obtenidos repitiendo el ciclo de multiplicación de los brotes a partir de un solo explante. Estos brotes producen raíces cuando son transferidos a un medio conteniendo ANA (0.1 mg/l), sin Kin. Las plántulas regeneradas pueden ser transferidas al suelo. Se ha comprobado que la micropropagación por medio de ápices meristemáticos es un método efectivo para la clonación masiva de plantas para la producción de edulcorantes glucósidos.

4.7.2.2 Segmentos nodales.

Con este nombre se conoce el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Un experimentos realizados en Paraguay por el Instituto Agronómico Nacional (IAN), se ha tenido éxito en la micropropagación de *Stevia* utilizando segmentos nodales, especialmente para fines de mejoramiento genético y para multiplicar clones selectos obtenidos mediante el cultivo de meristemas. Este mejoramiento genético apunta a lograr cultivares con alto potencial productivo de hojas a nivel de campo, alto contenido de steviosido y rebaudiosido A, buenas características agronómicas y tolerancia y/o resistencia a enfermedades foliares (Septoria y Alternaria).

Hossain et al., 2008, establecieron que ápices y segmentos nodales de Stevia responden de manera diferente a los efectos de las hormonas ya que fueron significativamente diferentes en términos de número de brotes. Ya que los ápices en MS con BAP (1mg L⁻¹) mostro el mayor número de brotes (3.10) mientras que los segmento nodales se obtuvo el mayor número de brotes (2.50) en Kin (3mgL⁻¹). En este mismo estudio se realizó enraizamiento de microplantas en medio MS (100 y 50 %) y se obtuvo que en MS (100 %) a los 7.5 días inicio la formación de raíces mientras que en MS (50 %) la formación de raíces comenzó después de 10.5 días con un numero de raíces de 6.0 mientras que en Ms (100 %) se obtuvo número de raíces (8.6) por microplantas.

4.8 IMPORTANCIA ECONÓMICA

El consumo internacional se concentra en la Unión Europea, EE.UU., China, Australia y especialmente Japón, a pesar de tener fábricas para la extracción de los steviósidos, es insuficiente para satisfacer su mercado interno (se estima que el consumo anual de steviósidos en Japón es de 50 toneladas al año con un valor aproximado de \$240 millones de dólares americanos). Brasil, cuenta con la mayor planta de tratamiento de hoja seca para extracción del steviosido. Actualmente, se producen 3000 toneladas de cristal de steviosidos en el mundo el cual se consume en su totalidad. Rusia y varios países Latinoamericanos han incorporado este nuevo edulcorante a su dieta (Castillo V. , 2011)

La FDA, OMS y la FAO (Administración de Drogas y Alimentos, Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) han aprobado el uso de la Stevia como “Aditivo Alimentario” para ser consumida por personas de todas las edades. El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) en sus reuniones 68ª y 69ª del año 2008, estableció una Ingestión Diaria Admisible (IDA) para los glucósidos de steviol de 0 a 7 mg por kg de peso corporal por día, aunque dicha cifra es altamente conservadora y un humano nunca llegaría a consumir más de lo permisible en un día (Castillo V. , 2011)

En el mercado, la Stevia se puede conseguir en diferentes presentaciones de productos, como una simple infusión de hojas secas, como líquido denso de color oscuro el resultado de hervir las hojas en agua, otro tipo de líquido obtenido a través del macerado de las hojas en agua destilada o en una mezcla de licor alcohólico y agua (consumido de manera popular en algunas regiones del Paraguay) (FAO-OMM, 2012)

4.9 MERCADO DE STEVIA (*Stevia Rebaudiana*) EN GUATEMALA

Estevia es un edulcorante no calórico, de origen natural, que se cultiva y utiliza en diversas partes del mundo y que ha penetrado de manera importante en el mercado nacional e internacional. Publicaciones reportan que en el segundo Agro Encuentro Rural AGRITADE el cual se llevó a cabo en el departamento de Jalapa realizado el 21 y 22 de noviembre de 2013, Con la participación de más de 450 pequeños productores locales y 15 empresas exportadoras, con el objeto de buscar nuevas alternativas productivas de exportación. En este caso, la chíá, **stevia**, cebolla, ejote francés, entre otros, fueron las nuevas propuestas para productores de la región de oriente del país, las cuales se introdujeron a través de capacitaciones, exposición y parcelas demostrativas, respecto a las perspectivas del mercado, los productos con gran posibilidad de desarrollar en Guatemala, posición en el mercado internacional y así fortalecer los procesos productivos, organizativos, empresariales y gerenciales de las micro, pequeñas y medianas empresas. *“La stevia, el edulcorante natural, el cual ya existen semillas en Guatemala, cuenta con gran potencial para cumplir la oferta del mercado internacional.”* indicó el Ing. Ricardo Santa Cruz, Director de la División Agrícola de AGEXPORT. (AGEXPORT, AGRITRADE, 2013)

Según Prensa Libre 2012 Quetzaltenango, Totonicapán, Villa Canales y algunos lugares del oriente ya se ha empezado a cultivar. Además se constituye como una alternativa de cultivo en Guatemala. Una pequeña empresa asentada en Paxtocá, Totonicapán, ha empezado a cultivar *Stevia rebaudiana*, conocida como Stevia u hoja de dulce, el ingeniero agrónomo Gregorio García asesora a un empresario para cultivar y cosechar la hoja de dulce y comercializarla como un té natural, para evitar que pase por cualquier proceso químico. El proceso que utilizan consiste en deshidratar la hoja con un horno solar, para presentarla como té, pero no descartan que en el futuro

alguna compañía guatemalteca se interese en procesarla para exportarla, como lo hacen Colombia y otros países.

4.10 METODOLOGÍA

La metodología es el conjunto de métodos de investigación apropiados al quehacer de una ciencia. La metodología en las ciencias sociales, busca en la realidad social la explicación veraz de los hechos sociales usando la observación y experimentación común a todas las ciencias, encuestas y documentación.

4.10.1 Investigación Cualitativa Descriptiva:

La investigación cualitativa se caracteriza por la utilización de técnicas (entrevistas, observación, relatos, biografías, grupos de discusión, etc) que permitan recabar datos que informen de la particularidad de las situaciones, permitiendo una descripción exhaustiva y densa de la realidad concreta, objeto de la investigación. (Casilimas, 2002)

En éste no aparece la palabra hipótesis. No es que no las haya, puesto que la propuesta misma de investigación cualitativa presupone una serie de hipótesis de diferentes categorías, que operan como malla conceptual de contención de la investigación. Estas hipótesis pueden flexibilizarse y transformarse a lo largo del trabajo investigativo, sin que asuman un papel eje, como lo tienen en el método hipotético deductivo. (Truffer, 2010)

En la investigación descriptiva, por otra parte, se trata de describir las características más importantes de un determinado objeto de estudio con respecto a su aparición y comportamiento, o simplemente el investigador buscará describir las maneras o formas en que éste se parece o diferencia de él mismo en otra situación o contexto dado. Los estudios descriptivos también proporcionan información para el planteamiento de nuevas investigaciones y para desarrollar formas más adecuadas de enfrentarse a ellas. De esta aproximación, al igual que de la del estudio exploratorio, tampoco se pueden obtener conclusiones generales, ni explicaciones, sino más bien descripciones del comportamiento de un fenómeno dado. (USAC, 2011).

4.10.2 Estadística Descriptiva:

Se engloban las técnicas que nos permitirán realizar un análisis elemental de las observaciones experimentales observadas. (USAC, 2011).

El proceso seguido en el estudio estadístico de una cierta característica o variable, puede subdividirse en tres pasos sucesivos:

- a. Recogida de datos:** Planteado el test oportuno y recogidos los datos que correspondan, el primer análisis que realiza es el del tipo de variable que pretendemos estudiar (Cualitativa o Cuantitativa).
- b. Organización de los datos:** procedemos a su recuento, construyendo la tabla de frecuencias. Posteriormente podremos visualizar tales frecuencias de forma gráfica con el diagrama estadístico apropiado.
- c. Análisis final:** La obtención de muy diversas conclusiones respecto de la variable estudiada, se podrá realizar con auxilio de los diferentes parámetros estadísticos.

4.10.2.1 Variables estadísticas

- a. Cualitativas:** Los valores de las observaciones quedan expresados por características o atributos como: Color, forma, etc.
- b. Cuantitativas** Los valores de las observaciones son numéricos (cuantificables) y, en consecuencia, ordenables.

V MARCO REFERENCIAL

5.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El Municipio San Pedro Sacatepéquez pertenece al departamento de San Marcos. Su extensión territorial es de 253 kilómetros cuadrados, ubicándose a 2,330 metros nivel del mar. Teniéndose las siguientes coordenada; su latitud es de 14longitud de 91⁰46'36". Se encuentra ubicado a 2 kilómetros de la cabecera departamental y a 250 kilómetros de la ciudad capital (véase anexo).

5.2 COLINDANCIAS

El municipio colinda al norte con el municipio de San Lorenzo; al sur con los municipios de San Cristóbal Cucho, La Reforma y El Tumbador y al oeste con los municipios de Esquipulas Palo Gordo y San Marcos y al este con los municipio de San Antonio Sacatepéquez del departamento de San Marcos y con los municipios de Palestina de los Altos y San Juan Ostuncalco ambos del departamento de Quetzaltenango.

5.3 OROGRAFÍA

El municipio corresponde a la altiplanicie ubicada en el cinturón volcánico de Guatemala en la cabecera de la cuenca, comprende suelos montañosos caracterizada por pendientes fuertes, topografía escarpada a ondulada, con algunos valles, planicies y elevaciones que van de 1600 msnm a más de 3000 msnm.

5.4 CLIMA

El clima actualmente es variado, con cierta predominación del frio especialmente al anochecer. Posee una franja de tierra templada de regular extensión que corresponde las aldeas de Provincia Chiquita, Corral Grande, Chim y el Tablero.

Durante los meses de diciembre a febrero se registran temperaturas de hasta 5°C bajo cero por las heladas que se originan en estas fechas de fin de año, durante el mes de marzo la temperatura alcanza los 21°C.

Cuenta con una precipitación media anual de 2,000 mm, con 140 días de lluvia por año, huna humedad relativa que va desde los 70 a 80%. Dos zonas de vida que son: Bosque muy húmedo montano subtropical (bmh.MB) y bosque muy húmedo Bajo Subtropical (bmh.M) y se encuentra inmerso en dos cuencas hidrográficas que son Rio Suchiate cuenca y Ríos el Naranja.

El promedio de Temperatura en el Centro Urbano es de 18°C en las aldeas más altas el promedio es de 8 a 14 °C y en las cálidas o boca costa la máxima es de 25°C. Durante el año se marcan dos épocas:

La Época seca, correspondida entre los meses de noviembre a abril.

La Época lluviosa, correspondida entre los meses de mayo a octubre.

5.5 ESTRUCTURA ESPACIAL O DISTRIBUCIÓN ACTUAL

El Municipio, consta de las siguientes unidades territoriales: 1 ciudad, 17 aldeas, 40 caseríos. El área urbana cuenta con ocho cantones: San Sebastián, La Parroquia, San Agustín Tonalá, El Mosquito, San Juan de Dios, Santa María, San Miguel y San Juan del Pozo.

VI OBJETIVOS

6.1 GENERAL

- a. Reproducir in vitro la planta de Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*.) para la producción de plantas y su aclimatación en invernadero bajo condiciones controladas, en el Municipio de San Pedro Sacatepéquez, departamento de San Marcos.

6.2 ESPECIFICO

- a. Evaluar la propagación de la *Stevia rebaudiana Bertoni*, por medio del cultivo in vitro.
- b. Evaluar el crecimiento de las microplantas de *Stevia rebaudiana Bertoni* propagadas in vitro.
- c. Evaluar el porcentaje de contaminación y sobrevivencia de los explantes de *Stevia rebaudiana Bertoni*.
- d. Determinar el porcentaje de aclimatación y adaptación de las plántulas de *Stevia rebaudiana Bertoni* propagadas en in vitro bajo condiciones controladas en invernadero.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MATERIALES Y EQUIPO

- Hojas de papel bond de 80gr (5 resmas).
- Tinta negra para impresiones (2 cartuchos).
- Lapiceros.
- Hojas para empastados.
- Hojas formato A1 (para mapas).
- Cinta adhesiva
- Marcadores
- Cámara fotográfica
- Computadora
- Impresora

7.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- Material vegetativo Stevia rebaudiana
- Cámara de crecimiento
- Cristalería
- Estuche de disección
- Mechero
- Guantes
- Vestuario de laboratorio
- Platos agitadores,
- Autoclave,
- Balanza.
- Compuestos químicos
- Cronometro o reloj

7.3 MATERIALES DE CAMPO

- Boletas de Campo control del desarrollo de los explantes, control de desarrollo de adaptación de las plantas
- Boleta de campo encuesta consumidor final del cultivo de la Stevia
- Lapicero.

7.4 RECURSOS HUMANOS

- Estudiante Tesista de la carrera Ingeniero Agrónomo con O. A. S. CUSAM/USAC
- Asesores-supervisores.

7.5 INSTITUCIONALES

- Centro Universitario de San Marcos CUSAM/USAC
- Laboratorio Privado de Ciencia y Tecnología

VIII METODOLOGÍA

La presente investigación se considera de tipo cualitativa descriptiva, cualitativa pues esta se fundamenta en la observación y la experimentación de los hechos y acciones concretas para llegar a una resolución de los mismos y descriptiva debido a que busca analizar y describir la interacción. Para la obtención de datos y análisis de las variables, se realizó un análisis estadístico de las distintas variables evaluadas por medio de análisis multivariado utilizando el programa estadístico Infostat, que permitió determinar los resultados significativos evaluados y representaciones gráficas, por medio de una prueba de separación de medias, Cubriendo tanto las necesidades elementales para la obtención de estadísticas descriptivas y gráficos para el análisis exploratorio, como métodos avanzados de modelación estadística.

Además, en el presente estudio se implementaron las siguientes metodologías desarrolladas en dos fases de acuerdo con los objetivos de la investigación, estas validadas anteriormente en investigaciones desarrolladas por la Escuela Agrícola Panamericana (zamorano 2002) y Colegio de Postgraduados Montecillo, Texcoco, Edo. De México (2012) para la micropropagación de cultivos in vitro y adaptación en condiciones controladas del cultivo de la *Stevia Rebaudiana*, las cuales se describen a continuación:

8.1 FASE I: INDUCCIÓN DEL CULTIVO IN VITRO DE STEVIA (*Stevia rebaudiana*) PARA SU MICROPROPAGACIÓN.

Para esta fase de investigación se desarrolló en el laboratorio privado de Biotecnología Vegetal ubicado en la 7ma calle 31-66 zona 1. Colonia el Paraíso Quetzaltenango, Guatemala.

Debido a que esta fase está basada en el proceso de micropropagación del cultivo in vitro de la Stevia, el proceso involucra una serie de etapas, las cuales se enumeran a continuación:

8.1.1 Etapa 0: selección de la planta madre

Las plantas madres se mantuvieron bajo condiciones controladas (invernadero) durante tres semanas en riego, fertilización y fumigadas una vez a la semana, en maceteros grandes de

aproximadamente 5 litros de capacidad, con el objeto del control de enfermedad ya que es importante que las plantas donantes estén vigorosas y sanas previo a la propagación en cultivo in vitro. (ZAMARANO, 2003). La selección de la planta madre es importante ya que de esto dependerá la futura propagación, para esto fueron plantas jóvenes, sanas, vigorosas y sin heridas, de aproximadamente 3 meses de edad.

8.1.1.1 Origen de las plantas:

Se utilizaron plantas madres, adquiridas de Mina Marlín, Montana Exploradora de Guatemala, ubicada el municipio de San Miguel Ixtahuacán del departamento de San Marcos donde están siendo cultivadas bajo invernadero, de la variedad Criolla (*Stevia rebaudiana Bertoni.*), introducida de Paraguay.

8.1.2 Etapa I: Selección, preparación y desinfección de los explantes.

Se estableció un cultivo aséptico in vitro del material vegetal que se seleccionó. Esta etapa involucro la selección, preparación y desinfección del explante escogido, y su cultivo aséptico in vitro:

8.1.2.1 Selección del explante

Se colectaron ramas de brotación joven de unos 10 a 12 cm de longitud, realizando los cortes con bisturí desinfectados con alcohol al 70% siendo estas de 10 a 15 explantes por planta madre de acuerdo a la morfología de la planta. Se recolectaron las ramas en horas tempranas de la mañana para evitar su deshidratación, con un total de 100 explantes para la micropropagación.

8.1.2.2 Preparación del explante

Es de importancia la preparación de los explantes debido a la eliminación de cualquier agente contaminante, para ello se deshojaron las ramas con bisturí desinfectadas con alcohol al 70% para luego lavarlas con agua destilada esterilizada.

8.1.2.3 Desinfección de los explantes:

La desinfección superficial de los explantes facilitó el establecimiento in vitro del cultivo y su micropropagación, para ello se realizaron diferentes pasos que se describen a continuación:

- a. Se sumergieron los explantes durante 2 horas en una solución desinfectante de “Tween 20”, diez gotas por cada 100 ml de solución. Manteniéndola en agitación constante a través de la parrilla de agitación. Luego se enjuagaron cinco veces con agua estéril para la eliminación del desinfectante.
- b. Seguido se desinfectaron los explantes en una solución de Benlate 5ml/lt, más “Tween 20”, diez gotas por cada 100 ml de solución durante seis horas. Manteniéndola en agitación constante a través de la parrilla de agitación. Se enjuagaron cinco veces con agua estéril para la eliminación del desinfectante. (sin embargo se realizaron pruebas preliminares de la dosis adecuada para el fungicida utilizado en esa investigación debido a la falta de comercialización del fungicida Benlate en las casas comerciales).
- c. En seguida se trasladaron a nivel de la Cámara de Flujo Laminar donde se sumergieron en alcohol al 70% durante cinco minutos. Se enjuagaron cinco veces con agua estéril para la eliminación del desinfectante.
- d. Se agregaron en Cloro al 1% y “Tween 20” diez gotas/litro durante veinte minutos dentro de la cámara de flujo Laminar. Se enjuagaron cinco veces con agua estéril para la eliminación del desinfectante.

8.1.3 Etapa II: preparación del medio de cultivo

Una parte importante del cultivo in vitro son los Medios de Cultivo ya que en ellos se encuentran las sustancias necesarias para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. (Pierik, 1990)

El medio empleado para la etapa de establecimiento in vitro de la Stevia fue el medio basal o básico Murashige y Skoog (MS) a una concentración del 100%, siendo la formulación y preparación descritas en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. *Formulación y preparación del medio nutritivo utilizado para la micropropagación in vitro de Stevia rebaudiana.*

COMPUESTO	Cantidad final en el medio de cultivo 1 g/1000ml	Cantidad disuelto en 0.5 g/500ml	Cantidad disuelto en 0.25 g/250ml
MACROELEMENTOS			
NH ₄ NO ₃	82.5	41.25	20.63
KNO ₃	95.0	47.5	23.75
MgSO ₄ 7H ₂ O	18.50	9.25	4.63
CaCl	22.0	11.0	5.5
KH ₂ PO ₄	8.50	4.25	2.13
MICROELEMENTOS			
MnSO ₄ H ₂ O	0.84	0.42	0.21
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.43	0.215	0.108
KI	0.04100	0.0205	0.0103
H ₃ BO ₃	0.3100	0.155	0.078
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.00125	0.000625	0.0003
CoCl	0.00125	0.000625	0.000313
Na ₂ MO ₄ 2H ₂ O	0.0125	0.00625	0.003
Na ₂ EDTA	1.86	0.93	0.465
FE SO ₄ 7H ₂ O	0.0278	0.01435	0.0071
SACAROSA			
Azúcar normal (sacarosa)	30g	15g	7.5g
OTROS COMPUESTOS			
Agar Agar	7g	3.5g	1.75g
pH	5.5		
Glicina	0.08	0.04	0.02
Mio-inositol	4.0	2.0	1.0
VITAMINAS			
Para cada formulación de vitaminas tomar 20ml para preparar 1 litro de medio			
	Para gr./200ml	Para gr./100ml	Tomar 5ml de solución para preparar 1 litro de medio
Ácido nicotínico	0.02	0.01	
Piridoxina	0.02	0.01	
Tiamina	0.016	0.008	

Fuente: Pierik (1990), adaptado para esta investigación.

8.1.4 Proceso de elaboración del medio de cultivo.

En un beaker de vidrio, se colocó la mitad del volumen de agua destilada del total final de medio de cultivo deseado, luego se agregaron los macro elementos, FeNa EDTA, microelementos, y sacarosa en las cantidades recomendadas (Cantidad final en el medio de cultivo g/L (250), para el caso de las vitaminas se tomó de acuerdo a lo recomendado para un litro de agua, en base a esto

se tomó 20 ml de cada solución por cada litro. Se mantuvo en agitación durante 30 minutos constante hasta que todos los componentes estuvieron completamente disueltos. Finalmente se aforo al volumen final deseado en frascos volumétricos.

Los tubos fueron tapados y esterilizados en una autoclave por 20 minutos a una temperatura de 120 °C y 15 PSI de presión.

Para el establecimiento del cultivo se preparó 1 litros/ de medio, dividiendo en porciones de 30 ml para cada beaker de 500 ml, El pH se ajustó al 5.5 utilizando soluciones de HCl y KOH. Una vez disueltos completamente los componentes del medio, éste fue dispensado en tubos de ensayo (25* 150 mm) a razón de 10 ml por contenedor.

8.1.5 Etapa III: siembra e incubación de los explantes al medio de cultivo

La siembra de los explante se realizó una vez completada la fase de asepsia del vegetal y la preparación del medio de cultivo, para ello se ejecutaron los siguientes pasos:

- a. El material vegetal aséptico se sembraron en tubos de ensayo, siendo un total de dos explantes por tubo de ensayo, todo este proceso se realizara dentro de la Cámara de Flujo Laminar para evitar contaminantes.
- b. Los tubos se etiquetaron de acuerdo a la fecha y material vegetal, se colocaron en gradillas en el cuarto de crecimiento, el cual mantuvieron una temperatura de 21 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz, utilizando tubos fluorescentes del tipo blanco frío.

8.1.6 Etapa IV: control del desarrollo de los explantes

La revisión de los explantes de cada tubo de ensayo fueron realizadas a los 8, 15, 30 y 45 días después de la siembra, con el objetivo de conocer su formación y desarrollo, la presencia de contaminines y/u oxidación después de la siembra. Los explantes contaminados, ya sea por hongos o bacterias, y los explantes oxidados completamente, fueron descartados para evitar una contaminación cruzada hacia los tubos no contaminados.

Se tomaron datos de cada tubo individualmente. Las variables evaluadas fueron las siguientes:

- a. Número de explantes y contenedores contaminados
- b. Tipo de contaminación: Hongo o bacteria
- c. Clorosis: El grado de clorosis será medido en una escala de 0 a 4. Los explantes que presenten oxidación alta y oxidación total serán descartados.
C0: sin clorosis.
 - C1: clorosis leve (0-25%)
 - C2: clorosis media (25-50%)
 - C3: clorosis alta (50-75%)
 - C4: clorosis total (75-100%)
- d. Formación de primordios foliares: SI o NO, esto para medir sobrevivencia de los explantes
- e. Número de primordios por explante: se considera un explante brotado a partir del surgimiento de un brote visible a simple vista.
- f. Formación de hojas: número de hojas formadas a lo largo del crecimiento.
- g. Tamaño de los explante: la medición se hizo en forma aproximada con una regla milimetrada desde la parte externa del tubo de ensayo.

Cuadro 2. Variables evaluadas para la tabulación de los datos del desarrollo del cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana*

Fecha:				
Numero de explantes cultivados	Numero de explantes contaminados	Tipo de contaminación Hongo/bacteria	% de contaminación	Presencia de clorosis por explante
% de clorosis en los explantes	Formación de primordios foliares SI/NO	Numero de primordios por explantes	formación foliar	No de hojas por explantes
Tamaño de los explantes	% Sobrevivencia			

Fuente: elaboración propia

8.1.7 Etapa V: resiembra de explantes para la formación de raíces

En esta etapa los explantes de *Stevia* obtenidos de la incubación y desarrollo en el medio de cultivo fueron trasladados a un nuevo medio de cultivo MS sin la adición de reguladores de crecimiento, sin embargo con la adición de la hormona del tipo citocinina, para inducir a la aparición de raíces, siendo este el AIB (Ácido indolbutírico) a 0.1 mg/L de solución para el desarrollo de raíces *in vitro*.

8.1.7.1 Toma de datos:

Se realizaron observaciones de aproximadamente 8 días, sobre el progreso del enraizamiento.

8.1.8 Etapa VI o Final: preparación de las plantas previo a la siembra en sustrato

Después de los días de permanencia en los tubos de ensayo dentro del cuarto de crecimiento se extrajeron las plantas enraizadas y sus raíces se lavaron con agua corriente para posteriormente lavarlas con agua destilada durante cinco minutos para eliminar los residuos del agar, para luego sembrarlas individualmente en sustrato Peatt Moss dentro del micro invernadero para evitar el estrés y pérdida de las plantas.

8.2 FASE II: ADAPTACIÓN Y ACLIMATACIÓN DEL CULTIVO DE STEVIA (*Stevia rebaudiana*) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

Después de obtener las microplantas es necesario lograr la adecuada adaptación, características que le permiten a las plántulas desarrollarse en un ambiente *ex vitro*, es decir, las plantas deben adaptarse a nuevas condiciones ambientales tales como, baja humedad relativa, alta intensidad de luz y fluctuaciones de temperatura, por lo que la transferencia debe realizarse de forma gradual y esto solo se logra a través de la aclimatación de las plantas en espacios que proporcionen las condiciones controladas que gradualmente las “endurezcan”.

Para ello en esta investigación se realizó la construcción de un macrotunel que proporcione la aclimatación gradual de las plantas de Stevia bajo ambientes controlados para su adaptación a las condiciones ex vitro. El cual estuvo ubicado en la vía 4 Zona 4 2-51 Cantón Tonalá, San Pedro Sacatepéquez San Marcos.

8.2.1 Construcción del invernadero para la adaptación del cultivo de Stevia

Se implementó un modelo de producción con enfoque ecológico, a través, de la reutilización de materiales para la construcción del micro invernadero que cumplió con las condiciones necesarias permitiendo a las microplantas adaptarse a las condiciones ex vitro.

8.2.1.1 Descripción de la estructura del invernadero

La construcción del invernadero se realizó mediante el diseño de la estructura necesaria para el desarrollo de la investigación, siendo este con una capacidad de 100 plántulas. La estructura con la que se construyó el invernadero consto de los materiales: madera y malla de acero inoxidable para los cimientos (base), así también de policarbonato para la cubierta exterior. La estructura estuvo basada en tubos PVC de ½ pulgada, constituyendo 5 iguales colocados paralelamente y unidos mediante correas, correas que unieron los tubos y soportaron su peso sobre ellos. Las medidas del micro invernadero fueron las siguientes:

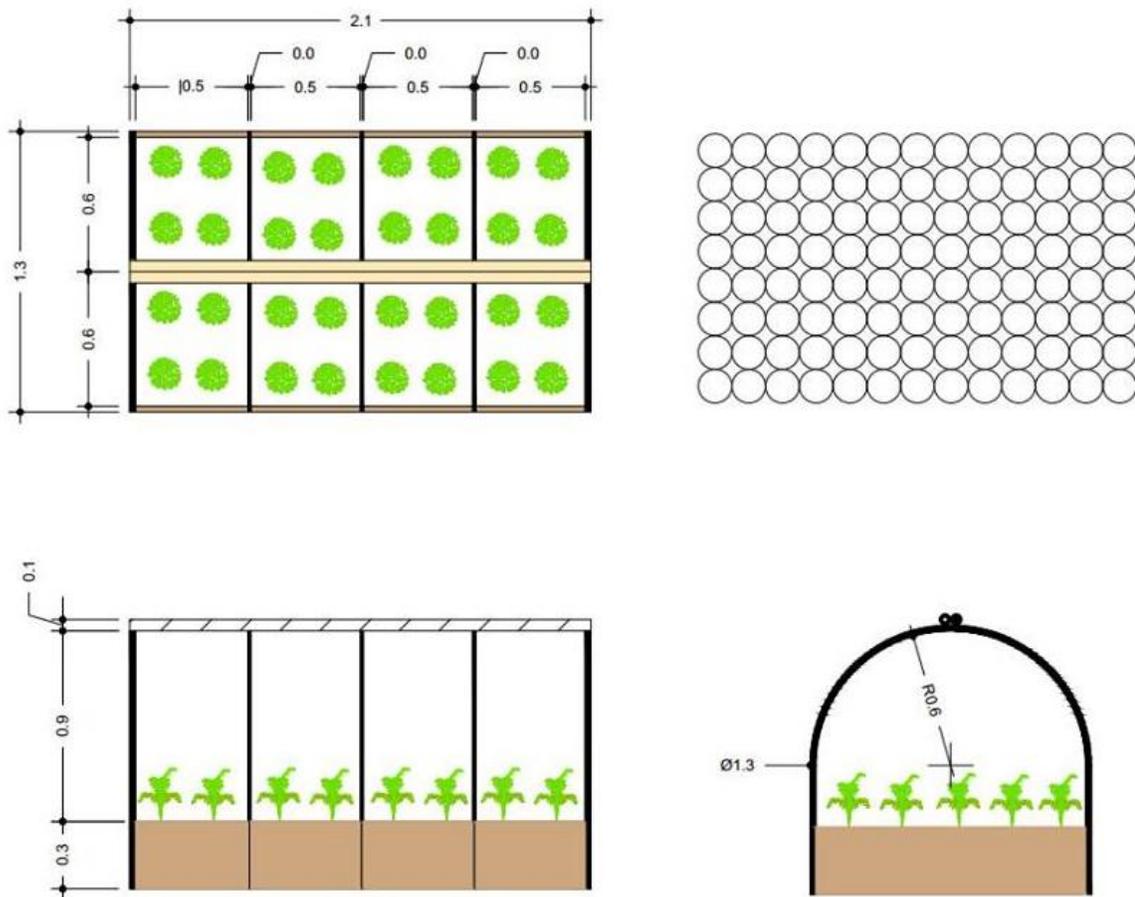
- Longitud: 2.10 metros,
- Ancho: 1.30 metro,
- Altura máxima: 1.20 metro

8.2.1.2 Diseño del invernadero

- a. Base: la base tuvo un diseño de cajón con las medidas de 2.1 m de largo por 1.3 m de ancho y 30 cm de altura, este fue realizado con cajas de madera de pallets (cajas de madera para frutas).
- h. Estructura: se realizó con tubos PVC de ½ pulgada, con forma de arco, con una altura de 90cm hasta la periferia (∞)

- i. Cubierta: Se reutilizo plástico de invernadero de calibre 720 (4.5 x 7) m de otro invernadero, para la cubierta exterior.
- j. Sombra: sarán (manta) al 90 % de sombra (0.50x1.5) m, para el control de luminosidad.

Figura 3. Plano del Diseño del macrotunel, dimensiones y distribución de las vitroplantas dentro del macrotunel.



Fuente: elaboración propia

8.2.1.3 Cajas germinadoras:

Se instalaron dentro del micro invernadero cajas germinadoras de material reciclable siendo estas domos para pastel con las dimensiones 45 x 33 x 12cm, donde se establecieron los primeros días las microplantas para el control de deshidratación y adaptación de las plantas. Se colocaron en vaso de unicelel de ocho onzas de capacidad

conteniendo el sustrato y las microplantas extraídas del laboratorio. Fueron distribuidas las 100 plantas dentro de las cajas germinadoras, como se observa en la figura 4 y 5, donde se desarrollaron las microplantas.

Figura 4 Caja germinadoras (domo para pastel) para adaptación de las vitroplantas en los primeros días después del traspaso del medio de cultivo al sustrato.

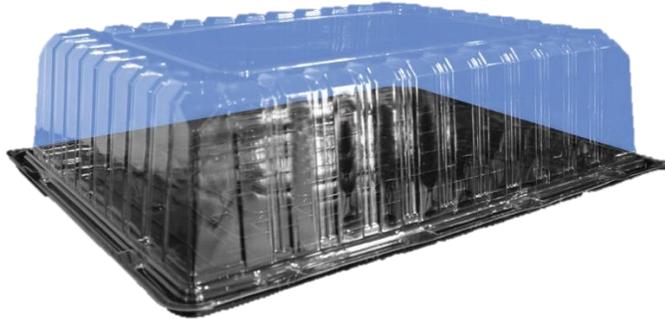
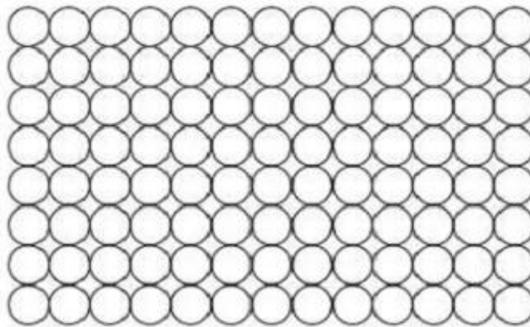


Figura 5 Distribución de las plántulas dentro de la caja germinadora



Distribucion de plantulas

Fuente: elaboración propia

8.2.2 Instalación del cultivo de *Stevia rebaudiana* dentro del micro invernadero.

En base a las recomendaciones técnicas del Colegio de Postgraduados Montecillo, Texcoco, Edo. De México, para la adaptación del cultivo de la *Stevia Rebaudiana*, se considera lo siguiente:

8.2.2.1 Material vegetal:

Se utilizaron plántulas de *Stevia rebaudiana* obtenidas a partir de la micropropagación provenientes de material genético en el laboratorio de biotecnología vegetal de 45 días de

incubación, extrayendo las plantas con raíces desarrolladas para sembrarlas individualmente en un sustrato adecuado dentro del macrotúnel para evitar estrés, deshidratación y muerte de las vitroplantas.

8.2.2.2 Sustrato:

El uso de materiales de sustrato suficientemente porosos que permita un adecuado drenaje y aireación se ha recomendado para una rápida regeneración de las plantas ex vitro, por lo que en este paso se utilizó el sustrato Peatt Moss humedecido a capacidad de campo, cumpliendo con las características anteriormente descritas.

8.2.2.3 Solución fertilizante:

Las necesidades nutritivas de la Stevia, de acuerdo con (FUNCFOS, 2000) son: 103 kg de nitrógeno (N), 28 kg de fósforo (P), 83 kg de potasio (K) y microelementos. Se utilizó una solución fertilizante foliar a base macro y micro elementos nombre comercial “**CreciPlant**” en una dosis de 2 ml L⁻¹ cada 8 días.

8.2.2.4 Luminosidad:

Las plantas cultivadas in vitro crecen a bajos niveles de luz, por lo que desarrollan hojas muy delgadas, y con alteraciones anatómicas y funcionales. Por lo que las cajas germinadoras se cubrieron con tela oscura que proporcione el 90% de sombra durante los primeros 8 días para controlar la humedad relativa (Sivaram L., 2003) y para evitar una alta tasa de transpiración que en consecuencia da la muerte de las vitroplantas por deshidratación, sombra que posteriormente fue retirada como parte del proceso de adaptación dentro del macrotúnel.

8.2.2.5 Riego:

El riego se hizo de forma manual, según las necesidades de las plantas, este factor está relacionado con la hora de aplicación, la cual se practicó en las primeras horas de la mañana o por

las tardes, tomando en consideración abrir lo menos posible el micro invernadero con el fin de no perder la humedad de los mismos. (Castro Doomernik, 1999)

8.2.2.6 Temperatura:

Respecto a la temperatura las plantas se desarrollan mejor entre los 20 y 29°C por lo que es importante manejar estos rangos durante la aclimatación (Ruiz, 2003). Por lo que se levantó un registro de la temperatura dentro del invernadero por medio de un termómetro en grados centígrados para el desarrollo óptimo las plantas.

8.2.3 Control del desarrollo de adaptación de las plantas de *Stevia rebaudiana*.

El control del desarrollo de las plantas cultivadas se realizó por medio de la toma de datos en forma individual a partir del momento del trasplante y seguidamente se observaron a los 8, 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra de acuerdo a estudios de adaptación y aclimatación (ZAMARANO, 2003; Baxcajay L. V., 2012) .

Las variables a considerar en el proceso de la toma de datos se describen a continuación y se anuncia en el siguiente cuadro:

- a.** Numero de plántulas cultivadas: el número de microplantas para la etapa de adaptación fue un total de acuerdo con los resultados obtenidos de la etapa de micropropacion.
- k.** Altura de las plantas: Altura de la planta al término de la adaptación, tomando en consideración la altura mínima (altura inicial) y la altura máxima (altura final). Las medidas de altura de las plantas fueron tomadas desde la base del tallo de la planta en la superficie del sustrato hasta el ápice de la planta, para conocer la tasa de crecimiento.
- l.** Numero de hojas: Número de hojas iniciales y número de hojas desarrolladas por la planta al término de la adaptación.

- m. Número de tallos o ramificaciones: se considera un explante brotado a partir del surgimiento de un brote visible a simple vista para conocer la tasa de desarrollo morfológico de la planta final en comparación con lecturas anteriores.
- n. Supervivencia (%): Para la evaluación de esta variable se tomó en consideración el total de las plántulas sembradas, consideradas como el 100%, en diferencia con el total de vitroplantas vivas en cada una de las observaciones, para la obtención del porcentaje de las vitroplantas sobrevivientes.
- o. Adaptación (%): para la evaluación de esta variable se tomó en consideración el número de días a partir de la siembra y el desarrollo de las vitroplantas tomando en consideración altura de la planta y desarrollo de hojas y ramificaciones.

Cuadro 3. *Observaciones para la adaptación y aclimatación de las plantas de Stevia.*

Fecha:			
No de lectura			
No de plántulas	No de plantas viva	Altura de plantas (cm)	No de riego / semana
Presencia de plagas o enfermedades SI/NO	Brotación de hojas SI/NO	No de Brotación de hojas	Número de tallos o ramificaciones
% de supervivencia	% de adaptación	Temperatura °C	

Fuente: elaboración propia

8.2.4 Periodo de la adaptación y aclimatación bajo condiciones controladas

Las plántulas in vitro requieren de un periodo para adaptarse a las condiciones “in vivo” y lograr la aclimatación para ser trasplantadas a terreno definitivo. En el caso de las plantas de Stevia recién liberadas in vitro se necesitó un periodo de 60 días, de acuerdo con estudios realizados por (ZAMARANO, 2003) y donde se evaluó el porcentaje de supervivencia y la adaptación de las plantas antes de ser liberadas a condiciones de campo.

8.3 FASE III: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

Se realizó el ordenamiento y tabulación de los datos obtenidos para cada una de las variables evaluadas de acuerdo con los días de observación en cada una de las fases desarrolladas, por lo que se procedió a la elaboración de una bases de datos y por medio de la estadística descriptiva se realizó un análisis estadístico de las distintas variables evaluadas por medio de análisis de medias utilizando el programa estadístico **Infostat** siendo un software que cubre tanto las necesidades elementales para la obtención de estadísticas descriptivas y gráficos para el análisis exploratorio, además de permitir la determinación de los resultados significativos evaluados y representaciones gráficas, por medio de realizar una prueba de separación de medias, para encontrar los puntos críticos de crecimiento, el porcentaje de contaminación y sobrevivencia de los explantes que nos dieron a conocer el crecimiento de las plántulas en el proceso de propagación en la fase de micropropagación; y el crecimiento y desarrollo de plántulas obtenidas in vitro para conocer el porcentaje de adaptación en invernadero durante la fase de adaptación y aclimatación, utilizando el mismo programa estadístico.

IX RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 ANALISIS ESTADISTICO

La investigación se considera de tipo cualitativa descriptiva, cualitativa esta se fundamenta en la observación del comportamiento de los sujetos de estudio influenciados por la experimentación de sus hechos y las acciones concretas para llegar a una resolución de los mismos; y es descriptiva debido a que busca describir y analizar el resultado de esta resolución por medio de variables que califiquen (cualitativas) y cuantifiquen (cuantitativa) los objetos y la interacción de las mismas en estudio, puesto que cubre tanto las necesidades elementales para la obtención de los resultados de las variables cualitativas y cuantitativas de los elementos (plántulas in vitro y ex vitro) observados y la comprensión clara y precisa por medio del uso de gráficos para el análisis exploratorio, así como la interacción entre variables y la influencia de estas en el resultado obtenido.

Por lo cual los datos fueron analizados con el programa estadístico “INFOSTAT” versión estudiantil. Se realizó la prueba de chi-cuadrado (χ^2) de los resultados obtenidos para las dos fases, para determinar si cada uno de los elementos utilizados para el crecimiento y desarrollo de las plántulas de Stevia tanto medio de cultivo in vitro como dentro en la adaptación y aclimatación de las mismas, influyó en cada una de las variables estudiadas por consiguiente influyendo sobre los resultados de interés.

En la Fase de inducción del cultivo in vitro de Stevia (*Stevia rebaudiana*) para su micropropagación, el tamaño de los brotes fue medido en cuatro periodos, 8, 15, 30 y 45 días después de siembra, por lo que se realizó un análisis de medias para cada una de las observaciones realizadas para determinar la tasa de crecimiento de las microplantas. Los datos obtenidos a los 8 días después de la siembra (dds) fueron considerados para determinar la tendencia en el crecimiento promedio de los brotes, pero la decisión final del crecimiento de las microplantas se basó en los resultados obtenidos a los 45 después de la siembra que dieron a conocer la eficacia de la metodología utilizada para la propagación del cultivo de Stevia en medio de cultivo in vitro.

Figura 6 Inducción del cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni para su micropropagación en cultivo in vitro.



Para la fase de adaptación y aclimatación del cultivo de *Stevia rebaudiana* bajo condiciones controladas fue medido en seis periodos siendo: 0, 8, 15, 30, 45 y 60 días después de siembra; considerando el día 0 como el punto inicial del proceso de adaptación de las vitroplantas de las cuales se tomó en consideración el tamaño y morfología de la vitroplantas obtenidas en la fase de micropropagación in vitro, resultado que fue comparado y analizado con un análisis de medias con cada una de las observaciones realizadas hasta el día 60 después de las siembra lo cual permitió determinar la tasa de sobrevivencia principalmente, seguido por el crecimiento y desarrollo morfológico de la vitroplantas dentro de las condiciones ex vitro con el objeto de conocer la eficacia de la metodología empleada para esta fase de adaptación de las vitroplantas al medio ex vitro.

Figura 7 Proceso de adaptación y aclimatación del cultivo de *Stevia rebaudiana* bajo condiciones controladas.



9.2 RESULTADOS FASE I: INDUCCIÓN DEL CULTIVO IN VITRO DE STEVIA (*Stevia rebaudiana*) PARA SU MICROPROPAGACIÓN.

9.2.1 Características del material vegetal

Para el establecimiento in vitro de *Stevia rebaudiana* se utilizaron plantas de la variedad criolla con una edad joven de 3 meses, de apariencia sana y sin heridas (Anexo 1). Esto concuerda con (Villegas, 2006) mencionando que el éxito del establecimiento de cualquier material vegetal en el cultivo in vitro depende de varios factores, incluyendo las condiciones de salud de las plantas madres en el campo o invernadero y su edad: mientras más antiguas sean las plantas, mayor es la probabilidad de contaminación in vitro debido al tiempo de exposición a contaminantes ambientales. Se recolectaron ramas con brotación joven de unos 10 a 12 cm de longitud, realizando los cortes con bisturí para la obtención de explantes con presencia de yemas axilares de aproximadamente de 1.5 a 2.5 cm de longitud como se observa en la figura 8; el explante con presencia de yemas axilares es el más usado para los procesos de propagación in vitro por su gran estabilidad genética, sin embargo el número de plantas obtenidas está determinado por el número de yemas axilares presentes en el inóculo (CONACYT, 1998) (Castillo A. , 2008)

Figura 8 Obtención de ramas y explantes con yemas axilares de *Stevia rebaudiana*.

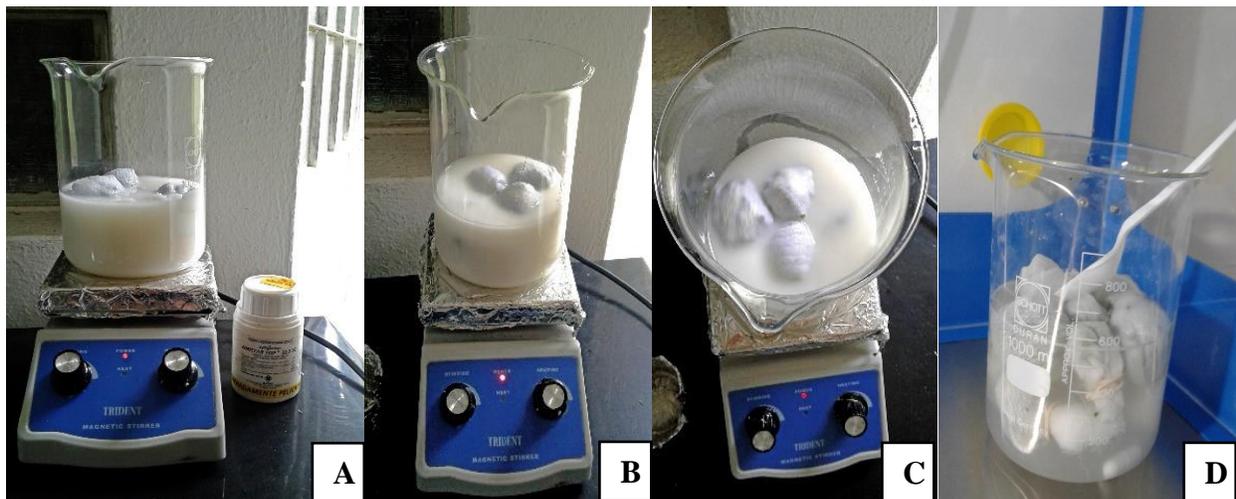


9.2.2 Desinfección superficial y preparación del material vegetal

Para este estudio, se realizaron pruebas preliminares de esterilización superficial del material, para facilitar el establecimiento in vitro del cultivo, debido a que actualmente ya no es comercializado en Guatemala el fungicida sistémico Benlate establecido para la etapa de la desinfección, por tal razón se utilizó el fungicida Amistar ya que actúa inhibiendo el proceso respiratorio de los hongos, resultando especialmente eficaz para impedir la germinación de esporas y el desarrollo inicial del patógeno.

Para la desinfección de los explantes en condiciones asépticas se cortaron segmentos de aproximadamente 1.5 a 2 cm de longitud con los cuales se probaron tres concentraciones de Amistar en tres tiempos de exposición, para un total de 9 tratamientos (Cuadro 4), por lo que se sembraron 10 tubos por tratamiento siendo un explante por tubo. A todas las soluciones se les agregó 3 gotas de “Tween 20” por cada 100 ml de solución desinfectante, para disminuir la tensión superficial de los tejidos.

Figura 9 Desinfección superficial del material vegetal de *Stevia rebaudiana* con el fungicida sistémico Amistar



Proceso de desinfección de los explantes, **A**: se sumergieron los explantes en diferentes concentraciones de fungicida Amistar; **B y C**: agitación constante a través de la parrilla de agitación para un mayor desinfección; **D**: traslado de los explantes a nivel de la cámara de flujo laminar para evitar contaminantes del ambiente.

Cuadro 4. *Diferentes dosis empleadas para la desinfección de los explantes de Stevia rebaudiana con el fungicida sistémico Amistar.*

Concentración de Amistar ml/L	Tiempo de exposición		
	2 horas	4 horas	6 horas
1 ml L-1	A ¹	B	C
3 ml L-1	D	E	F
5 ml L-1	G	H	I

¹Utilización de 10 explantes por tratamiento y exposición
Fuente: Elaboración propia para esta investigación

La evaluación de las diferentes dosis del fungicida Amistar en los diferentes tiempo de exposición permitió determinar el mejor tratamiento de desinfección en los explantes de Stevia para su establecimiento en condiciones *in vitro*. El mejor resultado de los diferentes tratamientos fue el Tratamiento A, con un tiempo de inmersión de 2 horas con una dosis del fungicida Amistar de 1 ml/L, el cual disminuyó los porcentajes de contaminación microbiana con valores cercanos al 10%, con una sobrevivencia del 90% de los explantes siendo el más adecuado para disminuir la contaminación y no presentar un grado de clorosis en los explantes presentando un 90% de sobrevivencia de los explantes.

Figura 10 *Alto porcentaje de sobrevivencia de los explantes de Stevia como respuesta del tratamiento A.*

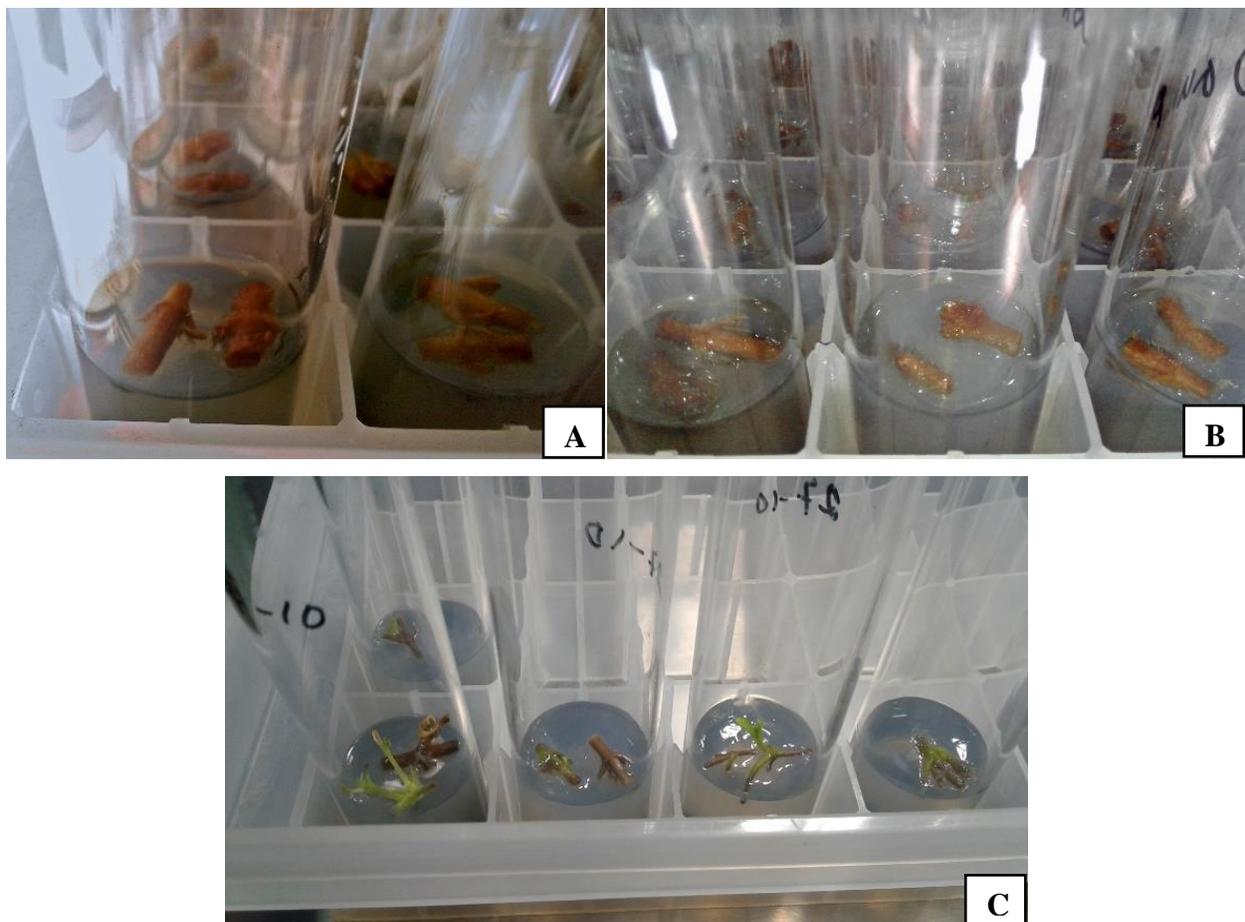


Fuente: información de campo.

Conforme a lo observado, los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos mostraron diferencias significativas entre las concentraciones del fungicida y los tiempos de exposición detallado en la Gráfica 1. Los tratamientos con 1 ml L-1 del fungicida Amistar mostraron los menores porcentajes de contaminación (1 explantes contaminado de 10 explantes

establecidos) siendo el 10%, de contaminación como se observa en la figura 11. Para el caso de los tratamientos con las concentraciones 5 ml L-1, 3 ml L-1 y 1ml/L-1 de fungicida en los diferentes tiempos de exposición, a excepción del tratamiento A, no mostraron presencia de hongos o bacterias, sin embargo presentaron un grado alto de clorosis u oxidación siendo del 100% de clorosis en los explantes, provocando la muerte de los mismos, estos casos fueron causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante y los cortes que sufre el explante.

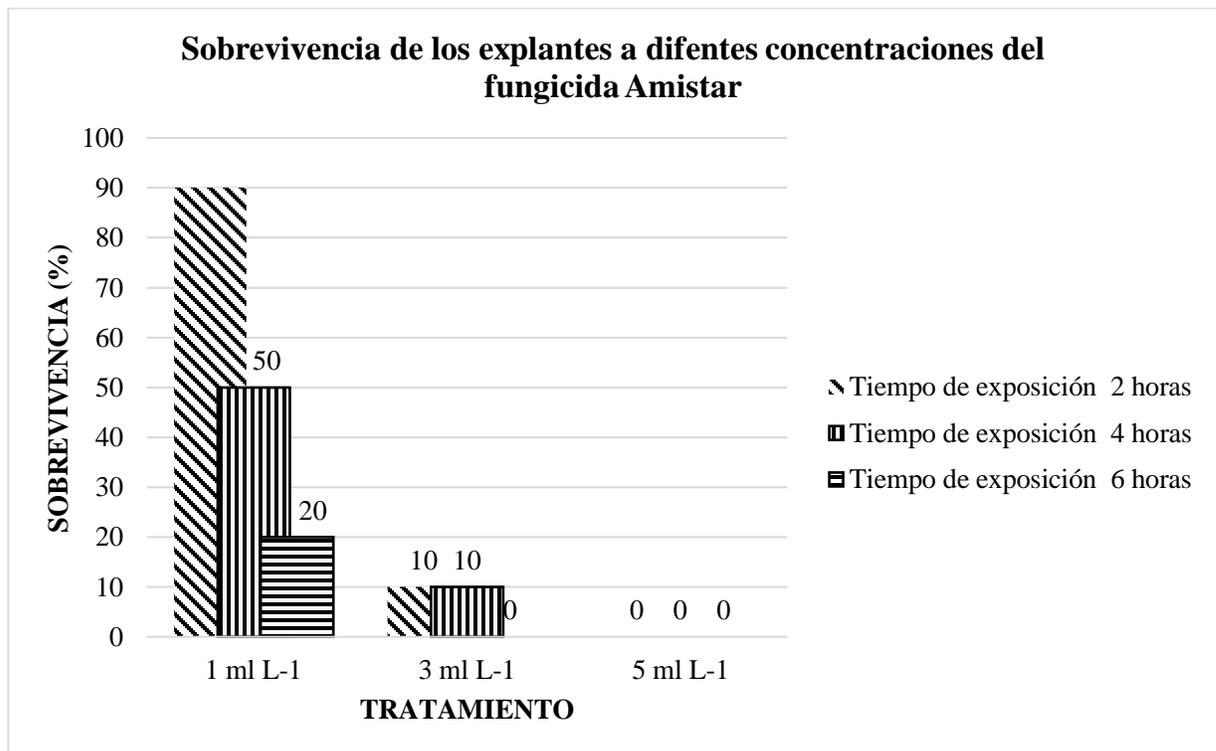
Figura 11 *Presencia de oxidación o clorosis en los tratamiento con un alto grado de concentración (dosis) y tiempo de exposición del Fungicida Amistar.*



Observaciones realizadas de los diferentes tratamientos; **A y B:** se aprecia un alto grado de clorosis u oxidación en los explantes de las diferentes tratamientos en las concentraciones de 5 ml L-1, 3 ml L-1 y 1ml/L-1 en diferentes tiempos de exposición. **C:** Alto porcentaje de sobrevivencia como respuesta del tratamiento B sin embargo presencia de contaminantes en los explantes.

De acuerdo con los resultados obtenidos de cada una de las observaciones para los diferentes tratamientos se entiende que entre menos tiempo de exposición con menor grado de concentración o dosis del fungicida mayor porcentaje de sobrevivencia de los explantes de acuerdo con la siguiente Gráfica.

Grafica 1 Efecto de las diferentes concentraciones del fungicida Amistar en la sobrevivencia de los explante de *Stevia rebaudiana*.



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

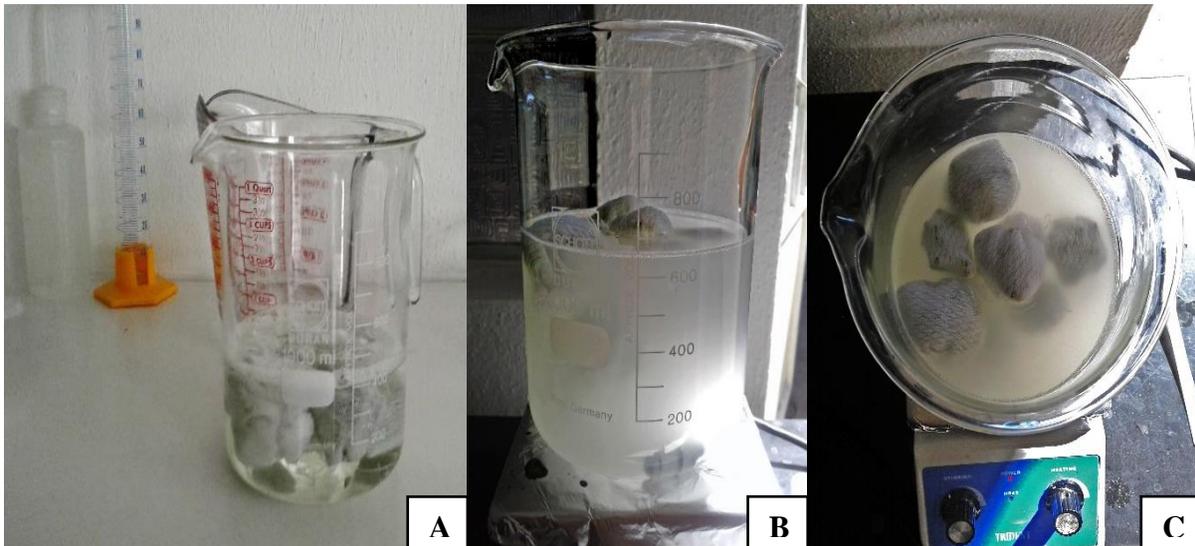
Por consiguiente la sobrevivencia de los explantes es afectada a diferentes tiempos de exposición en las diferentes concentraciones del fungicida inhibiendo el crecimiento de microorganismos bajo condiciones in vitro. Por lo tanto, para el establecimiento del cultivo in vitro de *Stevia rebaudiana B*, se aplicará de 1 ml L⁻¹ del fungicida Amistar con 2 horas de exposición que obtuvo los mejores resultados en el mayor porcentaje de sobrevivencia de explantes.

9.2.1 ESTABLECIMIENTO DE LOS EXPLANTES

9.2.1.1 *Desinfección del material vegetal con el fungicida Amistar con dosis preestablecida.*

De acuerdo con las pruebas preliminares se determinó el uso del fungicida Amistar a una concentración de 1 ml L⁻¹ de fungicida con 2 horas de exposición obteniendo el mayor porcentaje de supervivencia de explantes y con el menor grado de contaminación. Por tanto para la desinfección de los explantes en condiciones asépticas se cortaron segmentos de aproximadamente 1.5 a 2 cm de longitud los cuales se sometieron a un proceso de desinfección que consistió en lavarlos tres veces con agua corriente, para posteriormente mantenerlos sumergidos en desinfectante “Tween 20” 10 gotas por cada 100 ml durante 2 horas, seguido por 2 horas de exposición con fungicida Amistar a una concentración de 1ml L⁻¹ en agitación constante.

Figura 12 *Desinfección de los explantes de Stevia con la dosis recomendada de fungicida Amistar, para el establecimiento en el cultivo in vitro.*

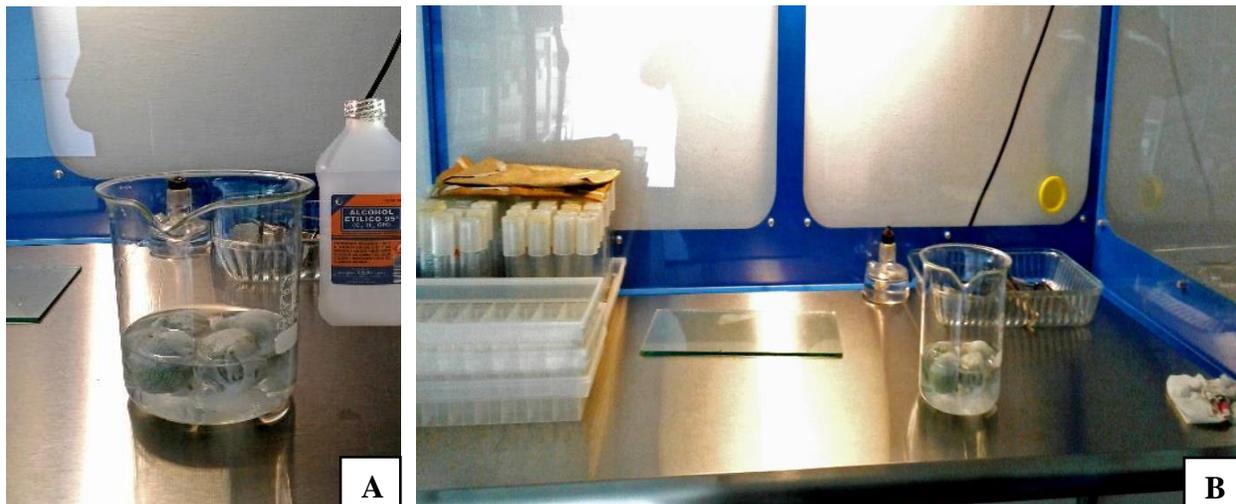


Proceso de desinfección de los explantes, **A**: Explantes en solución con desinfectante “Tween 20” durante 2 horas. **B y C**: desinfección de los explantes con fungicida Amistar con dosis y tiempo de exposición preestablecida.

Realizada la desinfección se trasladaron los explantes a la cámara de flujo laminar donde se procedió a la desinfección final con alcohol al 70% y Cloro (1 %) durante 5 y 20 minutos

respectivamente y enjuagados tres veces por cada solución con agua destilada esterilizada, previo a la siembra in vitro.

Figura 13 *Desinfección de los explantes dentro de la cámara de flujo laminar previo a la siembra en el medio de cultivo.*



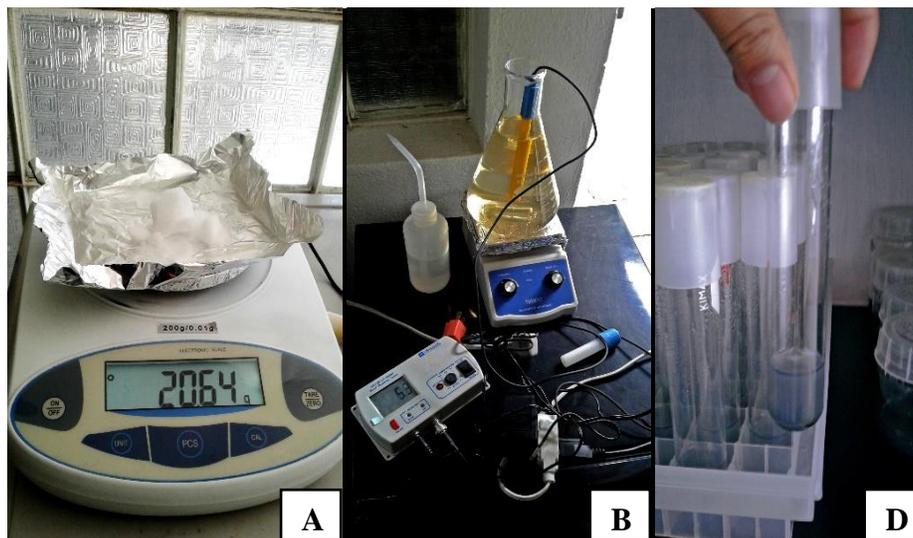
Desinfección de los explantes en condiciones asepticas, A: sumergimiento en alcohol al 70% durante cinco minutos B: colocación de los explantes en Cloro al 1% y “Tween 20” diez gotas/litro durante veinte minutos, como parte del proceso de desinfección de los explantes. Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

9.2.1.2 Preparación del Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado en la etapa de inducción de brotes fue el de Murashige y Skoog (MS, 1962) a una concentración del 100% MS, al cual se le agregaron 7.5 g L⁻¹ de sacarosa, reguladores de crecimiento Auxina/citocinina siendo el ácido Indolbutirico (1 mg L⁻¹) y la Bencilaminopurina (1 mg L⁻¹) respectivamente. El pH se ajustó a 5.3 y el uso de agar agar 7 g L⁻¹ para la obtención de un medio sólido con carbón activado de 0.5g/l. El medio de cultivo se esterilizó en una autoclave a 121°C durante 40 min y después se dispuso en los tubos de ensayo (25* 150 mm) a razón de 10 ml por contenedor. Se micropropagaron 100 explantes sobre medio de cultivo almacenados a una temperatura de 21 °C en presencia de luz blanca fluorescente (40 μmol m⁻² s⁻¹) siendo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuras, por un período de 45 días. Al final de la séptima semana de cultivo se evaluó el número de órganos desarrollados con el fin de determinar la regeneración y crecimiento de las plántulas influenciados por la concentración de

macroelementos MS (Cma), el tipo de auxina/citocinina (AIB/BAP) y la concentración de AIB/BAP a 1mg L⁻¹ de solución.

Figura 14 Preparación del medio Murashige y Skoog a una concentración del 100% para la micropropagación del cultivo de *Stevia rebaudiana*.



Proceso de preparación del medio de cultivo; **A:** cálculo del peso de los macroelementos, microelementos, sacarosa, vitaminas, agar agar y carbón activado en las cantidades recomendadas. **B:** medición del pH siendo 5.3 para el cultivo de *Stevia*, **C:** medio de cultivo preparado dentro de tubos de ensayo para la siembra de los explantes de *Stevia*. Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

9.2.1.3 Siembra de los explantes de *Stevia rebaudiana*:

Bajo condiciones asépticas, dentro de la Cámara de flujo laminar, se ajustó el tamaño de los explantes con yemas axilares hasta 1.5 cm cortando los extremos, colocados en posición horizontal, en el medio de cultivo, a razón de un explante por tubo.

Figura 15 Siembra de los explantes de *Stevia* en tubos de ensayo dentro de la cámara de la flujo laminar bajo condiciones asépticas.



Siembra de los explantes de *Stevia* realizada en condiciones asépticas, **A:** preparación del medio y materiales para la siembra de los explantes, **B:** tamaño de los explantes con yemas axilares hasta 1.5 cm **C:** siembra de los explantes en tubos de ensayo colocados en posición horizontal.

Se sembraron un total de 100 explantes con presencia de yemas axilares para la inducción de microplantas de *Stevia rebaudiana* en medio de cultivo in vitro con el ajuste de las condiciones necesarias para la obtención de respuestas fisiológicas o morfológicas a partir de estos explantes.

Figura 16 Incubación de los 100 explantes de *Stevia* en el cuarto de crecimiento.



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

9.2.1.4 Determinación de la sobrevivencia de los explantes después de la siembra.

La obtención del porcentaje contaminación, se obtuvo de acuerdo al número de explantes contaminados hasta el día 45 después de la siembra multiplicado por el 100% y dividido por la cantidad total de los explantes establecidos de acuerdo con la fórmula establecida para el cultivo in vitro de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño (García, Abeal, Rodríguez, & Rodríguez., 2009). Por lo que la revisión de los cultivos contaminados y/u oxidados se comenzó al tercer día después de la siembra y a partir de allí cada 8 días.

Fue posible observar que durante los primeros 5 días después de la siembra los explantes mostraban evidencias de contaminación, observándose en 2 medios de propagación la presencia de hongos en forma de halo alrededor de los explante siendo de color blanco con apariencia de algodón, que dio paso al recubrimiento total y muerte de los explante a los 8 días después de la siembra como, producto de la presencia del patógeno en el interior de los explantes establecidos, como se observa en la figura siguiente.

Figura 17 *Presencia de hongo como contaminante en el medio de cultivo de Stevia.*



Fuente: Tesista CUSAM 2018, información de campo

De igual forma a los 5 días después de la siembra se observó la presencia de bacteria en uno de los explantes, teniendo como característica una pigmentación de color rosado iniciando alrededor del explante y finalizando a los 8 días después de la siembra con el recubriendo total del

explante y medio de cultivo, producto de la introducción de microorganismos durante la manipulación en el laboratorio que origino la muerte del explante, como se puede observar en la siguiente figura:

Figura 18 *Presencia de bacteria como contaminantes dentro del cultivo in vitro de Stevia.*

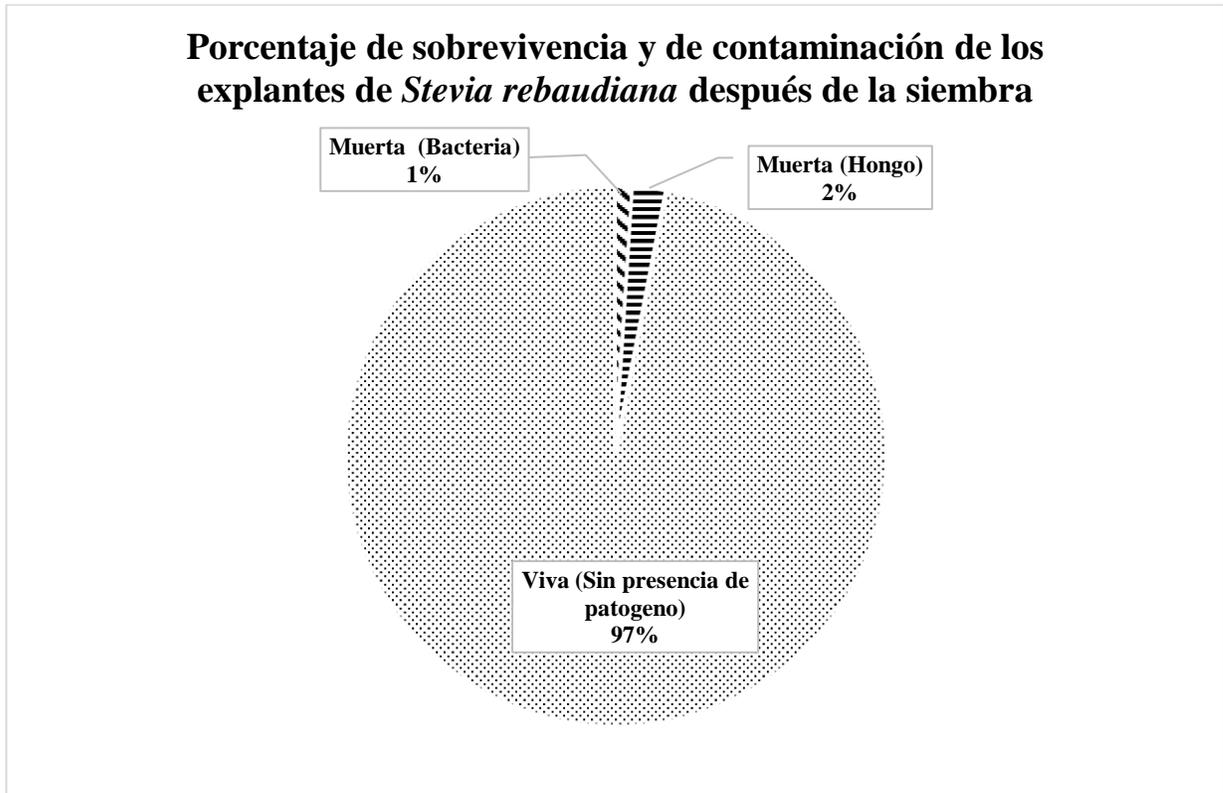


Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

Esto corrobora lo señalado por (Folgueras, 2011) y (Rodríguez Margarita, 2008) indican que los contaminantes más comunes durante el establecimiento *in vitro* de explantes de plantas, son los hongos y las bacterias denominados "vitropatógenos" que pueden tener dos orígenes: a) microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y b) microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio que habitan de manera normal en el cultivo de las mismas en condiciones naturales produciendo cuantiosas pérdidas de material, dañando el cultivo de tejidos vegetales, ya que compiten con el explante por los nutrientes del medio y les producen daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o liberación al medio de metabolitos tóxicos provocando la muerte de los mismos y que en el mejor de los casos inhibe el crecimiento y desarrollo de los explantes.

Por lo que de acuerdo con lo observado se obtuvo un porcentaje de contaminación por vitropatógenos de un 3% y permitió la supervivencia de un 97% de explantes de acuerdo con la gráfica siguiente:

Grafica 2 Determinación del porcentaje de la Sobrevivencia en base a la contaminación de los explantes de *Stevia rebaudiana* después de la siembra.



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

Los resultados obtenidos del tratamiento de desinfección con el fungicida Sistémico Amistar con una dosis de 1 ml/L con una exposición de 2 horas utilizado en los explantes de *Stevia* para esta investigación permitió la reducción de contaminación hasta un 3% siendo el 1% bacteria y el 2% hongo tal y como se observa en la gráfica anterior, y por ende permitiendo un alto índice de supervivencia de los mismos del 97 % libres de contaminantes microbianos hasta los 45 días después de la siembra.

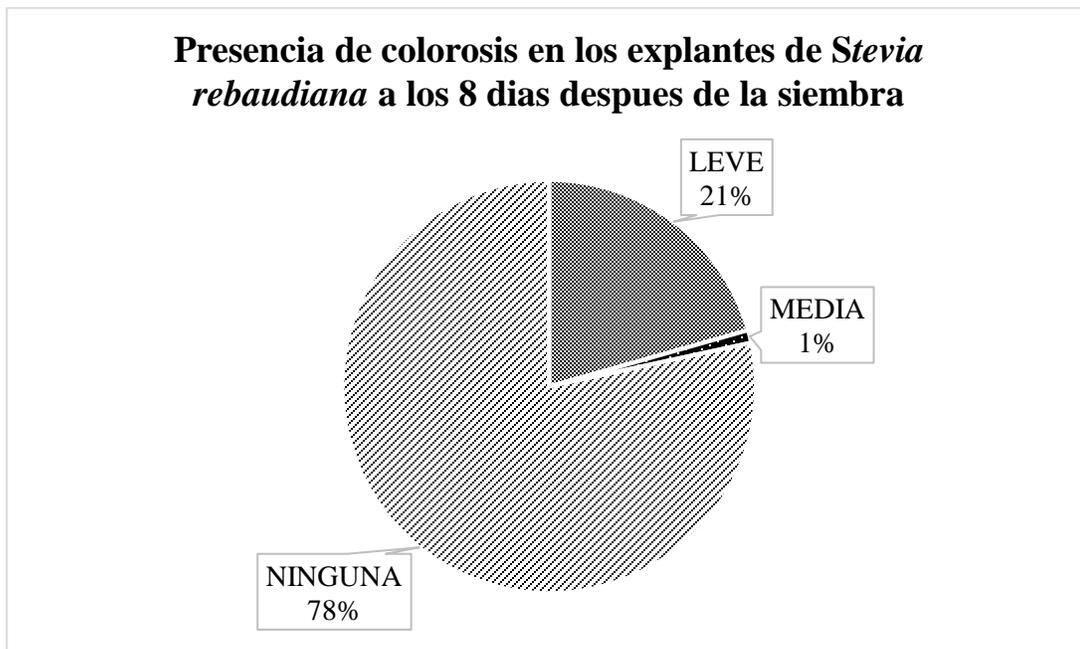
9.2.1.5 Determinación de la Presencia de Clorosis u oxidación en los explantes cultivados *in vitro*.

Se le denomina clorosis u oxidación al oscurecimiento parcial o total de los explantes esto es debido a que los vegetales son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas y otros son de

utilidad para defenderse ante situaciones de estrés; en el caso particular del cultivo de tejidos in vitro los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (Azofeifa, 2009).

La estrategia para evitar los procesos de oxidación que conllevan al oscurecimiento de los tejidos de los explante de *Stevia rebaudiana* micropropagadas en el cultivo in vitro que tuvo presencia en las pruebas preliminares de desinfección de los explantes, fue la adición al medio de cultivo 0.5g de carbón activado beneficiando a la formación de brotes en los explantes; ya que de acuerdo con (Azofelia Alvarado, 2009) el uso de carbón activado al medio de cultivo es posible remover compuestos fenólicos, evitando o disminuyendo el deterioro del explante. Las concentraciones empleadas que se observan en la literatura varían entre 0,5 y 10 g/l, siendo más frecuentes las dosis de 2,0 y 3,0 g/l. para la familia Arecaceae. Por lo que para esta investigación se adiciono una dosis de 0.5g/l de carbón activado al medio de cultivo con lecturas desde los 8 días hasta los 45 días después de la siembra.

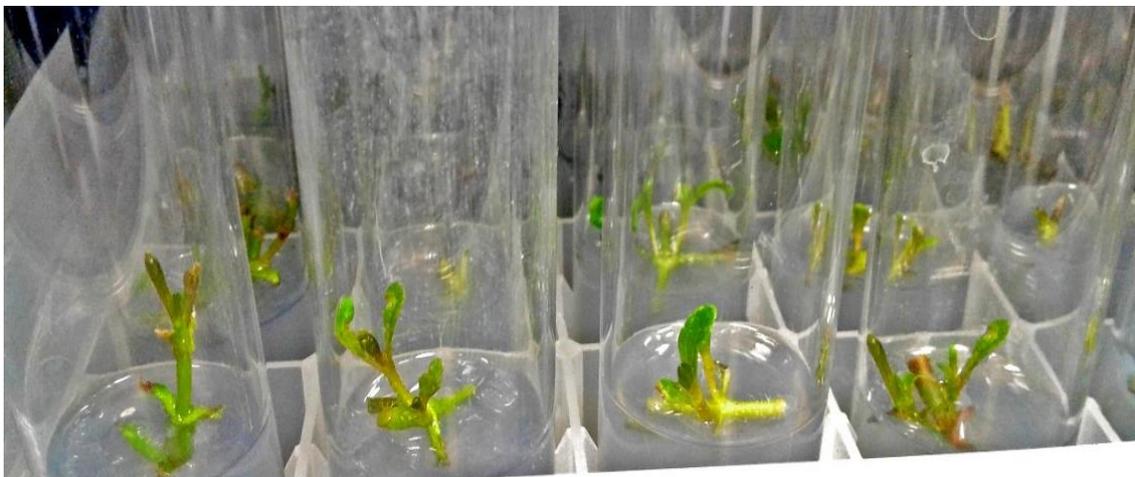
Grafica 3 Determinación del Nivel de clorosis u oxidación presente en los explantes de *Stevia* desinfectados a los 45 días después de la siembra.



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

El grado de clorosis fue medido en una escala de 0 a 4. Los explantes que presentaran una oxidación alta y oxidación total serian descartados: C0: sin clorosis. C1: clorosis leve (0-25%), C2: clorosis media (25-50%), C3: clorosis alta (50-75%) y C4: clorosis total (75-100%). De acuerdo con la gráfica, los resultados obtenidos de la observación de los explantes a partir de los 8 días después de la siembra con respecto al número de explantes, el grado de oxidación no se acrecentó en los explantes permitiendo un 78.4% equivalente a 74 explantes sin presencia de clorosis; si bien el 78.4% no presento oxidación el 20.6% equivalente a 20 explantes presento una clorosis leve con una oxidación en los extremos de los explantes donde se realizaron los cortes; y un 1% equivalente a 1 explante presento una clorosis media de color café oscuro, lo que favoreció a la supervivencia de los explantes y la formación de los brotes.

Figura 19 *Formación de brotes a los 8 días después de la siembra en los explantes de Stevia sin presencia de oxidación.*



Crecimiento de las brotes a los 8 días después de la siembra como respuesta a los estímulos de los reguladores de crecimiento dentro del medio de cultivo. Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

A este resultado se le atribuye el uso y el grado de concentración del carbón activado dentro del medio de cultivo in vitro teniendo un papel importante en la disminución de este problema; esto se puede corroborar por mediciones estadísticas con el coeficiente Pearson para la influencia del carbón activado en la oxidación de los explantes.

Cuadro 5 Pruebas del coeficiente de Pearson

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	90.14	2	<0.0001
Coef.Conting.Cramer	0.95		

Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación.

De acuerdo con el coeficiente de Pearson fue de $p < 0.0001$, es decir existe una relación entre el grado de clorosis y los gramos de carbón activado; asimismo el Coeficiente de Cramer es de 0.95 y de acuerdo a Cramer entre más cerca de 1 sea el resultado de las variables, mayor relación tienen; por lo que se entiende que el uso de carbón activado si influyo positivamente en la disminución del grado de oxidación en cada uno de los explantes, controlando el nivel de oxidación de los explantes y ayudando significativamente en la aparición y formación de brotes en los explante de *Stevia rebaudiana*.

9.2.1.6 Inducción a la formación de brotes de Stevia en los explantes.

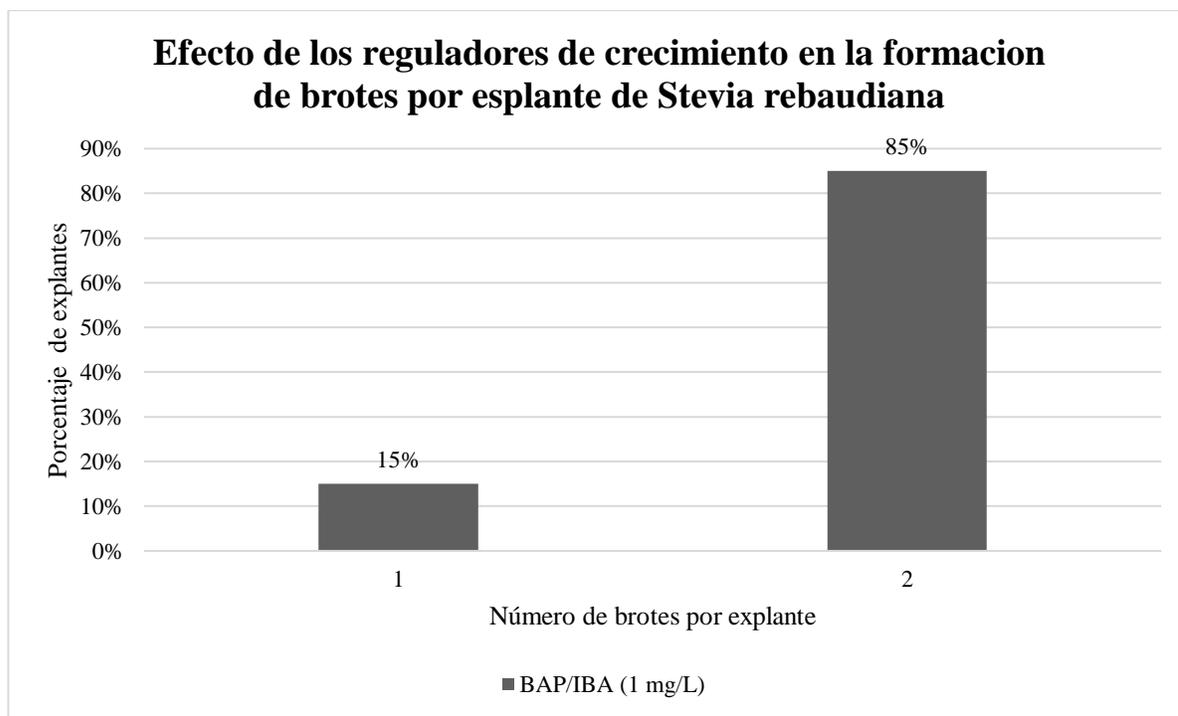
Las condiciones in vitro estimulan el desarrollo de las yemas axilares en la formación de una planta por cada yema, la eficiencia de este sistema se basa en el número de yemas axilares preexistentes en el inoculo (CONACYT, 1998). Para el caso los explantes de Stevia se observó un número de 2 yemas axilares previo a la siembra permitiendo la formación de una planta (brote) por cada yema, en relación con el aspecto morfológico de las plantas de Stevia presentando una disposición opuesta de las hojas con respeto al tallo es decir, las hojas sale en parejas en el mismo punto de la rama, mirando hacia lados opuestos.

De acuerdo con investigaciones realizadas en los procesos a escala productiva o comercial para el cultivo de *Stevia rebaudiana* determinaron que el uso de reguladores de crecimiento siendo 6-BAP y el AIB en el cultivo in vitro de Stevia, ha sido descrito como una de las combinaciones que mejor resultado ha dado en el mayor número de brotes en menor tiempo en procesos de escala comercial, usando concentraciones entre 0.5 a 3.0 mg l-1 de 6-BAP y periodos de 10 días (Diego Martínez Rivillas, 2016)

Para la micropropación in vitro de *Stevia rebaudiana* se utilizó el ácido indolbutirico y la Bencilaminopurina a una concentración de 1 mg L-1 permitiendo la formación de microplantas

por yema axilar. Los resultados obtenidos de la combinación de estos reguladores de crecimiento en el medio de cultivo para la inducción de brotes en los explantes de Stevia se presentan en la gráfica siguiente:

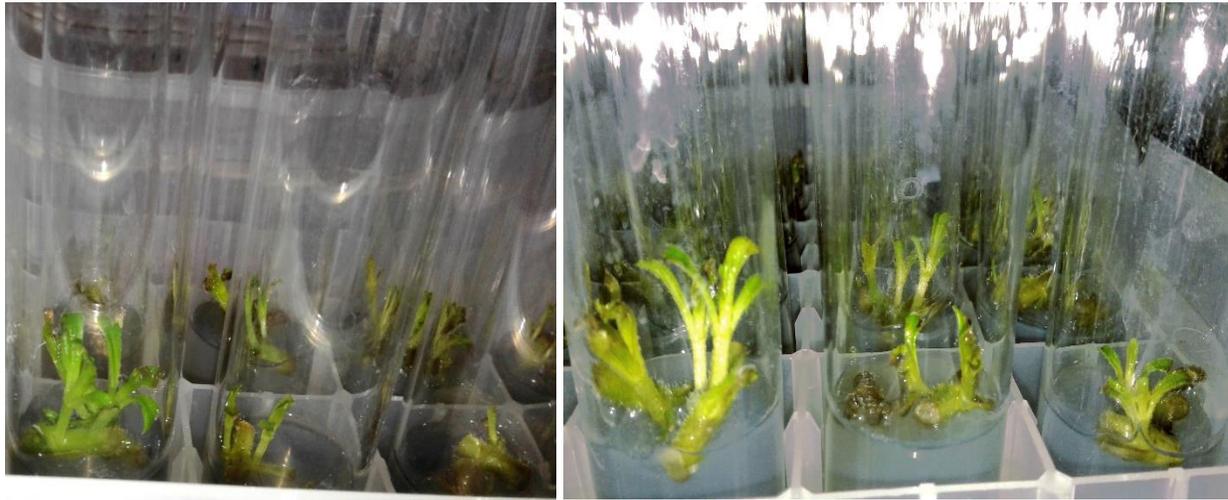
Grafica 4 Formación de brotes en los explantes de *Stevia rebaudiana* como efecto de la concentración de los reguladores de crecimiento en cultivo in vitro.



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

De acuerdo con la gráfica el número de brotes por explante estuvo determinado por el número de yemas axilares presentes en los explantes, reflejado en la formación de brotes siendo el 85% con una formación de 2 brotes por explante y el 15% con una formación de 1 brote por explante de *Stevia rebaudiana*. Las observaciones realizadas permitieron determinar que los brotes se formaron de manera directa, sin pasar por una fase intermedia de formación de callos mostrando una gran estabilidad genética, contradictorio a lo informado por (Noordin N, 2012) que al utilizar una concentración de 0.5 mg l-1 de BAP/AIB indujo un alto número de brotes luego de tres semanas de cultivo, observando la presencia de estructuras callosas en la base de los plántulas formadas permitiendo la inestabilidad genética en el proceso y su adaptación ex vitro.

Figura 20 Brotación de los explantes de *Stevia* como resultado del efecto de los reguladores de crecimiento.



Fuente: Tesista CUSAM 2018, información obtenida de campo.

Como se observa en la figura 20 la combinación de IBA/BAP como reguladores de crecimiento a una concentración de 1 mg L^{-1} de los mismos y el grado de concentración en el medio de cultivo es necesaria y suficiente para inducir la formación de brotes en los explantes de *Stevia* sin la formación de estructuras callosas, permitiendo que el 100% de los explantes formaran brotes a partir de los ocho días después de la siembra.

9.2.2 Resultados del alargamiento de los brotes por explantes

La medición del crecimiento de los brotes en los explantes se realizó con una regla milimetrada desde la parte externa de los tubos de ensayo, el objetivo de este procedimiento fue obtener cifras matemáticas (centímetros) que describieran adecuadamente el crecimiento de los brotes basados en muestreos frecuentes medido en cuatro periodos, 8, 15, 30 y 45 días después de la siembra siendo un total de 4 observaciones utilizando la totalidad de la información recabada para definir la tasa de crecimiento por unidad de tiempo dentro del cultivo in vitro de los brotes por explantes de *Stevia rebaudiana*.

9.2.2.1 Primera lectura: análisis del tamaño de los brotes por explante a los 8 días después de la siembra (dds)

El proceso de desinfección aplicado a los explantes para su establecimiento in vitro, permitió la sobrevenia del 97% explantes sembrados en tubos de ensayo, a los cuales a partir de los 8 días después de la siembra se les pudo cuantificar su crecimiento por medio de la medición de su altura después de la siembra.

De acuerdo con el análisis estadístico descriptivo del cuadro 7 el tamaño promedio de los explantes a los 8 dds. se vio influenciado por el nivel de citocinina/Auxina (1 mg/l), la concentración de macroelementos (100% MS), el tipo de citocinina/Auxina (bencilaminopurina y el ácido indolbutirico); además también influyeron las interacciones: concentración de macroelementos (100% MS) con el nivel de citocinina/Auxina (1 mg/l), la consistencia del medio (solido) con el tipo de citocinina/Auxina (BAP/IAB) y la concentración del medio solido (100% MS) con el tipo de citocinina/Auxina (BAP/IAB).

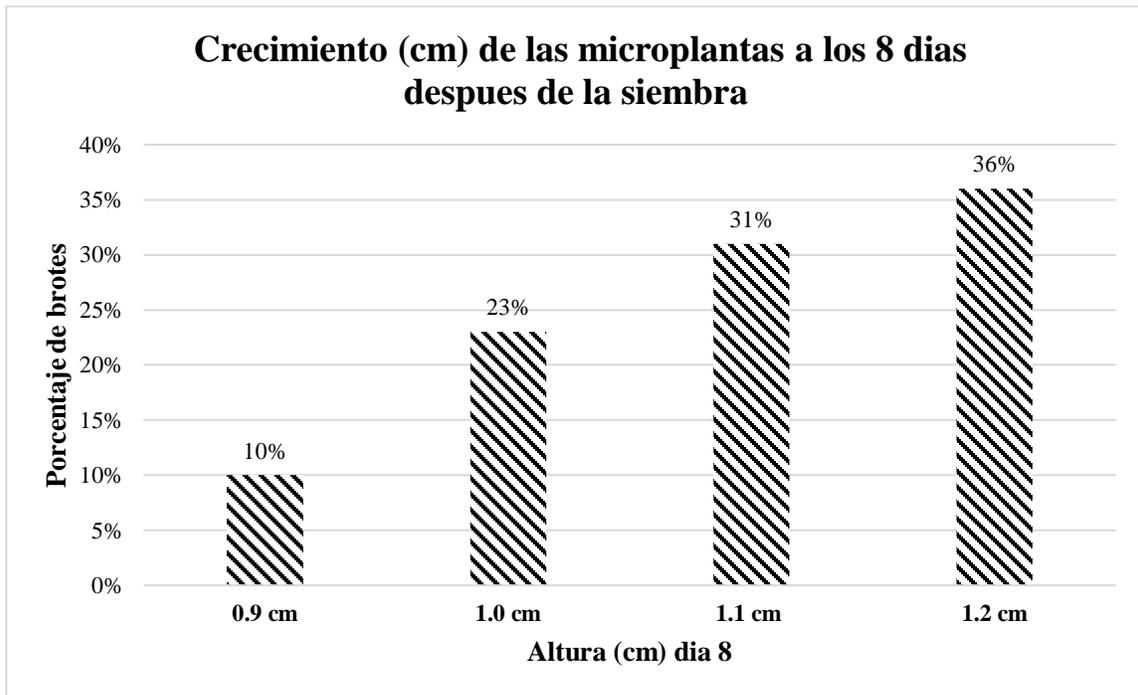
Cuadro 6 Crecimiento vegetativo de los brotes en los explantes de Stevia a los 8 días después de la siembra.

Estadística descriptiva	Altura(cm) día 8		
Numero de observaciones	97		
Media	1.09		
Q1	1		
Mínimo	0.9		
Máximo	1.2		
Mediana	1.1		
D.E.	0.1		
Var(n)	0.01		
E.E.	0.01		
CV	9.17		
Q3	1.2		
Datos faltantes	0		
Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	14.71	3	0.0021
Coef. Conting. Cramer	0.39		

Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

Los resultados obtenidos indican que el tamaño promedio de los brotes fue de 1.09 cm por explante a los 8 días después de la siembra, siendo la altura máxima 1.2 cm y la altura mínima 0.9 cm; la variación entre las alturas de los brotes fue baja siendo una desviación estándar de 0.1 indicando la poca variabilidad entre las alturas obtenidas (cm), sin embargo el número de explantes para cada elongación registrada fue mayor con un Coeficiente de Variación de 9.17 siendo una alta variabilidad con respecto al número de explantes y la frecuencia de las alturas obtenidas, es decir, muy poca homogeneidad en el número de brotes con respecto a las alturas registradas, esto es debido a que la velocidad de crecimiento (aumento de tamaño por unidad de tiempo) es lenta al comienzo, aparentemente debido a la existencia de un número bajo de células en división. El número de células con capacidad de crecimiento va aumentando en forma exponencial conforme al tiempo (Courtis, 2014), registrado en la gráfica siguiente:

Gráfica 5 *Tamaño de brotes por explante, a los 8 días después de la siembra, durante el establecimiento in vitro de Stevia rebaudiana.*

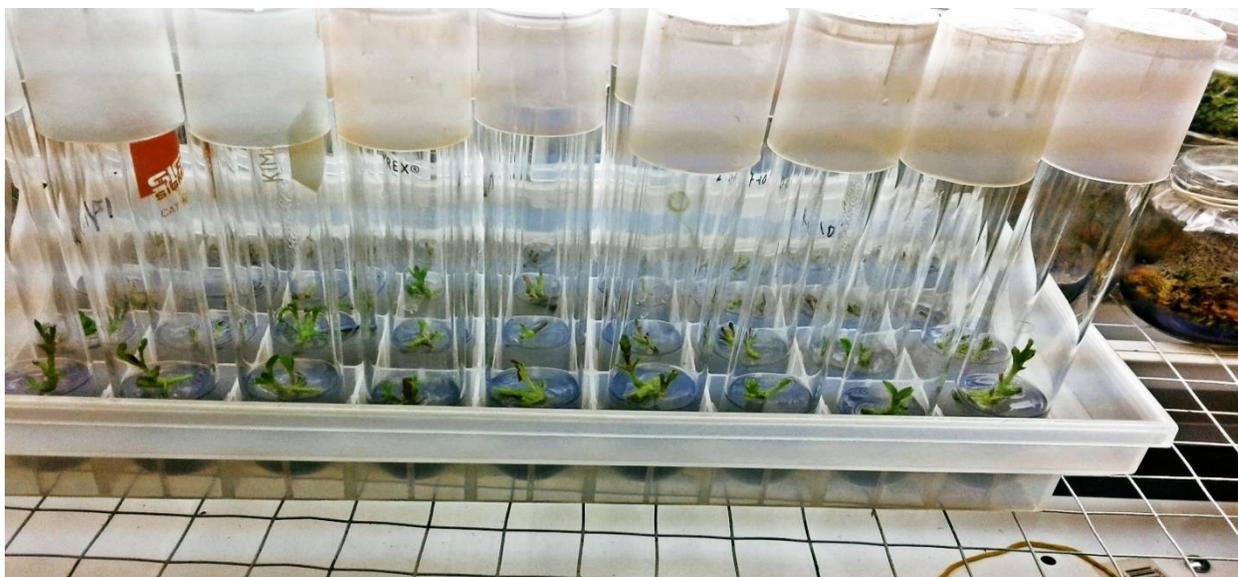


Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

De acuerdo con la gráfica anterior hubo una diferencia significativa entre la cantidad de explantes con la mayor y menor altura, siendo el 36% la mayor cantidad de explantes con una

altura máxima de 1.20 cm sus brotes y el 10% de los explantes con una altura mínima de 0.9 cm de los brotes, el 31% de los explantes registro una altura de 1.1 cm de los brotes, y un 23% de los explantes con una altura de 1 cm de los brotes por explante, del 100% del total de explantes (n=97).

Figura 21 Alargamiento de las microplantas de *Stevia* a los 8 días después de la siembra.



Fuente: Tesista CUSAM 2018, información obtenida de campo.

En consecuencia con los resultados obtenidos el análisis de variación, y la separación de medias, evidenciaron que la concentración de macroelemento (100% MS), la consistencia del medio (Solido), el tipo de axina/citocinina (IBA/BAP), el nivel de axina/citocinina (1mg/l) y la interacción entre los mismos influyó significativamente mayor ($p=0.0021$) en la elongación de los brotes producidos a los 8 días después de la siembra presentando una coloración verde claro a verde oscuro como se aprecia en la figura 21.

9.2.2.2 Segunda lectura: análisis del tamaño de los brotes por explante a los 15 días después de la siembra (dds)

Los resultados obtenidos para el día 15 después de la siembra registraron un incremento en la longitud de los brotes por explantes de 2.55 cm registrado en el cuadro 8. Referente al vigor de los

brotos, se observaron tallos firmes y vigorosos, sin formación de callo en la base de coloración verde claro.

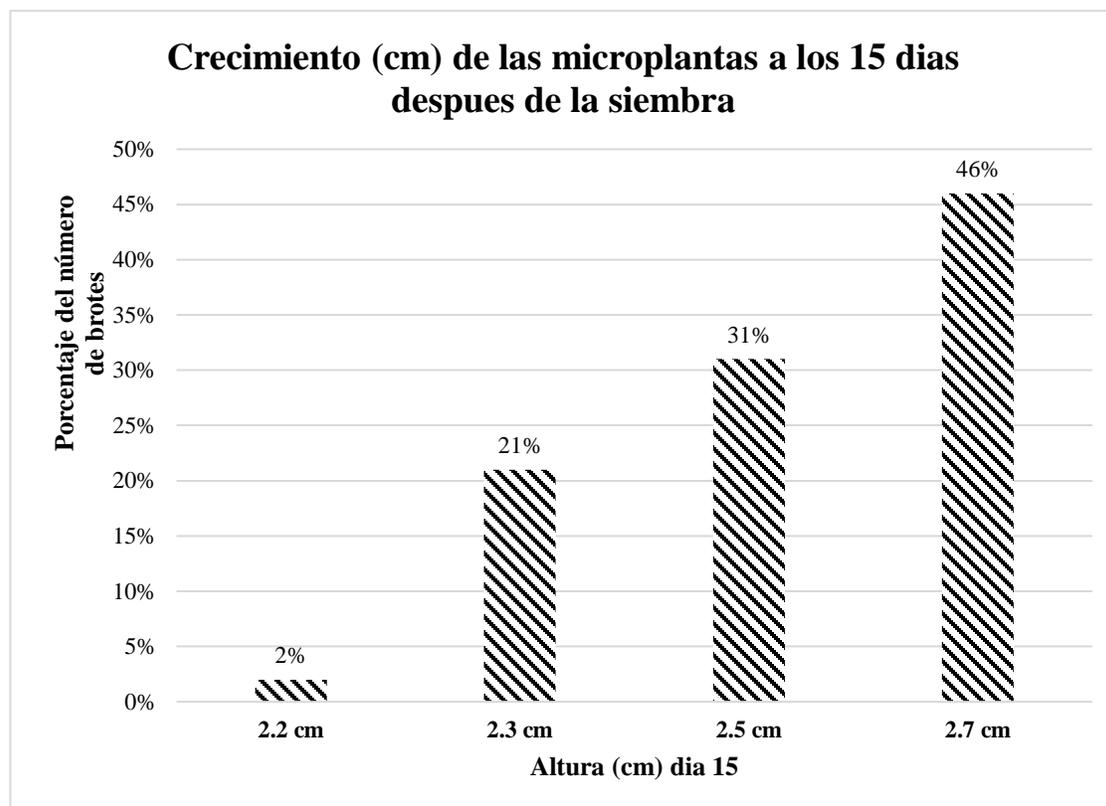
Cuadro 7 Crecimiento vegetativo de los brotes en los explantes de *Stevia* a los 15 días después de la siembra.

Estadística Descriptiva	Altura (cm) día 15		
Número de brotes	97		
Media	2.55		
Q1	2.5		
Mínima	2.2		
Máxima	2.7		
Mediana	2.5		
Q3	2.7		
D.E.	0.16		
Var(n)	0.03		
CV	6.44		
Datos faltantes	0		
Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	40.28	3	<0.0001
Coef. Conting. Cramer	0.64		

Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

Los resultados del análisis de variación, y la separación de medias evidenciaron que la concentración de macroelementon (100% MS), la consistencia del medio (Sólido), el tipo de axina/citocinina (IBA/BAP), el nivel de axina/citocinina (1mg/l) y la interacción entre los mismos influyó significativamente mayor ($p=0.0001$) en la elongación de los brotes producidos a los 15 días después de la siembra, con una desviación estándar de 0.16 indicando la poca variabilidad entre las alturas obtenidas (cm) pero alta en comparación con el día 8 $DE=0.1$ definiendo como un diferencia de 0.2 cm entre las alturas (cm) de los brotes mayor que la registra para el día 8 de 0.1 cm entre brotes. El Coeficiente de Variación fue 6.44 siendo una alta variabilidad con respecto al número de brotes y la frecuencia de las alturas obtenidas, es decir, muy poca homogeneidad en el número de brotes con respecto a las alturas registradas, pero menor que la registrada para el día 8 dds siendo de $Cv=9.17$, significando una tendencia a la homogeneidad en el número de brotes con respecto a las alturas registradas.

Grafica 6 *Altura de las microplantas por explantes a los 15 días después de la siembra.*



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

Los resultados mostraron que la adición de reguladores de crecimiento a una concentración de 1 mg L⁻¹ indujo a un incremento significativo en la elongación de los brotes por explante registrándose que el 46% de los brotes con una altura máxima de 2.70 cm, seguido por el 31% con una altura de 2.50 cm, un 21% con una altura de 2.30 cm y el un 2% con una altura mínima de 2.20 cm de los brotes, lo cual es consecuente con la dominancia del meristemo apical de las yemas axilares inhibiendo el desarrollo de los brotes adventicios de modo que estas permanecen en reposo hasta que el ápice principal del tallo se ha alejado lo suficiente de ellas y el efecto inhibitor se anula.

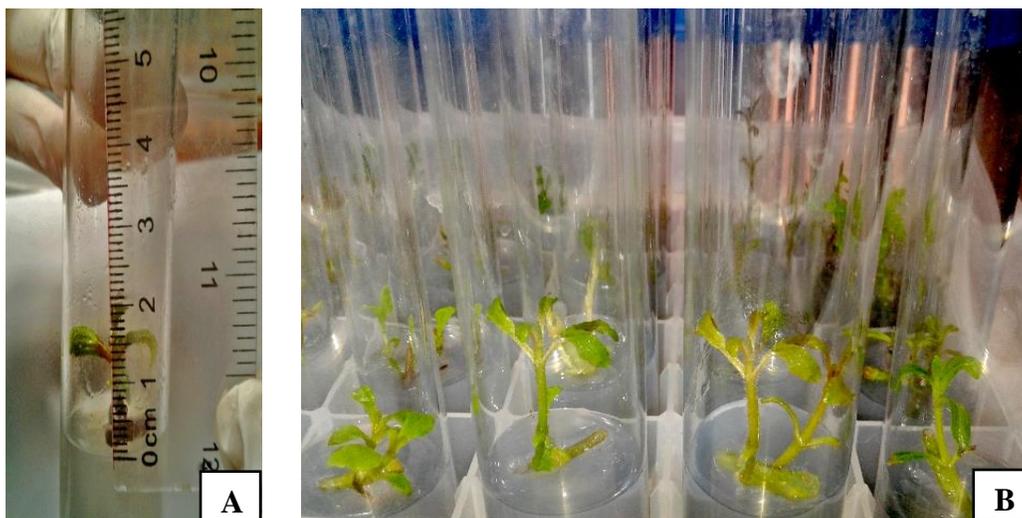
Cuadro 8 *Análisis de medias para las alturas de los brotes en los explante, a los 15 días después de la siembra in vitro.*

Observación (1)	Observación (2)	N	Media (diferencia)	Media(1)	Media(2)
Altura (cm) día 15	Altura(cm) día 8	97	1.45	2.55	1.09

Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

De acuerdo con el cuadro 9, indica una alta influencia de las variables en el tamaño o alargamiento de los brotes, por consiguiente una disposición a la uniformidad en las alturas ya que existió una diferencia de crecimiento de 1.45 cm con respecto a las medias del día 8 y 15 después de la siembra en cultivo in vitro. Por efecto el nivel y tipo citocinina/auxina y el porcentaje de concentración y consistencia del medio utilizado sí influyó en el tamaño de los brotes a los 15 días después de la siembra.

Figura 22 *Alargamiento de las microplantas de Stevia a los 15 días después de la siembra.*



Crecimiento de las microplantas de *Stevia rebaudiana* a los 15 días después de la siembra **A:** medición de las microplantas en el exterior del tubo de ensayo, **B:** desarrollo de las primeras hojas. Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

9.2.2.3 Tercera lectura: análisis del tamaño de los brotes por explante a los 30 días después de la siembra (dds).

El crecimiento de los brotes para el día 30 se registró un aumento en la longitud de los brotes, en relación con aspectos morfológicos de los brotes con reguladores de crecimiento, se observó

un incremento en el desarrollo foliar. En algunos casos se observó un engrosamiento de los tallos. Eventualmente, se observó una coloración marrón-rojiza cerca de la base del tallo y hojas de algunas plántulas, lo que podría explicarse por el acortamiento de su longitud, como consecuencia de la estimulación y desarrollo de brotes secundarios a partir de yemas axilares, estas características desaparecieron con la formación de los brotes secundarios.

Cuadro 9 *Crecimiento vegetativo de los brotes en los explantes de Stevia a los 30 días después de la siembra.*

Estadística Descriptiva	Altura(cm) día 30		
Número de brotes	97		
Media	3.86		
Q1	3.8		
Mínimo	3.6		
Máximo	4		
Mediana	3.8		
Q3	4		
D.E.	0.16		
Var(n)	0.02		
CV	4.08		
Datos faltantes	0		
Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	15.11	2	0.0005
Coef.Conting.Cramer	0.39		

Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

El tamaño promedio de los brotes por explante a los 30 días después de la siembra presento un coeficiente Pearson presentando $p=0.0005$ de acuerdo a este resultado se entiende que existe una relación o interacción entre las variables estudiadas, es decir, las alturas obtenidas son el resultado del uso de reguladores de crecimiento siendo BAP/IAB, el nivel y tipo de citocinina/auxina, la concentración y consistencia del medio, aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa en el tamaño de los mismos según la desviación estándar siendo de 0.15, sí hubo diferencias significativas en el número de los brotes con las alturas obtenidas de acuerdo con los datos obtenidos del Coeficiente de variación para el día 30 dds siendo de $Cv=4.08$, registrando un tendencia de los brotes a la uniformidad de sus alturas, esto se puede ratificar en los resultados

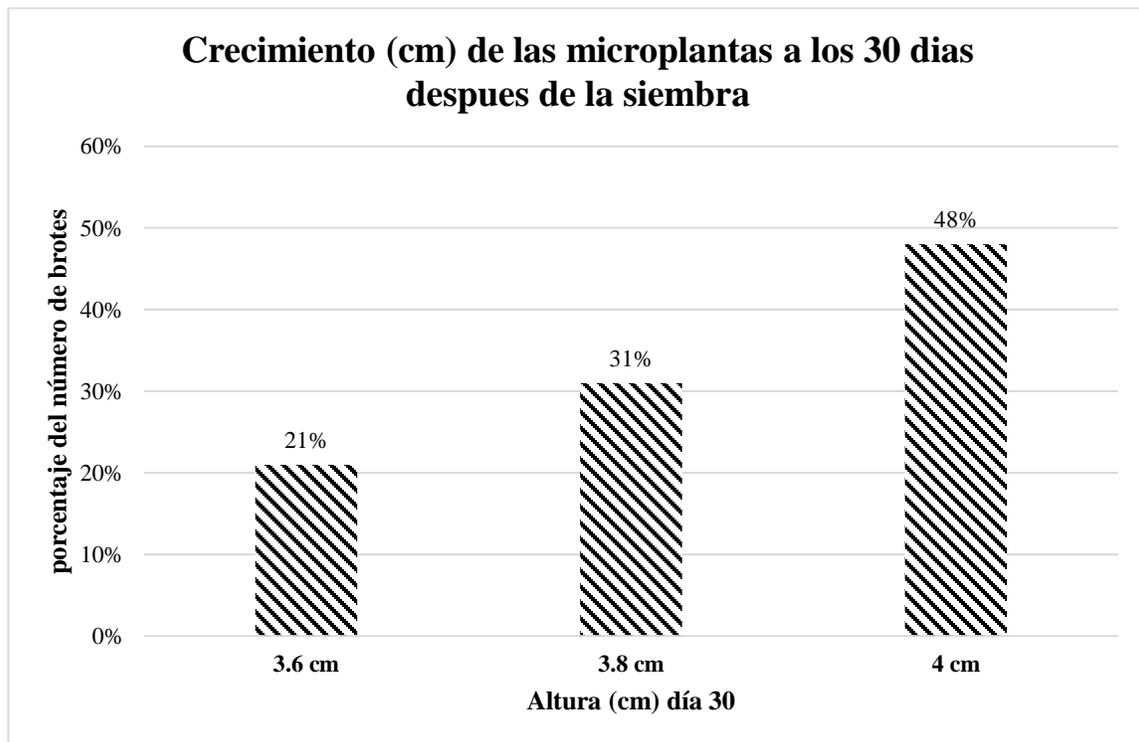
obtenidos de los coeficientes de variación del día 8 y 15 después de la siembra siendo: $Cv= 9.17$ y $Cv=6.44$ respectivamente, confirmando una propensión de los brotes a la homogeneidad de sus tamaños.

Cuadro 10 *Análisis de medias para las alturas de los brotes en los explante, a los 30 días después de la siembra en in vitro.*

Obs. (1)	Obs. (2)	N	Media(1)	Media(2)	Media (diferencia)
Altura(cm) día 30	Altura (cm) día 15	97	3.86	2.55	1.31

Fuente: Elaboración propia para esta investigación

Grafica 7 *Altura de las microplantas a los 30 días después de la siembra*

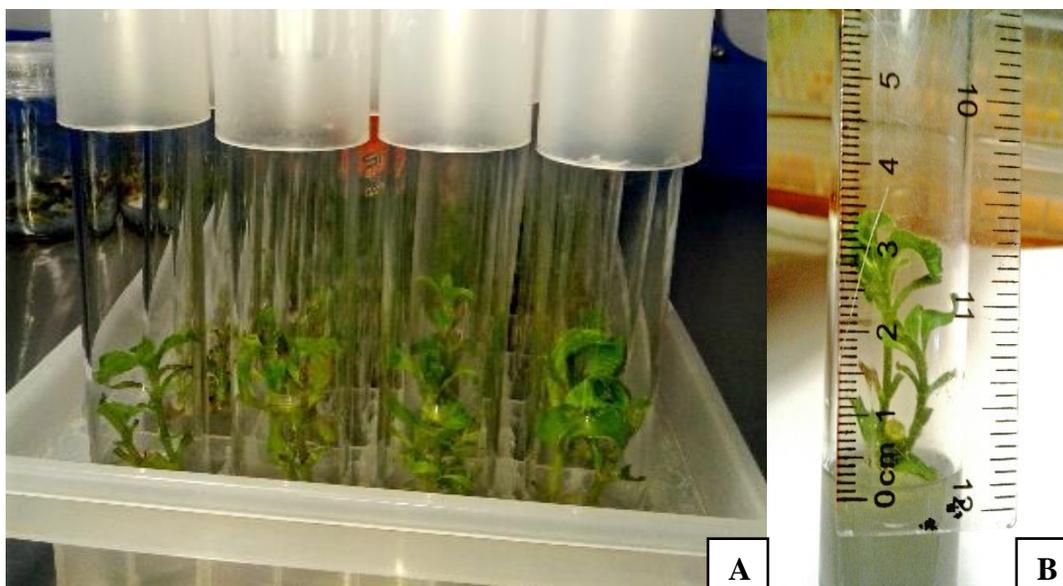


Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

Conforme con los resultados indica que el 48% de los brotes tuvo una altura máxima de 4 cm, seguido por un 31% con una altura de 3.8 cm, y un 21% con una altura de 3.6 cm como la altura mínima del total de alturas y cantidad menor del número de brotes; lo que da a conocer la tendencia de los brotes a la búsqueda de la uniformidad de sus tamaños. La altura promedio de los brotes para el día 30 fue de 3.86 cm con una elongación de los brotes de 1.31 cm con respecto a la media

(2.55 cm) del día 15 después de la siembra, influyo) por la concentración de macroelemnetos, consistencia del medio, el tipo y nivel de auxina/citosina (IAB/BAP) y la interacción entre los mismos influyó significativamente mayor ($p=0.0005$) en la elongación de los brotes producidos a los 30 días después de la siembra.

Figura 23 Alargamiento de las microplantas de *Stevia* a los 30 días después de la siembra.



Crecimiento de las microplantas de *Stevia rebaudiana* en medio de cultivo **A**: desarrollo de un mayor cantidad de hojas vigorosas de color verde intenso. **B**: altura media de las microplantas de 3.8 cm a los 30 dds Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

9.2.2.4 Cuarta lectura: análisis de tamaño de los brotes por explante a los 45 días después de la siembra (dds)

El crecimiento de los brotes o tendencia de los brotes a alcanzar su altura máxima a los 45 días después de la siembra, se vio influenciado ($p=0.0001$) mayormente por la concentración de macroelemnetos, consistencia del medio, el tipo de auxina/citosina (IAB/BAP) y el nivel de IBA/BAP siendo 1 mg/l. por lo que de acuerdo con el análisis de variación, y la separación de medias evidenciaron que la concentración de macroelementon (100% MS), la consistencia del medio (Sólido), el tipo de axina/citocinina (IBA/BAP), el nivel de axina/citocinina (1mg/l) y la interacción entre los mismos descrito en el Cuadro 12 a los 45 días después de la siembra.

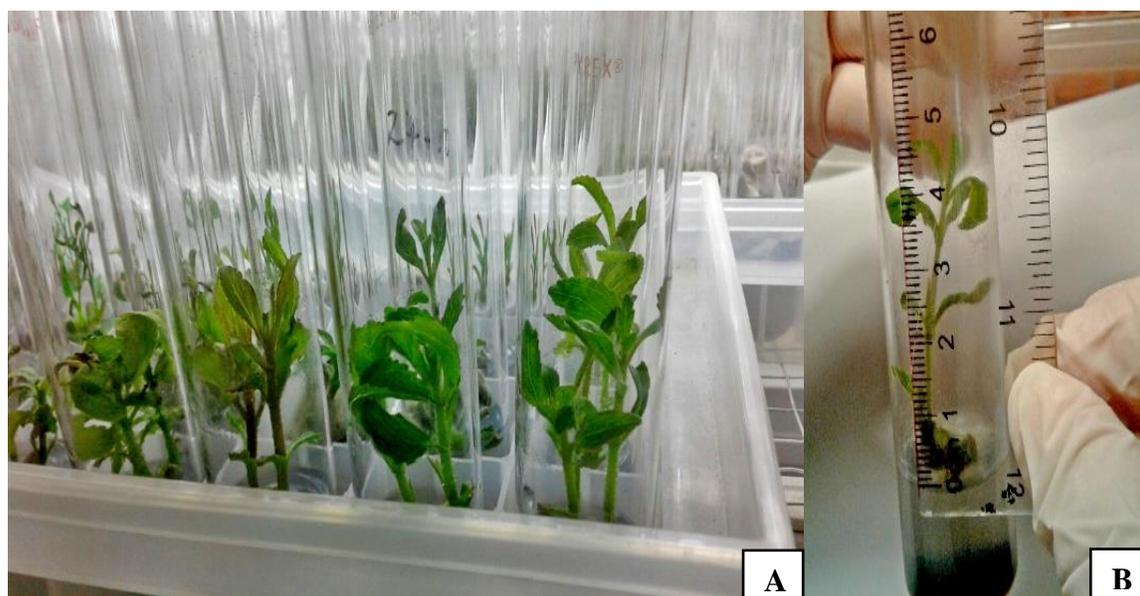
Cuadro 11 *Crecimiento vegetativo de los brotes en los explantes de Stevia a los 45 días después de la siembra.*

Estadística Descriptiva	Altura(cm) día 45		
Número de brotes	97		
Media	4.9		
Q1	4.8		
Mínimo	4.5		
Máximo	5		
Mediana	5		
Q3	5		
D.E.	0.15		
Var(n)	0.02		
CV	0.01		
Datos faltantes	0		
Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	72.63	2	<0.0001
Coef. Conting. Cramer	0.82		

Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

Los resultados a los 45 días después de la siembra se registró una altura máxima de 5 cm y una altura mínima de 4.5 cm siendo una diferencia de 0.5 cm entre la mayor y la menor de las alturas y de acuerdo con los resultados obtenidos de la desviación estándar de 0.15 existió una baja variabilidad en las alturas registradas, es decir, se obtuvo una tendencia de los brotes a la uniformidad de sus alturas, con lo cual se tuvo una media de 4.9 cm de las alturas de los 97 explantes obtenidos tal y como se observa en la figura siguiente:

Figura 24 Registro del crecimiento de las microplantas a los 45 días *in vitro*.

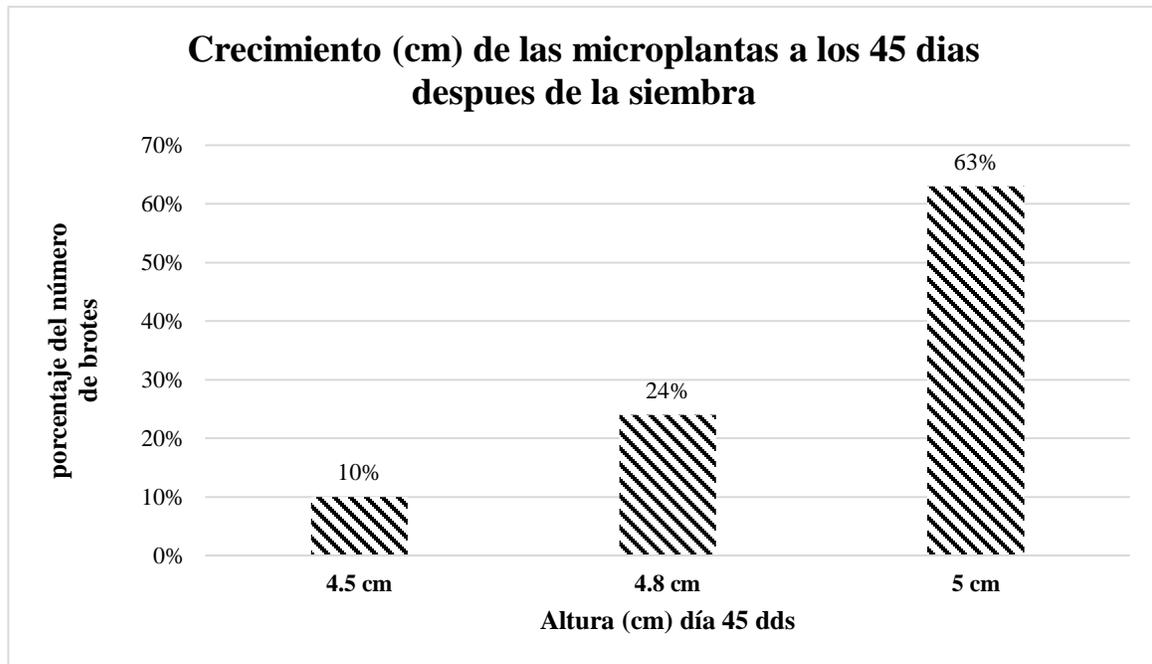


Crecimiento y desarrollo óptimo de las microplantas a los 45 días después de la siembra de los explantes en tubos de ensayo, **A:** desarrollo de hojas grandes y vigorosas **B:** altura de las plántulas de 5 cm como altura máxima.

Por lo tanto el crecimiento de los brotes a los 45 días después del trasplante indica que el nivel de reguladores de crecimientos indujo al incremento significativo de las alturas (cm) de los brotes, registrándose poca variabilidad en las alturas obteniendo una tendencia por parte de los brotes a la uniformidad con respecto a sus alturas.

En la gráfica 8, se puede confirmar que existen diferencias estadísticas entre el número de brotes y las alturas registradas mostrando un comportamiento homogéneo en el tamaño de los brotes. La mejor respuesta de los brotes en su elongación fue de 5 cm registrada como la altura máxima de los brotes siendo el 63% de explantes, seguido del 24% de explantes con una altura 4.8 cm de los brotes y un 10% de explantes con una altura de 4.5 cm de los brotes registrada como la altura mínima, existiendo una tendencia alta de los brotes por la uniformidad de sus tamaños, de manera cuantitativa se entiende que las plántulas al ser cultivadas en medio sólido al 100% de concentración macroelementos con adición a reguladores de crecimiento y el nivel de los mismos indujo a la uniformidad en la elongación de los brotes por explante dentro del cultivo *in vitro* de *Stevia (Stevia rebaudiana B)*.

Grafica 8 *Altura de las microplantas a los 45 días después de la siembra.*



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

Conforme con los resultados obtenidos a los 45 días después de la siembra se registró un incremento en las alturas de los brotes, desde la formación de los mismos hasta la última observación registrada, los cuales se analizan en el siguiente cuadro:

Cuadro 12 *Análisis de medias para las alturas de los brotes en los explante, a los 45 días después de la siembra en in vitro.*

Obs.(1)	Obs.(2)	N	Media(1)	Media(2)	Media (dif.)
Altura(cm) día 45	Altura (cm) día 30	97	4.9	3.86	1.04
Altura(cm) día 45	Altura (cm) día 8	97	4.9	1.09	3.81

Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

La diferencia del tamaño promedio de los brotes a los 8 días después de la siembra fue de 1.09 cm, para el día 45 después de la siembra fue de 4.9 cm, por lo que se obtuvo un crecimiento de 3.81 cm de los brotes en los explante desde el día 8 al día 45 con un crecimiento de 1.04 cm con respecto al día 30 dds; en relación con aspectos morfológicos de los brotes con reguladores de

crecimiento, se observó un incremento en el desarrollo foliar de color verdoso amarillo, con un engrosamiento de los tallos como se observa en la figura siguiente:

Figura 25 *Crecimiento de las microplantas de Stevia a los 45 días después de la siembra.*



Fuente: Tesista CUSAM 2018, información obtenida de campo

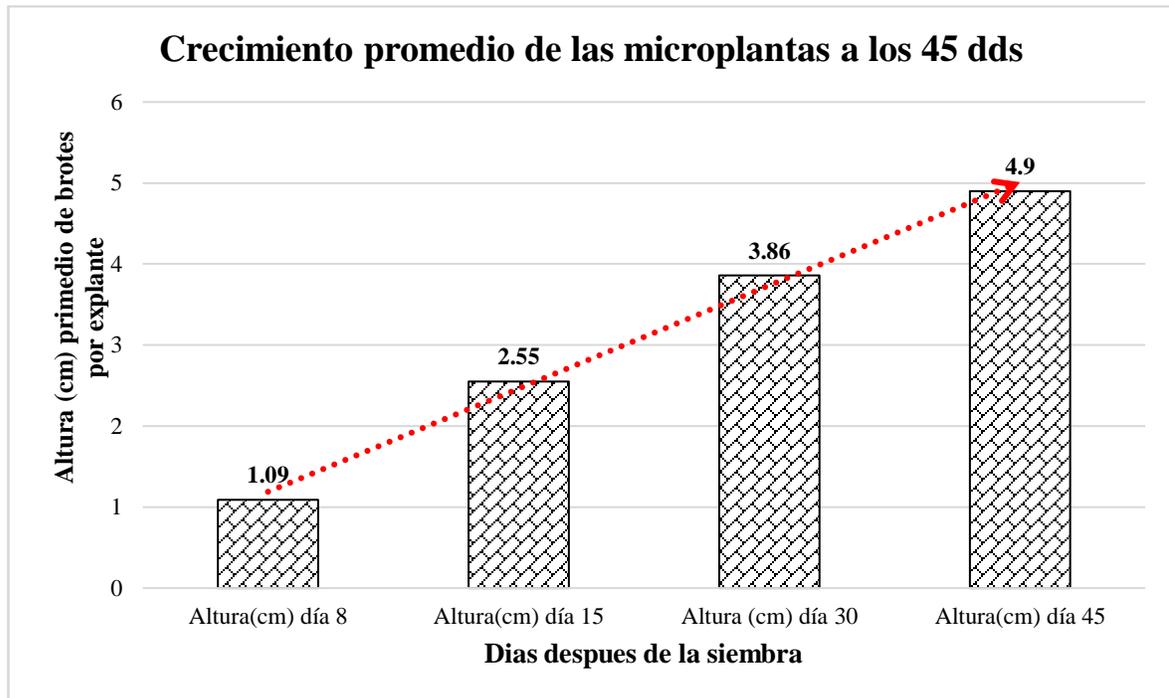
Conforme a los resultados de las medias obtenidas en cada una de las observaciones hasta los 45 días después de la siembra se registró un incremento en las alturas de las microplantas, siendo una diferencia significativa de 3.8 cm a partir de la primer registro 8 días después de la siembra hasta el día 45 previo al trasplante a condiciones ex vitro.

9.2.2.5 Análisis de los resultados de las evaluaciones realizadas para el crecimiento de los brotes por explantes

La variabilidad de las alturas de los brotes por explante en cada uno de los registros fue de mayor a menor conforme el coeficiente de variación para cada uno de los días observados, siendo para el día 8 dds. $Cv=9.17$, día 15 dds $Cv=6.44$, día 30 dds $Cv=4.08$ y día 45 dds $Cv=3.01$; por lo cual se comprende que la variabilidad entre de los brotes con respecto a las lecturas de altura (cm) para el día 8 dds con respecto al día 45 es muy alta, sin embargo, una baja o poca variabilidad de los brotes con respecto a las alturas, siendo una baja variabilidad en el número de alturas permitiendo una mayor uniformidad en el número de brotes siendo estas 4.5 cm, 4.8 cm y 5.0 cm

y numero de brotes de 10, 26 y 61 respectivamente. Existió una tendencia por parte de los brotes a la uniformidad de sus alturas, para el día 45 después de la siembra en el crecimiento de los brotes por explante lo cual se observa en la gráfica.

Grafica 9 *Crecimiento promedio de las microplantas a los 45 días después de la siembra.*



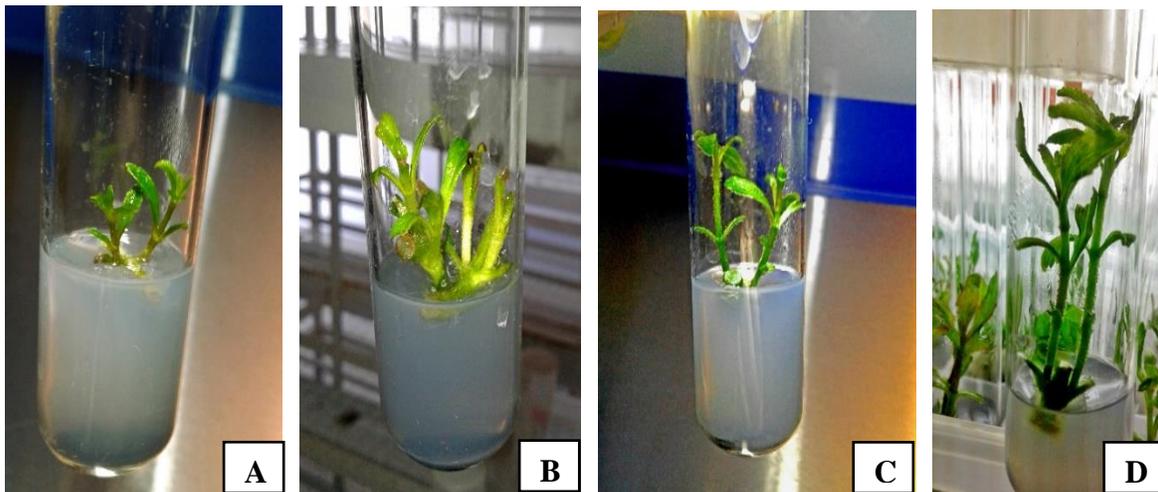
Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

Cabe concluir que la respuesta de los brotes en el incremento de su tamaño fueron influenciados por la concentración de macroelementos MS (100% MS), el tipo de citocinina/auxina (BAP/AIB) y el nivel de citocinina/auxina (1 mg L⁻¹); además también influyeron las interacciones: concentración de macroelementos con consistencia del medio sólido, concentración de macroelementos con el tipo de citocinina/auxina y la consistencia del medio sólido con el nivel de citocinina/auxina, es decir que los brotes tendieron a ser más uniformes en sus tamaños, alcanzando un óptimo crecimiento, además de no presentar contaminación significativa, exceptuando la contaminación después de la etapa de desinfección (aproximadamente 3%), la mayoría fueron contaminados por hongos.

El crecimiento de brotes a partir de explantes se presentó en menor tiempo cuando los explantes se cultivaron en presencia de los reguladores de crecimiento 6-BAP y AIB, contrario

con los resultados del crecimiento de los brotes de *Stevia* obtenidos por zamorano 2003 con el uso de kin y BAP como reguladores de crecimiento con un lento crecimiento máximo de 2.12 cm a los 15 días del trasplante.

Figura 26 *Proceso de crecimiento de las microplantas hasta los 45 días.*

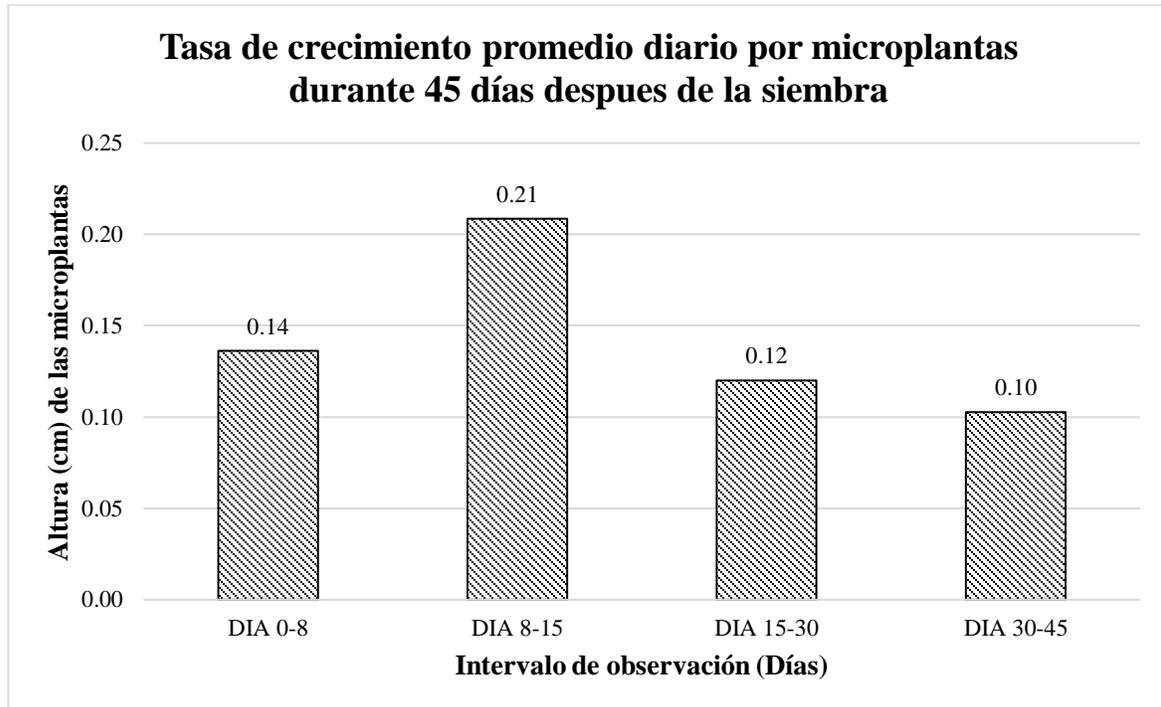


Proceso de crecimiento de las microplantas **A:** crecimiento a los 8 dds. con una altura media de 1.1 cm. **B:** crecimiento a los 15 dds. con una altura media de 2.5 cm. **C:** crecimiento a los 30 dds. con una altura media de 3.8 cm. **D:** crecimiento a los 45 dds. con una altura media de 4.9 cm. Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación.

9.2.2.6 Determinación de la tasa de crecimiento promedio diario de las microplantas durante los 45 días de evaluación

El crecimiento promedio diario para cada uno de los brotes en los explante de las microplantas de *Stevia rebaudiana* fue consecuente a la dominancia del meristemo apical y su influencia en la elongación de la plántula y la inhibición del desarrollo de yemas axilares (formación de hojas); de acuerdo con los datos obtenidos durante las observaciones de los días 8, 15, 30 y 45 días después de la siembra se observó un crecimiento óptimo en las microplantas, sin embargo, fue necesario determinar la tasa de crecimiento diario de las microplantas para conocer la tendencia para regenerar una planta nueva y su estabilidad genética para la producción de plántulas in vitro de *Stevia* con potencial aplicación a escala comercial. Esto, a escala productiva, podría contribuir a incrementar el número de plántulas propagadas, a mantener la fidelidad genética asociada a la micropropagación.

Grafica 10 Tasa de crecimiento promedio diario de las microplantas hasta los 45 días después de la siembra



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

De acuerdo con la gráfica se observó un incremento acelerado en el crecimiento de las microplantas en los primeros 8 y 15 días tasa elevada de 0.14 cm y 0.21 cm diarios sin embargo para los 30 y 45 días se ve una disminución de crecimiento siendo de 0.12 cm y 0.10 cm diarios en el último día de observación, esto se explica que en los primeros días la tasa de crecimiento fue mayor debido a que las microplantas presentaban una dominancia del meristemo apical, lo que influyo en la elongación de la plántula y la inhibición del desarrollo de yemas axilares. Sin embargo para los 30 y 45 días después de las siembra se registró un descenso en la tasa de crecimiento, esto debido a que se vio presencia de brotes adventicios es decir el incremento en la formación de hojas por brotes ya que esto parece influenciar el acortamiento en la distancia entre los nudos de tal manera que puede apreciarse en las plántulas una disminución en su tamaño y en el número de nudos.

La proporción de auxinas/citocininas ha sido estudiada por jugar un papel fundamental en la regulación de procesos como el desarrollo de estructuras apicales y radiculares, explicando cómo la dominancia apical tiene un efecto en la elongación de la planta (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Esto explica porque en los primeros días su crecimiento fue acelerado hasta el día 15, donde se observó la presencia de hojas no mayores de 2 hojas por brote siendo significativo bajo permitiendo la elongación de los brotes. Otras de las causantes que en cultivo in vitro los brotes presenta formación de hojas según (Baxcajay L. V., 2012) mencionaron que no es necesaria la actividad fotosintética durante las primeras etapas de la planta en condiciones in vitro, puesto que a la planta se le suministran los elementos básicos para su desarrollo mediante un medio nutritivo, encontrándose así en un estado heterotrófico por lo que en los primeros días no es fundamental la presencia de hojas bien desarrolladas para suministrar sus nutrientes básicos.

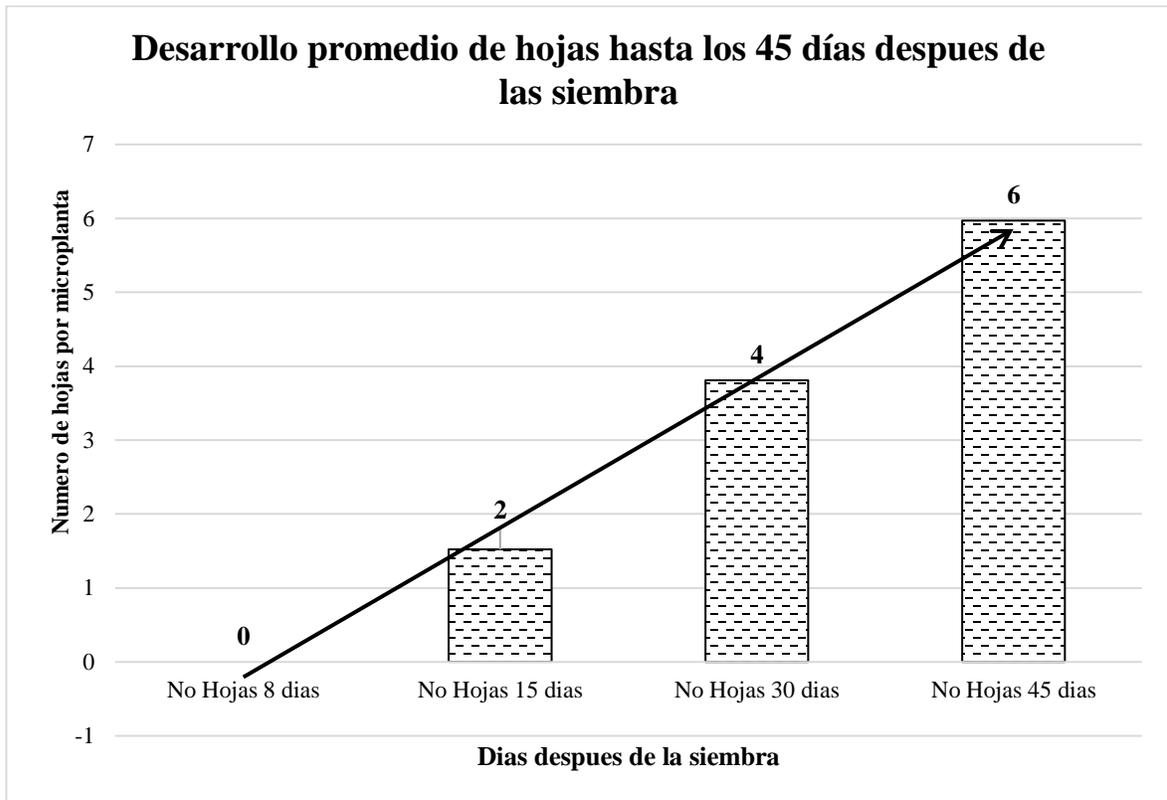
9.2.2.7 Determinación de la inducción de brotes adventicios (formación de hojas)

La totipotencia celular había sido anunciada por Haberlandt en 1902 que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa. Todo proceso de diferenciación está regulado por el balance entre diferentes tipos de reguladores del crecimiento, fundamentalmente de auxinas y citocininas.

En relación con aspectos morfológicos se observó un buen desarrollo foliar hojas medianas, brillantes, tallos firmes y vigorosos, sin formación de callo. Eventualmente, se observó una coloración marrón-rojiza en el tallo y hojas de algunas plántulas, lo que podría explicarse por el acortamiento de su longitud, como consecuencia de la estimulación y desarrollo de brotes secundarios a partir de yemas axilares. Estas características desaparecieron conforme el crecimiento de las plántulas en medio de cultivo en presencia de reguladores de crecimiento favoreciendo el incremento en la longitud de las plántulas y permitir el desarrollo de raíces.

La formación de las hojas con respecto a las medias para el día 8 no se observó formación de hojas, por lo que se puede decir que las microplantas eran consecuentes a la dominancia apical, permitiendo la elongación máxima de los brotes e inhibiendo en la formación de hojas; sin embargo para el día 15 hubo una media de 2 hojas por microplantas, para estos días el efecto inhibitor de la dominancia apical fue anulado permitiendo la formación de las primeras hojas; para el día 30 la media fue de 4 hojas desarrolladas y para el día 45 la media fue de 6 hojas desarrolladas, paralelamente para estos días la elongación acelerada de los brotes había sido inhibida.

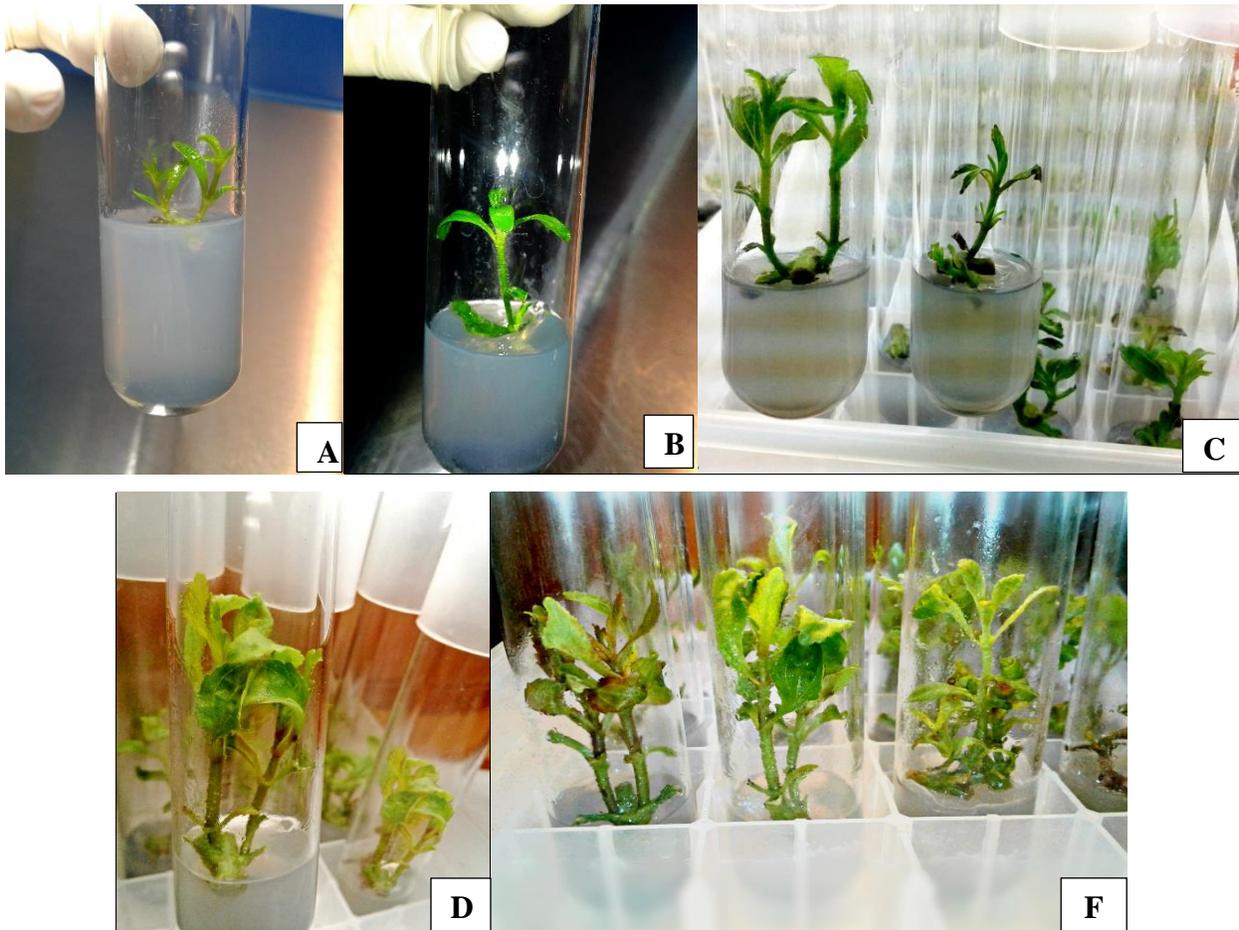
Grafica 11 Desarrollo promedio de hojas hasta los 45 días después de la siembra.



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

Por lo tanto la formación y cantidad de hojas en los brotes por explante se vieron inducidas ($p < 0.0001$) por la concentración de macroelementos 100% MS, la combinación citocininas/auxinas (AIB/BAP), y el nivel o dosis de 1 mg L⁻¹ de AIB/BAP; además de influir las interacciones: concentración de macroelementos con consistencia solida del medio, la concentración de macroelementos MS con Tipo de AIB/BAP y la consistencia del medio con el nivel o dosis de 1 mg L⁻¹ de AIB/BAP. Por ello se entiende que la aplicación de reguladores de crecimiento y la concentración del medio tuvieron un efecto notable sobre el desarrollo y número de hojas para cada una de las microplantas del cultivo de Stevia.

Figura 27 *Formación y desarrollo foliar de las microplantas de Stevia rebaudiana hasta los 45 días después del trasplante.*



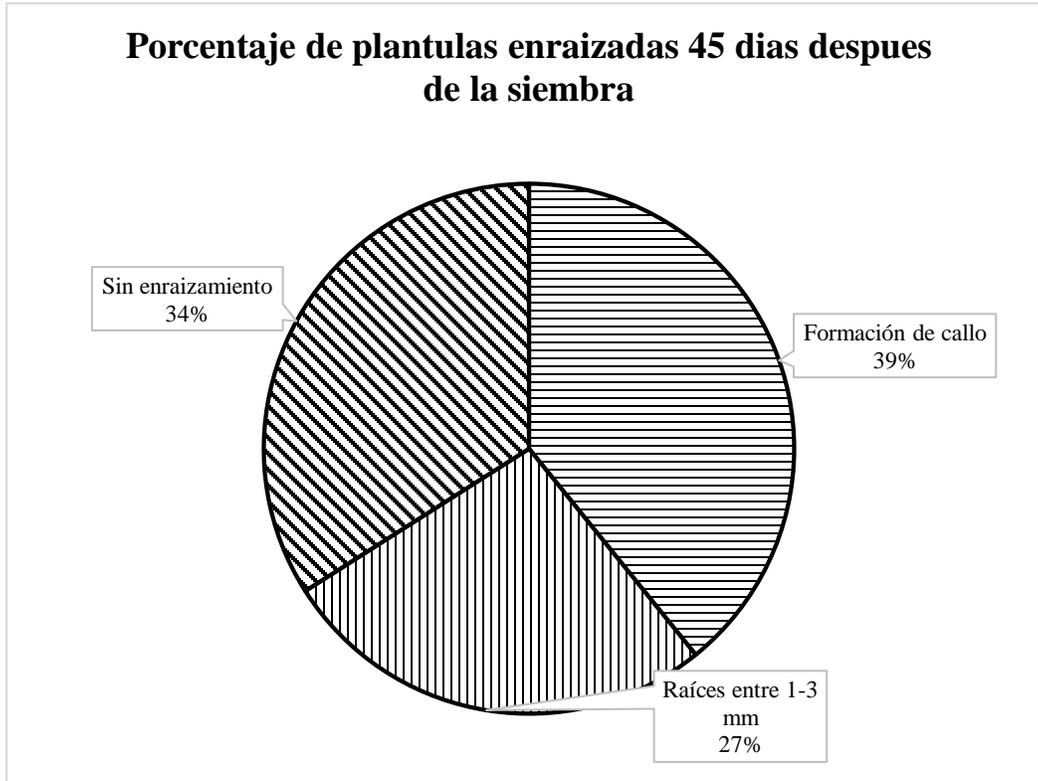
Se registró un desarrollo foliar en ascendente de las microplantas de Stevia de acuerdo con los días observados **A**: formación de hojas a los 8 días después de la siembra; **B**: formación de 2 hojas promedio a los 15 días después de la siembra; **C**: formación promedio de 4 hojas a los 30 días después de la siembra; **D y F**: formación promedio de 6 hojas a los 45 días después de la siembra. Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

9.2.3 Determinación del porcentaje de enraizamiento de las microplantas de Stevia en cultivo in vitro.

El AIB ha sido usado por otros autores para la inducción in vitro de raíces de Stevia. En ellos se han evaluado concentraciones desde 0.001 hasta 1.5 mg l⁻¹ con hasta un 100% de inducción de raíces en los explantes luego de seis semanas de cultivo.

Para obtener el porcentaje de plántulas enraizadas, se tomó en cuenta el número de raíces formadas observadas y el tamaño de las mismas. Los resultados obtenidos en esta parte del experimento van acompañados de la respuesta morfológica de las plántulas.

Grafica 12 *Porcentaje de microplantas enraizadas a los 45 días después de la siembra.*



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

De acuerdo a la gráfica la mayor parte de las plántulas formaron callo siendo el 39%, sin embargo un número considerable de plántulas formaron raíz siendo un 27% que superaron los 3 milímetros de longitud, y un menor número de plántulas sin formación de callo y sin formación de raíces siendo el 34% mismas. Los resultados evidenciaron la formación de raíces a los 45 días después de la siembra. (Végvari, 2001) Mostró que las raíces de plantas propagadas in vitro, generalmente pierden sus pelos radicales durante la aclimatación, pero estas raíces son todavía importantes porque las nuevas raíces desarrolladas son totalmente funcionales a partir de ellas.

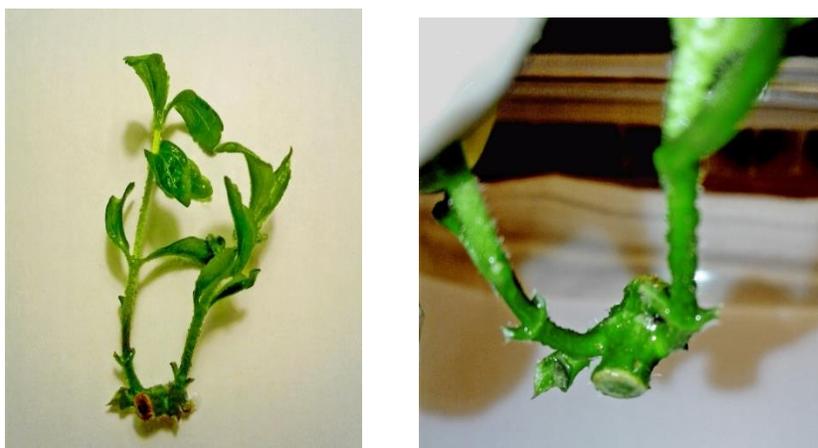
Cuadro 13 *Efecto del tipo y nivel de auxina en el número de plantas enraizadas y el tipo de enraizamiento in vitro de Stevia rebaudiana*

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	2.25	2	0.3251
Coef.Conting.Cramer	0.15		

Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó la formación de raíces no se vio influenciado por el ácido indolbutirico en el medio de cultivo de acuerdo con el coeficiente hubo una probabilidad de 0.3251, es decir el AIB no influyo en la formación de raíces. Se entiende que los niveles de AIB fueron bajos para la formación de raíz para su desarrollo explicando que la mayor concentración de solución influencio en el crecimiento de las plántulas mas no en la formación de raíces, ya casi siempre las fuentes de propagación se adaptan y crecen más rápido, dejando en desventaja a la formación de raíces. Estos resultados van de acorde con los encontrados por Delvalle, 2001 en los que utilizando una concentración de 0.1 mg/l de ácido indolbutirico (AIB), encontró diferentes reacciones en el enraizamiento de Stevia, obteniendo aproximadamente un 40% de formación de callo, 40% de plantas no enraizadas y tan solo un 20 % de plantas enraizadas.

Figura 28 *Obtención de microplantas sin presencia de raíz por el bajo Efecto del tipo y nivel de auxina en el cultivo in vitro de Stevia rebaudiana*



Fuente: Tesista CUSAM 2018, información de campo para esta investigación

9.3 RESULTADOS FASE II: ADAPTACIÓN Y ACLIMATACIÓN DEL CULTIVO DE STEVIA (*Stevia rebaudiana*) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

Es fundamental que las microplantas sean de buena calidad cuando se lleven a la etapa de aclimatación, porque de ello depende el porcentaje de supervivencia, la velocidad de crecimiento y el éxito cuando se cultiven en campo.

En la fase de aclimatación se pretende que las plantas que han crecido in vitro y por lo tanto sólo han estado expuestas a un microambiente escogido por ofrecer unas condiciones mínimas de estrés y cuasi óptimas condiciones para la multiplicación de las plantas, se adapten a condiciones ex vitro donde las condiciones no son asépticas, ni la luz, temperatura y humedad están controladas, y donde el crecimiento a ser autotrófico y no heterotrófico como in vitro. Respecto a la temperatura de las plantas de *Stevia rebaudiana* se desarrollan mejor entre los rangos de 26°C y 39°C.

9.3.1 Uso de macrotúnel para la aclimatación de *Stevia rebaudiana* en invernadero

Por lo anterior, se realizó la construcción de un macrotúnel basado en las tres erres de la ecología (Reducir, Reutilizar, Reciclar) propuesto por Koizumi Junichiro 2004, con el manejo de residuos que se producen a diario en el hogar o en la industria buscando ser más sustentables con el ambiente y reducir el volumen de basura generada, siendo estos: el uso de nylon de invernadero procedente de un invernadero sin uso pero en buen estado para la cubierta del macrotúnel, la reutilización de vaso de unicel como semilleros, el reusó de domos de pasteles como cajas germinadoras; siendo empleados en la aclimatación de las vitroplantas de *Stevia rebaudiana* extraídas del cultivo in vitro; más allá de ser un recurso, esta es una práctica que contribuyo a la conservación y el cuidado del medioambiente, sobre todo si toma en cuenta que el plástico es uno de los materiales que más tarda en desintegrarse y en cuya fabricación tienen lugar procesos químicos contaminantes. Por otro lado gracias a sus características fue posible implementar diferentes técnicas y utilizar diversos sistemas para optimizar la adaptación gradual a las condiciones ex vitro de las plántulas extraídas del cultivo in vitro de *Stevia*, por medio de un ambiente controlado en el periodo de aclimatación de los factores: intensidad lumínica, regulación

de la temperatura, y control de la humedad y riego; con el objeto de permitir la rehabilitación de los estomas, lignificación, cubiertas cuticulares y estructuras fotosintéticas así como su desarrollo, principalmente (Levitus et al. 2010).

9.3.2 Transferencia de las vitroplantas de *Stevia rebaudiana* al macrotúnel.

Las vitroplantas utilizadas en esta fase de la investigación fueron obtenidas de la producción obtenida de la primera fases de este estudio de la inducción del cultivo in vitro de *Stevia (Stevia rebaudiana)* en el laboratorio de biotecnología vegetal de 45 días de incubación.

Las plantitas fueron extraídas de cada frasco con la ayuda de pinzas. Luego se lavaron muy bien con agua corriente para remover los residuos del medio de cultivo. Seguidamente se sumergieron en una solución ácido indolbutírico con una cantidad de 1 mg/L-1 de agua desmineralizada por 20 minutos para la formación de raíces en cada una de las vitroplantas como se observa en la figura 29.

Figura 29 Preparación de las microplantas de *Stevia rebaudiana* en ácido indolbutírico para su aclimatación.



Fuente: Tesista CUSAM 2018, información de campo para esta investigación

Se trasladaron en los distintos contenedores siendo estos vasos de unicel con sustrato Peat Moss que fueron previamente humedecidos para evitar el estrés y pérdida de las plantas, los

cuales fueron ubicados en las cajas germinadores dentro del macrotunel para su adaptación y desarrollo bajo condiciones controladas en un periodo de 60 días para su adaptación a nuevas condiciones ambientales tales como, baja humedad relativa, alta intensidad de luz y fluctuaciones de temperatura.

Figura 30 Siembra de las vitroplantas en los diferentes contenedores con sustrato peat moss



Siembra de las vitroplantas obtenidas del laboratorio de biotecnología en vasos de unicel con sustrato peat moss, para su aclimatación y adaptación a condiciones ex vitro. Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

Las microplantas de *Stevia rebaudiana* se transfirieron al macrotunel para su aclimatación adaptación a través de espacios que permitieron la aclimatación gradual de las plantas y por ende un alto porcentaje de sobrevivencia, altura y desarrollo de las plántulas extraídas a los 45 días después su siembra en el cultivo in vitro, tomando en consideración la altura inicial (alturas obtenidas en in vitro) y la altura máxima (cm) alcanzada a los 60 días en el macrotunel, además de tomar en consideración el número de vitroplantas con el 34.02% raíces que superaron los 3 milímetros de longitud in vitro y el 39% sin formación de raíces, aunque de acuerdo con (Gribaudo, 2001) la presencia de las raíces afecta positivamente la aclimatación de las microplantas, cuando éstas son muy largas dificultan el trasplante ya que tienden a romperse, lo cual a su vez puede afectar la sobrevivencia de la planta.

Figura 31 *Ubicación de las vitroplantas dentro de las cajas germinadores para su adaptación dentro del macrotunel*



Traslado de las vitroplantas contenidas en vasos de unicel a las cajas germinadores para su aclimatación y adaptación bajo condiciones controladas (invernadero). Proceso de adaptación de forma gradual de las vitroplantas para su sobrevivencia. Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

9.3.2.1 Condiciones Climáticas dentro del invernadero: Iluminación, Temperatura (°C) y Humedad Relativa (%):

El manejo de las vitroplantas en el macrotunel se realizó con mucho cuidado, puesto que estas son muy sensibles a los cambios ambientales en los primeros días ex vitro, en especial al adecuado suministro de agua, su escasez provoca además del estrés hídrico (que puede ser irreversible) condiciones favorables para la aparición de plagas y enfermedades (Pinedo, 2000).

Tomando en consideración estos factores se realizó el recubrimiento total de las cajas germinadoras que contenían las vitroplantas tal y como se muestra en la figura 32, por lo se recubrió con nylon y sombra al 90% durante las 3 primeras semanas después del trasplante generando microclimas dentro del macrotunel permitiendo la adaptación controlada de las mismas, ya que en la mayoría de las plantas micro propagadas desarrollan un aparato fotosintético funcional por la adaptación gradual en condiciones ex vitro, aunque el aumento en la intensidad de la luz no es linealmente traducido en un incremento de la fotosíntesis ya que existen otros factores que interviene como la fertilización, riego, etc (Paraguay, 1994)

Figura 32 Sistema de protección para la aclimatación de las vitroplantas de *Stevia rebaudiana* dentro del macrotunel.



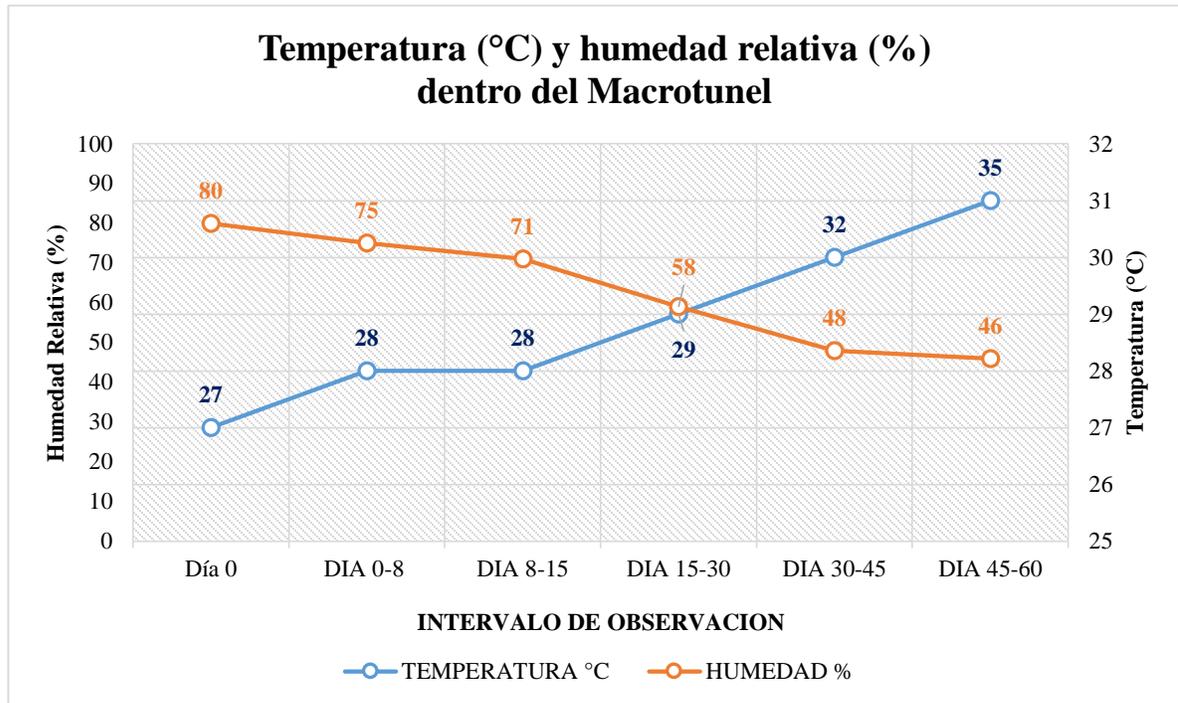
A: cubierta de protección a las vitroplantas con 90% de sombra como sistema de adaptación para la luminosidad, **B:** protección con nylon durante 3 semanas para la aclimatación gradual de las vitroplantas. Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación.

Respecto a la temperatura de las plantas de *Stevia rebaudiana* en el cuarto de crecimiento mantuvieron una temperatura de 26°C, por lo que se realizó el recubrimiento de las cajas germinadoras con nylon y sombra ala 90% a las cajas germinadores durante las primeras 3 semanas del trasplante lo cual permitió el control gradual de la temperatura dentro del macrotunel generando un microclima dentro de las cajas germinadoras permitiendo la adaptación de las vitroplantas lo cual se observa en la gráfica 14, registrando una baja temperatura durante estas primeras semanas del periodo de adaptación de las vitroplantas dentro del macrotunel permitiendo el manejo y control de forma gradual a estos rango de temperatura durante la aclimatación, puesto que esta condición en la temperatura durante la adaptación acelera el desarrollo de raíces.

Por tal razón se registró el porcentaje de la humedad relativa alta durante los primeros periodo de aclimatación, la cual se vio influida por la temperatura permitiendo la velocidad de evaporación del agua que se aplicaba, por ello se realizó un riego con intervalos de dos días de forma manual beneficiados por el tipo de sustrato que ayudo a mantener la humedad en la tierra y el recubrimiento total con nylon y el 90% de sombra a las cajas germinadoras, permitiendo el aporte en la penetración de los nutrimentos al mantener húmeda la hoja. Este último factor está relacionado

con la hora de aplicación, la cual se aplicó en horas tempranas del día para evitar deshidratación en las hojas. (Manjarrez, 2000).

Grafica 13 Registro y evolución de la temperatura y humedad relativa dentro del microtúnel.



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

El mantener una alta humedad en los primeros días de la transferencia ex vitro es un factor crítico para la sobrevivencia de las vitro plantas, ya que por sus condiciones fisiológicas y anatómicas, son muy sensibles a presentar desequilibrio en el mecanismo estomático y en consecuencia, las células de las regiones más tiernas manifestaran estrés hídrico, lo cual se logró mantener de acuerdo con los resultados de las primeras temperaturas en los primeros días siendo menores entre 28°C y 29°C en los primeros 8 y 15 días después del trasplante con una humedad del 80% y 75% respectivamente y 32°C y 35°C a los 45 y 60 días después del trasplante con una humedad relativa de 48% y 46% respectivamente.

Por lo que se puede concluir que la humedad estuvo relacionada con el grado de temperatura registrada sin embargo estos factores fueron influenciados por el control de la intensidad lumínica debido a que en los primeros 8 días se le proporciono de sombra al 90% transcurrido este tiempo se retiró la registrándose la elevación del alto porcentaje de humedad y baja temperatura; sin

embargo a los 2 días sin sombra las vitroplantas mostraron un cambio de coloración de las hojas causado por los rayos del sol asimismo síntomas de deshidratación debido a la escasa funcionalidad del aparato estomático, lo que pudo haber ocasionado su muerte.

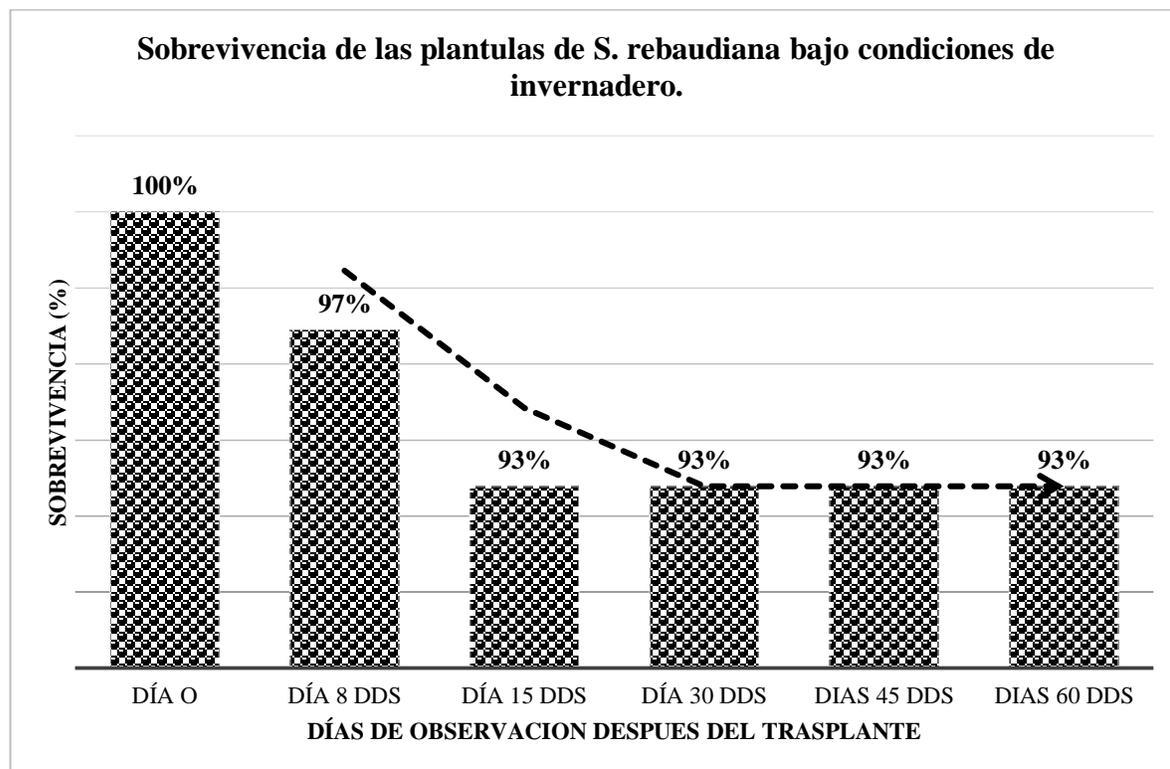
Estos síntomas se redujeron considerablemente al colocar nuevamente durante 3 semanas a 90% de sombra para evitar la fotoinhibición del aparato fotosintético. Esta reducción de la intensidad luminosa en condiciones de invernadero es un factor fundamental en los procesos de aclimatación (Carlos Nieto L., 2010). Durante las primeras dos semanas posteriores al trasplante, es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales y prácticamente se requiere simular las condiciones del ambiente in vitro, hasta tanto que las plantas se adapten.

9.3.2.2 Porcentaje de Supervivencia días después de la siembra

En el porcentaje de supervivencia de las vitroplantas aclimatadas se encontró una importante y significativa tasa de supervivencia (aprox. 93%) bajo el sistema de humedad de macro túnel permitiendo controlar de forma gradual las condiciones ambientales tales como, baja humedad relativa, alta intensidad de luz y fluctuaciones de temperatura permitiendo una adaptación de forma gradual dentro del macrotúnel. Para aumentar el porcentaje de supervivencia y adaptación de las vitroplantas, durante las primeras 3 semanas de la transferencia ex vitro a las cajas germinadoras se cubrió con tela de color negra que les proporciono el 90% de sombra transcurrido este tiempo se retiró la cubierta, debido a que las plantas cultivadas in vitro crecieron a bajos niveles de luz, desarrollando hojas muy delgadas, y con alteraciones anatómicas y funcionales. Por tal motivo, ante estas condiciones, pudo sufrir clorosis y quemaduras en el cultivo ex vitro.

El porcentaje de supervivencia durante el periodo de adaptación y aclimatación en general fue alta ya que después de 60 días en invernadero y al utilizar el 90% de sombra durante 3 semanas causo un efecto positivo en la adaptación de las vitroplantas reflejado en el porcentaje de supervivencia como se observa en la gráfica siguiente:

Grafica 14 porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de *Stevia* bajo condiciones de invernadero.



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

Los resultados obtenidos indican que el procedimiento de aclimatación fue favorable para el crecimiento de las microplantas ya que permitió la sobrevivencia de más del 93 % de estas. Aunque el porcentaje de supervivencia de las plantas fue decreciendo con el tiempo para el día 60, los resultados obtenidos indican que el procedimiento de aclimatación fue favorable para el crecimiento de las plantas micropropagadas, ya que permitió una alta supervivencia de éstas al final del periodo de evaluación. En contraste, con (Baxcajay L. V., 2012) cuando cubrieron las plantas con 90% de sombra durante 8 días y se mantuvieron bajo un riego intermitente, con el uso de la bolsas de polietileno sobre ellas durante 10 días reportando el 80 % la sobrevivencia de las plantas de *Stevia*. De la misma forma, (Espinal de Rueda D., 2006) reportaron que utilizar un sistema de macrotúnel permitió la supervivencia de 82,7 % de las vitroplantas. (Mukundan, 2003) Reportaron una tasa de supervivencia del 70,0 % de microplantas de *S. rebaudiana* bajo condiciones de invernadero.

La formación de raíces es de importancia primaria para el mantenimiento del equilibrio del agua durante la aclimatación de las plantas crecidas in vitro, aseguran, que la presencia de raíces en plantas leñosas garantizan alta sobrevivencia en la aclimatización, por lo que parte de la sobrevivencia de las vitroplantas en el macrotunel fue la formación de raíces, aunque en esta investigación no se estimó el número de la formación de raíces si se observó a los 30 días después del trasplante un incremento en la formación de raíces de acuerdo con la figura 33.

Figura 33 *Aumento de raíces en las plántulas de Stevia a los 30 días después del trasplante.*



Fuente: Tesista CUSAM 2018, información obtenida de campo.

9.3.2.3 Desarrollo de adaptación de las vitroplantas de Stevia rebaudiana

Parte de la supervivencia de las vitroplantas es su crecimiento y desarrollo dentro de la adaptación con las condiciones ambientales controladas asociadas con la disponibilidad de inductores de crecimiento, para ello a las vitroplantas se les fertilizo en el área foliar tomando en cuenta tres factores, la planta, ambiente y formulación foliar. Para ello se realizó una fertilización foliar inorgánico a cada 8 días con “CreciPlant” a una dosis de 5 ml L⁻¹ teniendo como ingrediente activo el ácido naftaleno acético, una hormona que estimula y promueve la división celular, el cual influyo en la elongación del tallo y en un buen desarrollo foliar, aplicado en horas de la tarde observando un mejor desarrollo de las vitroplantas. Además de acuerdo con lo establecido para este proceso se hizo uso del sustrato peat moss el cual influyo en crecimiento y

desarrollo de las plantas y su sistema radicular por medio de un adecuado equilibrio entre la capacidad de retención y desalojo del agua de exceso que se pudo conseguir con este sustrato.

9.3.2.4 Alturas Promedio de Vitroplantas

Para este análisis solo se tomó en cuenta el porcentaje de sobrevivencia de las vitroplantas a los 8, 15, 30, 45 y 60 días después del trasplante. Para encontrar los puntos críticos de crecimiento en el proceso de adaptación de las plantas en el macrotunel durante la etapa de aclimatación, se determinó la diferencia en la altura de las plantas en intervalos de 15 días después del trasplante. La aplicación de la estadística descriptiva a los resultados del cultivo in vitro permitió observar que la altura promedio inicial el día 0 del establecimiento ex vitro fue de 4.9 cm por vitroplantas con un total de 97 plantas establecida (100% de sobrevivencia), siendo el parámetro de crecimiento de las vitroplantas hasta los 60 días de adaptación.

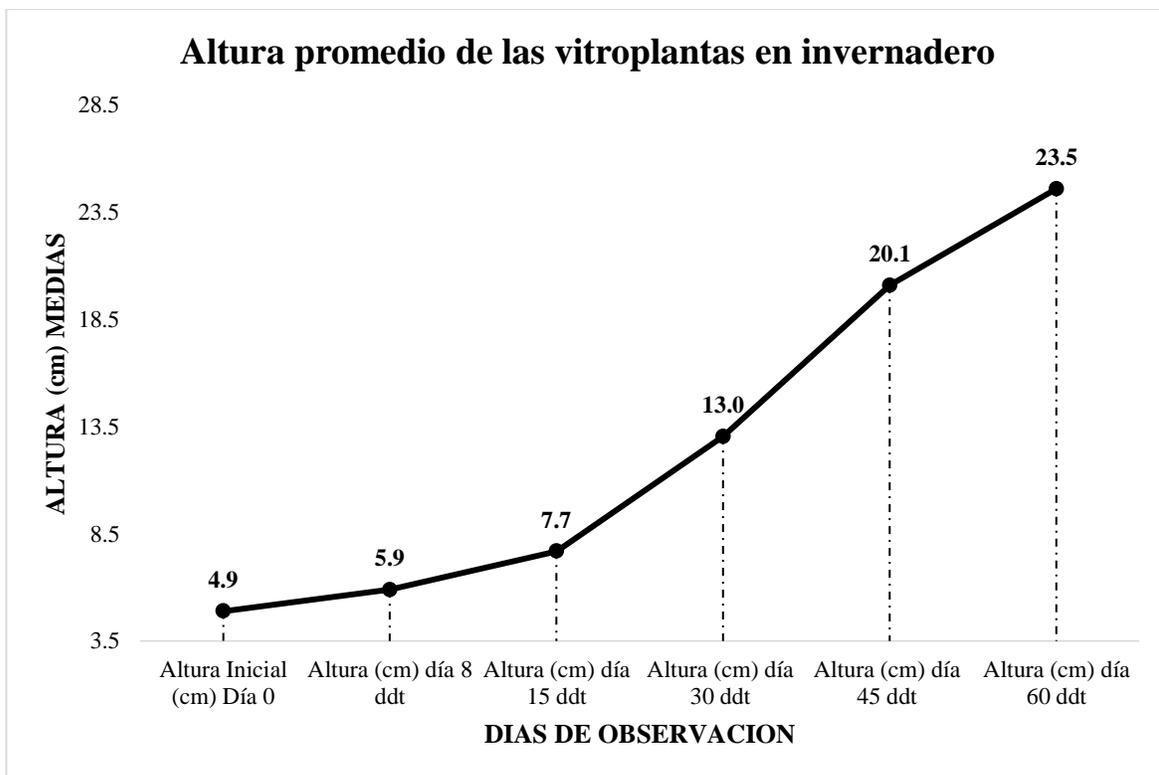
Cuadro 14 *Altura Promedio de Vitroplantas durante la aclimatación de Stevia. Altura inicial a la altura final a los 60 días después del trasplante (ddt).*

Estadística Descriptiva	Altura Inicial (cm) Día 0	Altura (cm) día 8	Altura (cm) día 15	Altura (cm) día 30	Altura (cm) día 45	Altura (cm) día 60
No. de observaciones	97	94	90	90	90	90
Media	4.9	5.9	7.7	13.04	20.0	23.5
D.E.	0.15	0.14	0.16	0.62	0.62	0.59
Var(n)	0.02	0.02	0.02	0.38	0.38	0.35
E.E.	0.01	0.01	0.02	0.07	0.07	0.06
CV	3.01	2.37	2.03	4.76	3.08	2.42
Mínimo	4.5	5.6	7.4	12	19	20.5
Máximo	5	6	7.8	13.5	20.5	25
Mediana	5	6	7.8	13.5	20.5	25
Q1	4.8	5.8	7.6	12.5	19.5	24
Q3	5	6	7.8	13.5	20.5	25
Datos faltantes	0	3	7	7	7	7

Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

De acuerdo al Cuadro 16, el mayor crecimiento de las vitroplantas se observó entre la cuarta y quinta semana de aclimatación en donde la mayor parte de las vitroplantas mostraron un mayor alargamiento del tallo. Asimismo, se destaca que el 63 % de la microplantas establecidas el día 0, las plantas tenían una altura de 5 cm el cual también incremento su altura a 26 cm a los 60 días, se observó que el 26.8 % del total de las microplantas establecidas el día 0, tenían una altura de 5.8 cm, incrementado su altura hasta 25 cm a los 60 días y las microplantas con el 10% del total de las microplantas establecidas el día 0 tenían una altura mínima de 4.5 cm y altura máxima de 5 cm, incrementado su altura hasta 23.5 cm establecida en el invernadero. Por lo que las vitroplantas establecidas dentro del macrotunel presentaron una mejor tendencia de crecimiento.

Grafica 15 *Altura promedio de las plantas de Stevia rebaudiana micropropagadas cultivadas en el invernadero durante 60 días.*



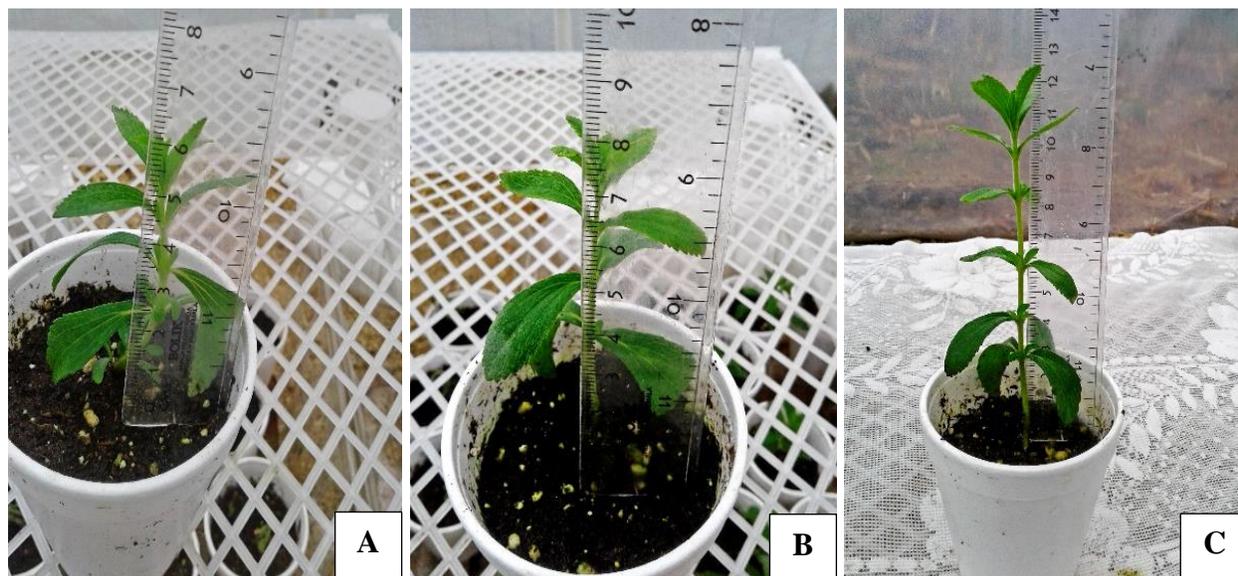
Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

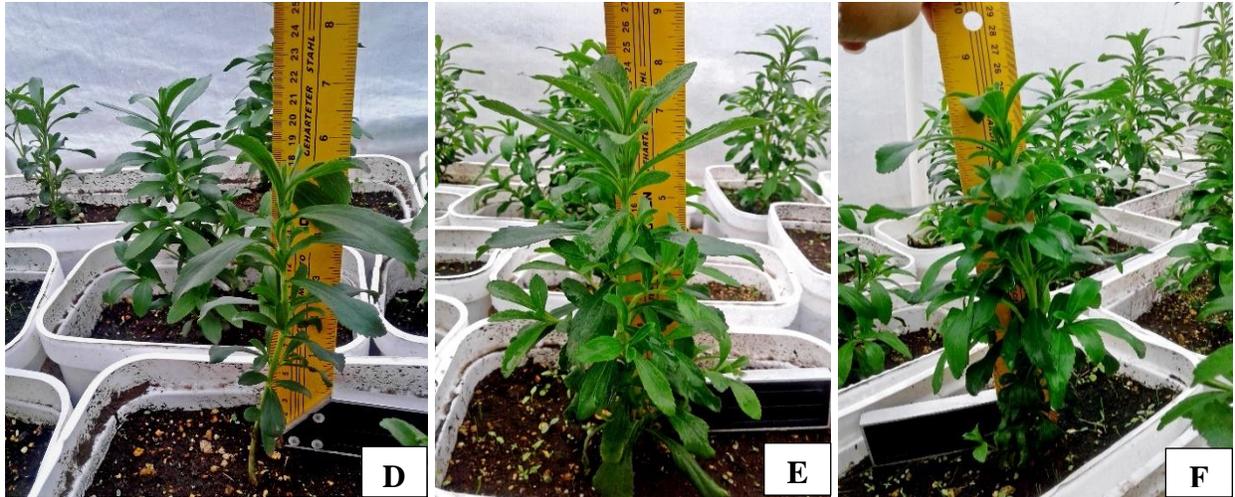
De acuerdo con los resultados ilustrados en la gráfica anterior durante el tiempo del día inicial al día 8 y 15 después del trasplante se observó un incremento de longitud de las microplantas de

sólo 1 cm durante los primeros 8 días, y un incremento de 2.8 cm a los 15 días esto pudo deberse a que durante este periodo de tiempo, las plantas estaban adaptándose a las condiciones del invernadero (alta temperatura e intensidad lumínica y baja humedad relativa); durante las primeras dos semanas posteriores al trasplante, es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales y prácticamente se requiere simular las condiciones del ambiente in vitro, hasta tanto que las plantas se adapten. No obstante a los 30 y 45 días, se observa una longitud de 5.3 cm y 7 cm un incremento de acelerado en las alturas de las vitroplantas, lo que podría indicar que para este tiempo las plantas ya habían logrado adaptarse a las condiciones del invernadero. Esto explica que las plántulas in vitro requieren de un periodo de aclimatación y adaptación a las condiciones “in vivo” para ser trasplantadas a terreno definitivo (Pierik, 1990).

El tiempo de aclimatación de 8 a 15 días donde se observó un bajo incremento de longitud de las vitroplantas de *Stevia*, con cuerda con la fase de aclimatación de las vitroplantas de *Stevia* realizada por (Baxcajay 2012) donde reporto que el periodo de aclimatación fue de 15 días con un incremento de longitud de 2.8 cm, pues después de este tiempo se observó un aumento en los valores de crecimiento siendo 5.3 cm a los 30 días. (Espinal de Rueda D., 2006) Observaron un mayor crecimiento entre la tercera y cuarta semana de aclimatación de las vitroplantas de *Stevia* propagación in Vitro de *Stevia rebaudiana* B. a Partir de Segmentos Nodales.

Figura 34 Adaptación de las vitroplantas dentro del invernadero conforme a su crecimiento (altura).



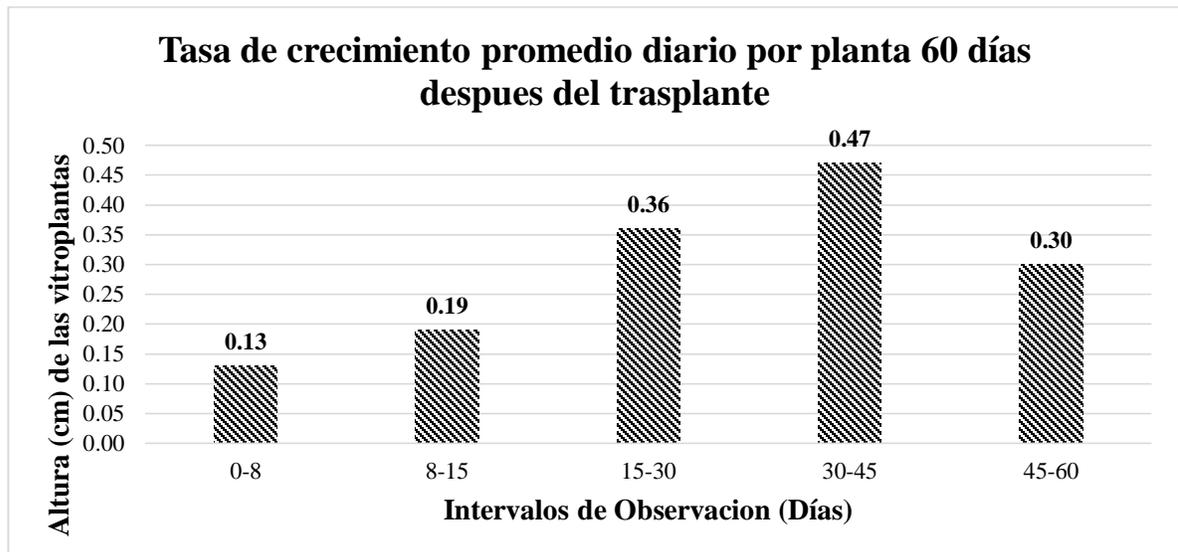


Se registró un crecimiento ascendente de las vitroplantas de Stevia de acuerdo con los días observados **A**: crecimiento en altura máxima de 6 cm a los 8 días después de la siembra; **B**: altura máxima de 8 cm a los 15 días después de la siembra; **C**: altura de 13 cm a los 30 días después de la siembra; **D**: altura de 20 cm a los 45 días después de la siembra; **E y F**: altura de 24 cm y 25cm a los 60 después de la siembra. Fuente: Tesista CUSAM 2018, información de campo.

9.3.2.5 Tasa de crecimiento promedio diario por planta durante los 60 días de evaluación

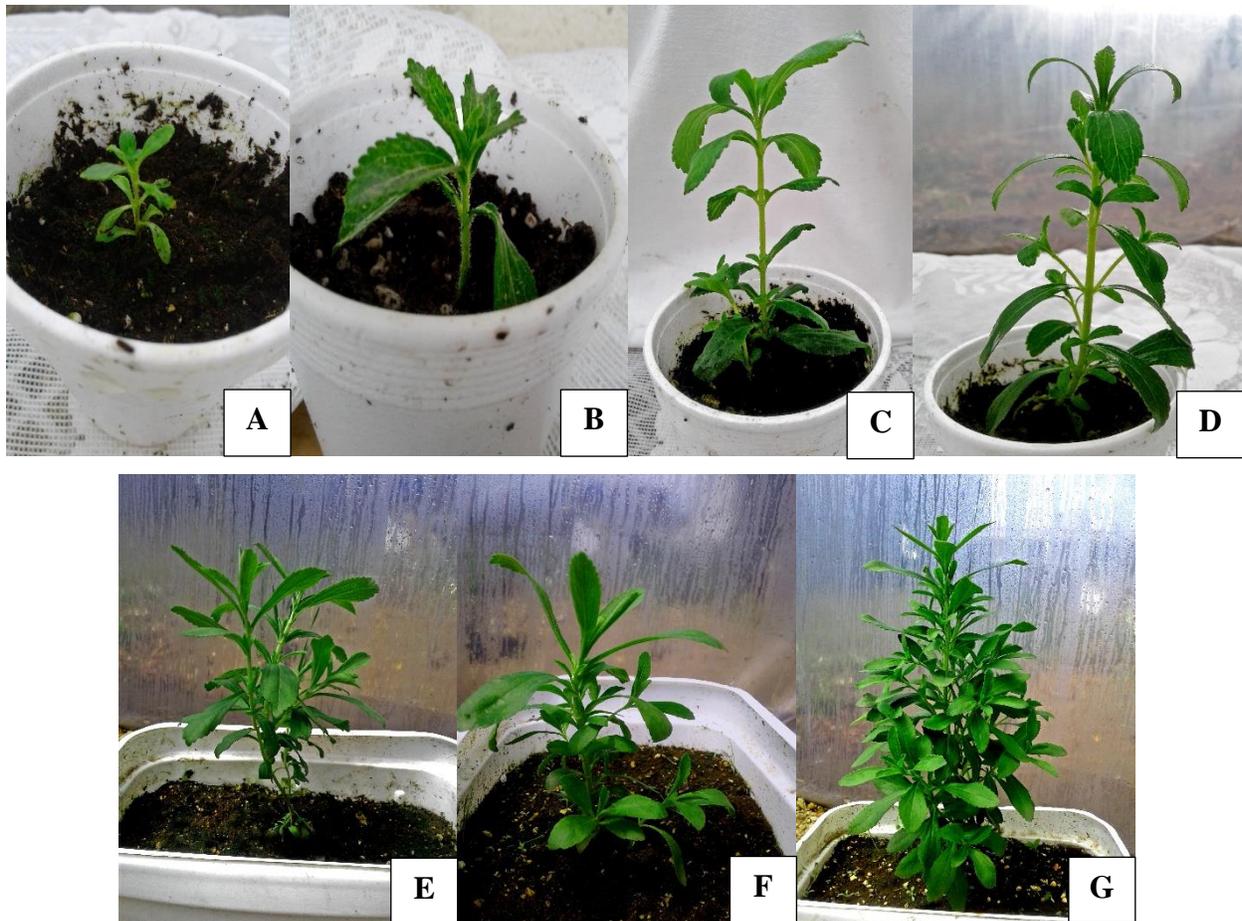
La tasa de crecimiento promedio diario por planta durante los 60 días de evaluación. En ella se puede observar que el crecimiento promedio fue de 0.13 cm y 0.29 cm entre los 8 y 15 días, mientras que en el intervalo de 45 a 60 días, el incremento en altura fue de 0.47cm y 0.27 cm por día en cada una de las vitroplantas, como se observa en la gráfica siguiente:

Grafica 16 tasa de crecimiento diario por plántula de Stevia durante los 60 días.



Se detectó una fase de crecimiento lento (0.13 cm y 0.19 cm) en todas las vitroplantas, desde la siembra hasta los 8 y 15 después del trasplante. Aunque en este trabajo no se midió la raíz, se postula que en ese lapso la plántula desarrolla más la raíz, para procurar un mejor anclaje y suministro de nutrimentos y agua. Después de la fase lenta, ocurre una aceleración del crecimiento hasta alcanzar un máximo de 0.47 cm los 45 después del trasplante. El tallo continuó con un crecimiento lento durante el periodo estudiado siendo de 0.30 cm para el día 60 después del trasplante.

Figura 35 Crecimiento de las vitroplantas dentro de las condiciones controladas hasta los 60 días después del trasplante.



Se registró un crecimiento ascendente de las vitroplantas de Stevia de acuerdo con los días observados **A**: proceso de adaptación de las vitroplantas a los y 8 días después de la siembra; **B**: proceso de adaptación de las vitroplantas visto en el crecimiento foliar a los 15 días después de la siembra; **C y D**: crecimiento en altura y desarrollo foliar a los 30 días después de la siembra; **F y G**: traslado de las vitroplantas a nuevos contenedores para su crecimiento y desarrollo a los 30 y 45 días después de la siembra; **G**: plantas aptas para condiciones ex vitro a los 60 después de la siembra, con buen crecimiento y desarrollo foliar.

9.3.2.6 Formación de hojas de las vitroplantas

Las plantas alcanzaron una altura promedio de 24.5cm (medido hasta el día 60 después del trasplante), el comportamiento general del incremento de los parámetros de crecimiento de la planta (longitud del tallo y el área foliar) y su relación con las concentraciones de fertilizante, permitieron el incremento de los mismos. Las plantas tuvieron hojas de coloración intensa y abundancia de follaje. Las hojas jóvenes permanecieron verdes hasta la etapa de senescencia. Comparativamente se observó un menor número de hojas con las plantas que tuvieron menor tamaño a los 60 días después del trasplante. Los datos de crecimiento observados tanto en longitud y área foliar sugieren que *Stevia rebaudiana* B responde significativamente a la concentración de la fertilización aplicada.

Cuadro 15 Desarrollo de hojas durante los 60 días de adaptación del cultivo de *Stevia*.

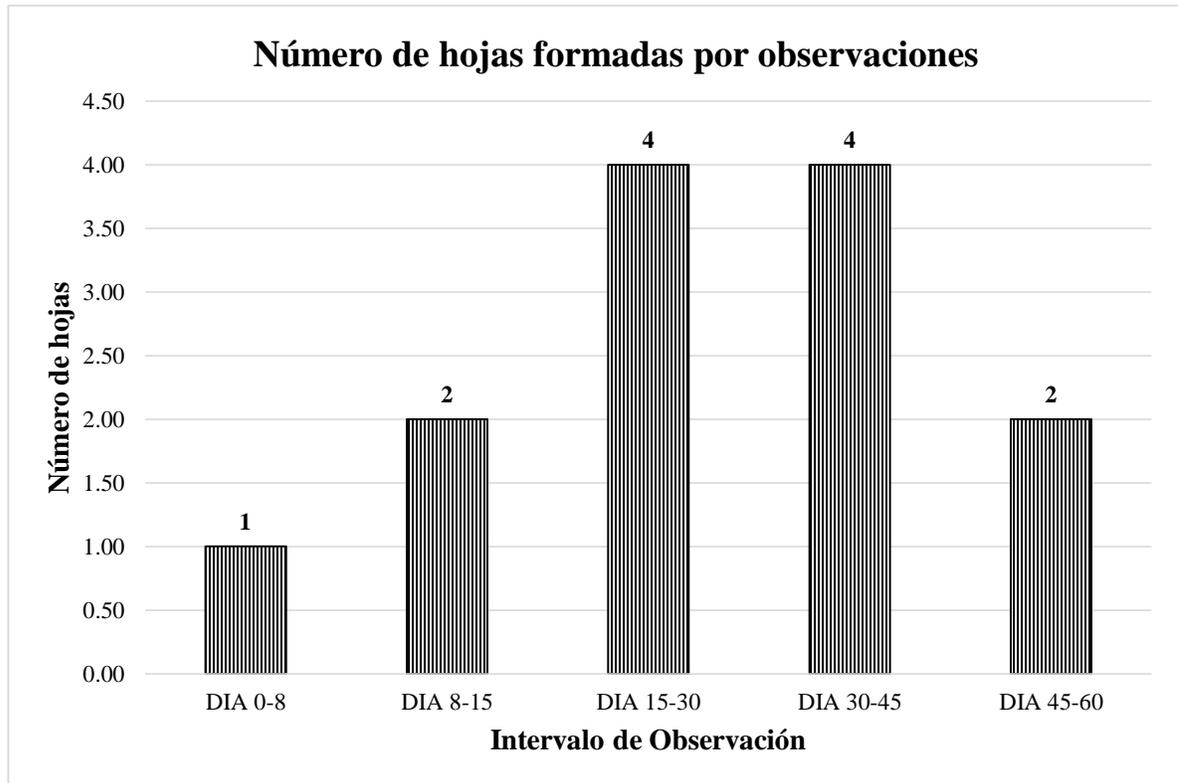
Estadística Descriptiva	DIA 0	DIA 8	DIA 15	DIA 30	DIA 45	DIA 60
No. de observaciones	97	94	90	90	90	90
Media	6	7	9	13	17	19
D.E.	0.6	0.61	0.62	0.83	1.2	1.24
Var(n)	0.36	0.37	0.38	0.68	1.41	1.53
E.E.	0.06	0.06	0.06	0.09	0.13	0.13
CV	9.94	8.66	6.82	6.3	7.09	6.57
Mínimo	5	6	8	12	15	17
Máximo	7	8	10	14	18	20
Mediana	6	7	9	13	17	20
Q1	6	7	9	12	16	18
Q3	6	7	9	14	18	20
Datos faltantes	0	3	7	7	7	7
Estadístico	Valor	Gl	p			
Chi Cuadrado Pearson	81.2	8	<0.0001			
Coef.Conting.Cramer	0.95					

Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

El uso de fertilizante foliar en las microplantas de *Stevia* influyo significativamente en la formación y desarrollo de las hojas en las vitroplantas, permitiendo la incorporación inmediata de los elementos esenciales en los metabolitos que se estaban generando en el proceso de fotosíntesis;

la aplicación del fertilizante se realizó de forma manual por aspersión promoviendo la fácil absorción de los nutrientes en las hojas (Gutiérrez, 2002).

Grafica 17 *Número de hojas desarrolladas durante los días de observación.*



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

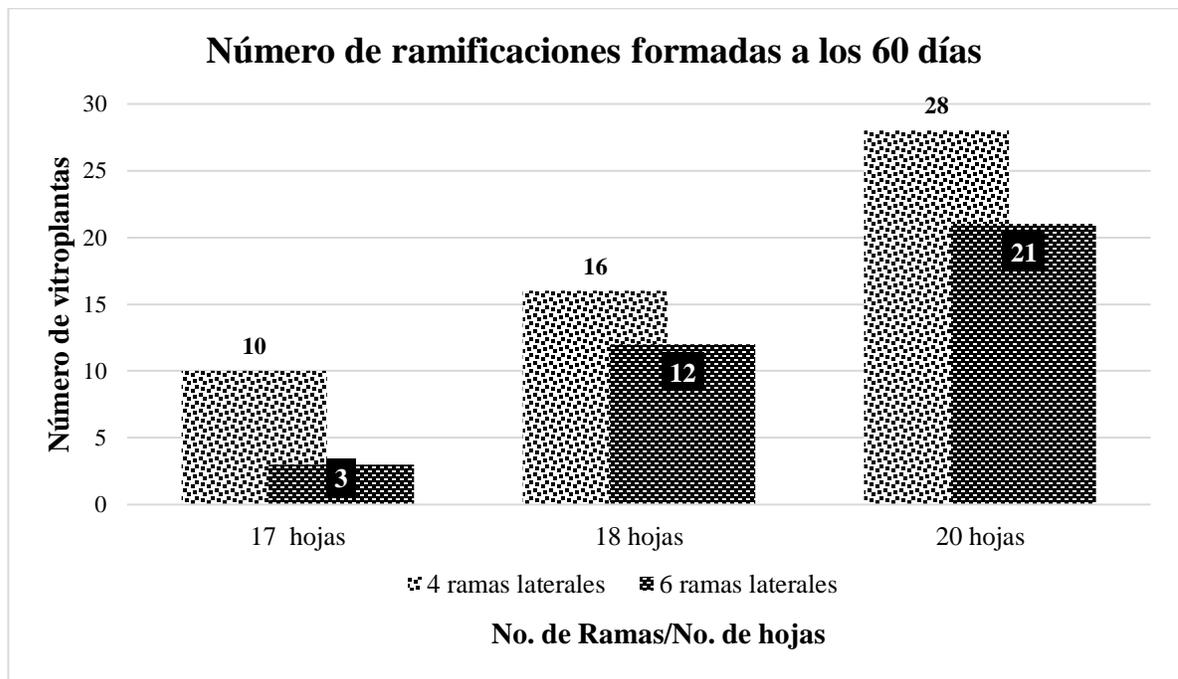
De acuerdo con la gráfica se observó una fase de crecimiento lento (1 hoja y 2 hojas) en todas las vitroplantas, desde la siembra hasta los 15 días después del trasplante. Esto es debido a que en esta fase las hojas se están adaptando a las condiciones ex vitro debido a que las hojas producidas in vitro, son frecuentemente finas, blandas, fotosintéticamente poco activas, los estomas no son lo suficientemente operativos, la conducción entre vástagos y raíces que se han originado in vitro no se han establecido adecuadamente, no tienen o tienen pocos pelos radicales, por lo que mueren rápidamente debiendo ser sustituidas por nuevas raíces, provocando una formación lenta de hojas, además las plantas se estaban adaptándose a las condiciones del invernadero (alta temperatura e intensidad lumínica y baja humedad relativa) mientras que a los 30 y 45 días, se observa una formación de 4 hojas, lo que podría indicar que para este tiempo las plantas ya habían logrado adaptarse a las condiciones del invernadero y por lo tanto un perfecto funcionamiento de las hojas.

Para los 60 días se ve una disminución en el número de formación de las hojas esto explica que para estos días se observó la formación de ramificaciones por ende el bajo desarrollo de hojas.

9.3.2.7 Determinación en la formación de ramificaciones de las vitroplantas de Stevia

De acuerdo con las observaciones, la formación de ramificaciones laterales se observó hasta el día 60 después del trasplante. De acuerdo con la morfología de la planta de Stevia, presenta una formación de hojas simples opuestas con entrenudos cortos o largos (Benítez, 2009); de acuerdo con estas características la formación de ramificaciones laterales fue influenciado primeramente por la aplicación de fertilizante foliar en las plantas que dio paso a su desarrollo, segundo por la disposición y cantidad de las hojas formadas en el tallo siendo el número de ramificaciones lateras mayor en las plantas que presentaron mayor formación de hojas con una formación de 2 ramificaciones por hojas y tercero para la edad fisiológica de la planta.

Grafica 18 Formación del número de ramificación formada de las vitroplantas de Stevia rebaudiana a los 60 días.



Fuente: Tesista CUSAM 2018, elaboración propia para esta investigación

De acuerdo con la gráfica, se desarrolló un máximo de 6 ramificaciones en plantas que presentaron 60% mayor número de hojas formadas siendo el 40% de las vitroplantas, sin embargo de vitroplantas presento una formación de 4 ramificaciones a los 60 días después del trasplante siendo el 60% de las vitroplantas de las cuales tenían aproximadamente 4 cm de largo. Las plantas que presentaron una formación de 17 hojas presentaron una formación de 4 y 6 ramas distribuidas en el número de vitroplantas: siendo 10 vitroplantas con la formación de 4 ramas laterales y 3 vitroplantas con 6 ramas laterales; las plantas que presentaron una formación de 18 hojas presentaron una formación de 4 y 6 ramas distribuidas en el número de vitroplantas: siendo 16 vitroplantas con la formación de 4 ramas laterales y 12 vitroplantas con 6 ramas laterales; y las plantas que presentaron una formación de 20 hojas presentaron una formación de 4 y 6 ramas distribuidas en el número de vitroplantas: siendo 28 vitroplantas con la formación de 4 ramas laterales y 21 vitroplantas con 6 ramas laterales. Esto explica el descenso del número de hojas en los días observados, dado que a los 60 días después del trasplante se observó una disminución en el número de las hojas siendo una formación de 2 hojas para el día 60 esta disminución se explica con la concentración formación de ramificaciones laterales en las plantas.

Figura 36 Formación y desarrollo de ramificaciones en las vitroplantas en el periodo de 60 días después del trasplante



Se registró una formación de ramificaciones en cada una de las hojas opuesta de las vitroplantas, de acuerdo con la morfología de las plantas de *Stevia rebaudiana*. **A:** se observó una presencia de formación a partir de los 30 días después del trasplante; **B:** crecimiento de las ramificaciones a los 45 días después del trasplante de aproximadamente de 1 a 2.5 cm de alargamiento; **C y D:** alargamiento de las ramificaciones de aproximadamente de 3.5 a 5 cm a los 60 días después del trasplante. Fuente: Tesista CUSAM 2018, información de campo

Los resultados obtenidos indican que el procedimiento de aclimatación fue favorable para el crecimiento de las microplantas de Stevia ya que no sólo permitió la sobrevivencia de más del 90% de estas, sino que lograron llegar a la madurez permitiendo la formación de ramas laterales.

La aclimatación y la sobrevivencia de la microplantas de *S. rebaudiana* se vio favorecida por varios factores como el sustrato, el traspaso de las plantas a bolsas de polietileno sobre ellas a los 30 días después del trasplantes por la creciente formación de raíz, además del favorecimiento del macrotunel que mantuvo la humedad relativa alta y la malla sombra al 90% durante 4 semanas que redujo la intensidad lumínica; así como los riegos intermitentes y la fertilización que dio paso a la formación de hojas verdes oscuro y formación de ramificaciones laterales.

X CONCLUSIONES

- 1) De acuerdo con los resultados obtenidos de la propagación in vitro de *Stevia rebaudiana* el 100% de los explantes incubados durante los 45 días, dieron paso a la regeneración de plántulas de Stevia a partir de yema axilares en los explantes, las cuales crecieron y se desarrollaron con éxito en el medio de cultivo proporcionado.

- 2) De acuerdo con el análisis conjunto de las variables: explantes contaminados, tipo de contaminación, presencia de clorosis u oxidación, y la formación de brotes en los explantes a los días de incubación; la propagación in vitro de *Stevia rebaudiana* tuvo una contaminación de un 3% siendo hongos principalmente y bacterias que dieron lugar a la muerte de los explantes, con una presencia de clorosis u oxidación leve en los explantes del 21% de todos los explantes sembrados, con un 85% de los explantes con una formación de 2 brotes/explante y el 15% una formación de 1 explante/brote. A partir de estos resultados, la sobrevivencia de los explantes en el cultivo in vitro de *Stevia rebaudiana* fue del 97%, considerando que la inmersión de los explantes en Amistar a 1 ml/l durante 2 horas disminuyó considerablemente los porcentajes de contaminación microbiana, y el uso de carbón activado en el medio de cultivo influyo significativamente en control de la oxidación o clorosis de los explantes evitando o disminuyendo considerablemente el deterioro del explante, de lo cual se considera favorable al crecimiento y desarrollo de las microplantas hasta los 45 días de incubación en medio de cultivo in vitro.

- 3) El crecimiento y desarrollo de las vitroplantas estuvo registrado por las variables tamaño de los brotes y formación de hojas que permitieron determinar la regeneración de las microplantas dentro del medio de cultivo. De acuerdo con el análisis estadístico de las variables estudiadas, y la separación de sus medias evidenciaron que el crecimiento (altura y número de hojas) de las microplantas obtenida a los 45 días después de la siembra se vieron influenciadas significativamente ($p=0.001$), por la combinación de citocinina/Auxina (AIB/BAP) a una dosis de 1 mg L⁻¹, la concentración de macroelementos (100% MS), el tipo de citocinina/Auxina (bencilaminopurina y ácido indolbutírico); además también influyeron las

interacciones: concentración de macroelementos (100% MS) con el nivel de citocinina/Auxina (1 mg/l), la consistencia del medio (solido) con el tipo de citocinina/Auxina (BAP/IAB) y la concentración del medio solido (100% MS) con el tipo de citocinina/Auxina (BAP/IAB); sin la formación de callos, permitiendo la estabilidad genética en las microplantas, esto, a escala productiva, podría contribuir a incrementar el número de plántulas propagadas, manteniendo la fidelidad genética de las microplantas.

- 4) De acuerdo al análisis de las variables de crecimiento y desarrollo de las microplantas, la tasa de crecimiento diario dentro del cultivo in vitro, permitió un incremento acelerado en los primeros 8 y 15 días de 0.21 cm diarios, sin embargo a los 30 y 45 días se ve una disminución de crecimiento siendo de 0.10 cm diarios, la cual es consecuente con la dominancia del meristemo y su influencia en la elongación de la plántula y la inhibición del desarrollo de hojas permitiendo que en los primeros días el crecimiento fuera mayor y la inhibición del desarrollo hojas hasta los 30 días después de la siembra. Aunado a esto la tendencia por parte de los brotes a la uniformidad de sus alturas, existiendo de una alta heterogeneidad para el día 8 siendo un 36% de las microplantas con una altura de 1.2cm, el 31% de 1.1cm, un 23% con 1cm y un 10% con una altura de 0.9 cm, sin embargo una uniformidad para el día 45 después de la siembra en el crecimiento de las microplantas siendo el 63% con una altura de 5cm, un 24% de 4.8cm y un 10% con una altura de 4.5 cm, por lo que el protocolo de regeneración utilizado indujo a la elongación y uniformidad de crecimiento de los microplantas.
- 5) Las condiciones de aclimatación permitió la sobrevivencia de más de 93 % de las microplantas a las condiciones de invernadero hasta los 60 días después del trasplante. El sistema de macrotunel permitió aclimatar las vitroplantas de *Stevia rebaudiana* de forma gradual las condiciones ambientales tales como: baja humedad relativa, influida por la velocidad de evaporación del agua que se aplicaba, influenciado en el intervalo de riego el cual fue aplicado cada 2 días de forma manual atribuido al tipo de sustrato permitiendo a mantener la humedad en la tierra y la lenta evaporación del agua; intensidad de luz por medio de sarán de sombra y fluctuaciones de temperatura

permitiendo una adaptación de forma gradual de las vitroplantas dentro del macrotunel a las condiciones ex vitro donde solo el 7% de las vitroplantas de Stevia murieron durante este proceso.

- 6) Se determinó que en los primeros 15 días el crecimiento de las vitroplantas fue menor debido a que se estaban adaptándose a las condiciones del invernadero (alta temperatura e intensidad lumínica y baja humedad relativa), por lo que las plantas estaban pasando por un estrés post-siembra, teniendo un crecimiento promedio de 0.29 cm a los 15 días después del trasplante. Sin embargo a los 45 y 60 días se registró un incremento en altura de 0.47 por lo que se pudo determinar que para este tiempo las plantas ya se adaptaron correctamente alcanzando su crecimiento óptimo.

- 7) De acuerdo al análisis conjunto de las variables: Altura de las vitroplantas, número de hojas desarrolladas y número de ramificaciones permitió el registro de la adaptación de las vitroplantas a las condiciones ex vitro. La altura media de las vitroplantas a los 60 días ex vitro fue de 23.5 cm, con un número promedio de hojas de 19 hojas con una formación de 4 ramificaciones por vitroplantas. A partir de estos resultados la adaptación de las vitroplantas es del 100% con un crecimiento y desarrollo óptimo entrando a la fase adulta de las vitroplantas por la formación de ramificaciones, potencializado por la aplicación de fertilizante foliar con una dosis de 2ml L-1 con un intervalo de 8 días, el cual influyó en la elongación del tallo, un buen desarrollo foliar y un incremento radicular.

XI RECOMENDACIONES

11.1 Propias de la investigación

- 1) Realizar un tratamiento fitosanitario (insecticida + fungicida + bactericida) a las plantas madres por lo menos durante cuatro semanas antes de ingresar el material vegetal al laboratorio para evitar un grado alto de contaminantes dentro de laboratorio.
- 2) Escoger material vegetal joven de 2 a 3 mm de grosor, evitando materiales en plena floración o que estén lignificados.
- 3) Realizar más evaluaciones sobre esterilización superficial de los explantes para disminuir el porcentaje de contaminación durante el establecimiento, ya que la contaminación por bacterias y hongos es bastante alta en este periodo.
- 4) Realizar investigaciones que incluyan la etapa de multiplicación utilizando el mismo medio de cultivo ya que se obtiene el mayor número de brotes y un buen crecimiento de brote, permitiendo la obtención de mayor cantidad de microplantas.
- 5) Realizar pruebas de enraizamiento utilizando diferentes niveles y tipos de auxinas para la formación de vitroplantas con raíces más endurecidas para ser aclimatadas en invernadero.

11.2 A instituciones, empresas privadas agrícolas y entes interesados en la producción agrícola

- 1) A partir de los resultados obtenidos de esta investigación se propone una estrategia para la producción de plántulas in vitro de Stevia con potencial aplicación a escala comercial. A diferencia del empleo de medios de cultivo libres de reguladores de crecimiento que se han usado frecuentemente, se recomienda la adición de 1 mg L⁻¹ de 6-BAP y 1 mg L⁻¹ de AIB en la fase de inducción con un manejo de explantes con yemas axilares para mantener la fidelidad genética de las microplantas.
- 2) Los resultados y las estimaciones en cuanto al tiempo del proceso de producciones descritas en esta investigación representan ventajas para un sistema productivo. Es posible subcultivar los explantes a medio de cultivo con igual composición. Es de considerar que en cada subcultivo es posible seleccionar los ápices para cultivarlos durante 45 días en

medio de cultivo MS con 1 mg L⁻¹ de BAP/AIB, con el fin de inducir la formación de microplantas y posteriormente continuar con su adaptación en condiciones ex vitro.

- 3) Las recomendaciones generales para el manejo del cultivo de *Stevia* en la etapa de aclimatación, deben ser consideradas y tomadas como base el manejo agronómico para el cultivo de *Stevia rebaudiana* B. tomando en cuenta la construcción de un sistema de invernadero para el cultivo de *Stevia* para un mejor manejo de los factores de aclimatación de las vitroplantas en condiciones ex vitro previo a campo definitivo.

11.3 A la universidad

- 1) Esta primera aproximación en función de la propagación in vitro debe convertirse en una incentivación para desarrollar investigaciones de esta índole, a pesar de la utilidad que tendrá la información generada, es necesario efectuar más estudios sobre la micropropagación in vitro del cultivo de *Stevia* propiamente, como estudio de la *Stevia rebaudiana* B. como endulcorante natural y su uso en beneficio de la salud.
- 2) Proporcionar un espacio para la realizar estudios de esta índole en el laboratorio de biotecnología presente en las instalaciones del Centro Universitario De San Marcos para la carrera de ingeniero agrónomo con orientación en agricultura sostenible, a beneficio del estudiante para su trabajo de graduación de la carrera de ingeniero agrónomo. Queda el desafío propuesto a la carrera de Ingeniería agronomía con orientación en agricultura sostenible, del Centro Universitario de San Marcos abordar esta línea de investigación.

XII CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Cuadro 16. Cronograma de actividades

ACTIVIDAD	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5
Fase I Cultivo In vitro					
Obtención del material vegetativo (planta madre) para la micropropagación y su preparación aséptica					
Preparación del medio de cultivo					
desinfección e Incubación de los explantes en el medio de cultivo					
control del desarrollo de los explantes y toma de datos					
resiembra de explantes para la formación de raíces					
preparación de las plantas previo a la siembra en sustrato					
Fase II adaptación Ex vitro					
Preparación de los materiales para la siembra ex vitro					
Construcción del invernadero					
Instalación del cultivo de <i>Stevia rebaudiana</i> dentro del micro invernadero					
Control del desarrollo de adaptación de las plantas de <i>Stevia rebaudiana</i> . Y toma de datos					
Fase Final					
Elaboración de base de datos					
Tabulación de datos obtenidos					
Análisis estadístico y descripción de los resultados					
Sistematización de la información generada					
Redacción de informe final					
Reproducción de documento técnico					

XIII PRESUPUESTO

Cuadro 17 Presupuesto de la investigación

Presupuesto de la investigación				
RUBRO	DESCRIPCIÓN	UNIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
PAPELERÍA				
Papel bond	resmas	2	Q50.00	Q100.00
Encuadernados	unidades	12	Q15.00	Q180.00
Lapiceros	"	2	Q1.50	Q3.00
Marcadores	"	2	Q3.00	Q6.00
Regla de metal	"	1	Q5.00	Q5.00
Cinta adhesiva	rollo	1	Q5.00	Q5.00
Tinta (impresiones)	cartuchos	2	Q100.00	Q200.00
Fotocopias	unidades	200	Q0.25	Q50.00
Libreta de datos	unidad	1	Q20.00	Q20.00
Sobres manila (bolsas de papel)	unidad	5	Q1.00	Q5.00
COSTOS INDIRECTOS				
Transporte	cinco visitas al laboratorio	5	Q20.00	Q100.00
EQUIPO				
Laptop	horas	60	Q10.00	Q600.00
Cámara fotográfica	unidad	1	Q2,500.00	Q2,500.00
SERVICIOS PROFESIONALES				
Estudiante	horas	1248	Q9.38	Q11,706.24
INSUMOS EX VITRO				
plantas de Stevia	plantas	20	Q45.00	Q900.00
Fertilizantes	unidad	2	Q52.00	Q104.00
Peatt moss	quintal	1	Q300.00	Q300.00
Nylon para invernadero	yarda	6	Q40.00	Q240.00
Sarán para sombra	yarda	6	Q40.00	Q240.00
cajón de madera	unidad	1	Q200.00	Q200.00
tubos PVC	unidad	2	Q20.00	Q40.00
INSUMOS IN VITRO				
Esterilización in vitro	milímetros	10	Q10.00	Q100.00
Medio Basal MS	litro	1	Q30.00	Q30.00
Equipo de Laboratorio	unidad	1	Q200.00	Q200.00
cama de Flujo de Laminar	horas	100	Q5.00	Q500.00
			TOTAL	Q18,334.24

Fuente de financiamiento:

Estudiante de la carrera de Ingeniero Agrónomo con orientación en Agricultura Sostenible.

Nota: el costo unitario de las horas de trabajo corresponden al acuerdo gubernativo 537- 2013. Salario mínimo 2014 GT. Artículo primero, salario mínimo de actividades agrícolas, no agrícolas publicado por el Ministerio de Trabajo y Prevención Social (MINTRABAJO, 2014)

XIV BIBLIOGRAFIA

- AGEXPORT. (21 de NOVIEMBRE de 2013). *AGRITRADE*. Obtenido de Chia, stevia, ajonjolí y amaranto nuevas propuestas de cultivo para Jalapa: <http://agexporthoy.export.com.gt/2013/11/chia-stevia-ajonjoli-y-amaranto-nuevas-propuestas-de-cultivo-para-jalapa/>
- AGEXPORT. (22 de Septiembre de 2014). *Guatemala amplía oferta de productos para feria comercial*. Obtenido de E&N: <http://www.estrategiaynegocios.net/lasclavesdeldia/731475-330/guatemala-ampl%C3%ADa-oferta-de-productos-para-feria-comercial>
- Alfredo de Jesús Jarma O.1, E. M. (2010). *Aspectos nutricionales y metabolismo de Stevia rebaudiana (Bertoni)*. Colombia: Agronomía, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería Colombia.
- Álvarez, J. C. (2006). *Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del ka'a he'e (bertoni)*. Paraguay: Ministerio de agricultura y ganaderia MAG Paraguay.
- Angel Mejía, M. I. (2014). *Estudio de factibilidad para la agro-industrialización de los productos derivados de la planta de Stevia para pequeños productores en el municipio de Tejutepeque, cabañas*. El Salvador: Universidad facultad de ingeniería y arquitectura.
- Antioquia., S. d. (2000). *Informe preliminar sobre adaptación de la especie Stevia rebaudiana en la región tropical*. Colombia: Gobernación de Antioquia, Medellín.
- Ávila Baray, H. (2006). *Introducción a la metodología de la investigación*. México: Edición electrónica. . Obtenido de VariEduca.
- Azofeifa, Á. (enero-julio, 2009). *PROBLEMAS DE OXIDACIÓN Y OSCURECIMIENTO DE EXPLANTES CULTIVADOS IN VITRO*. Alajuela, Costa Rica: Universidad de Agronomía Mesoamericana, vol. 20, núm. 1.
- Baxcajay, L. V. (2012). *Cultivo in vitro de Stevia rebaudiana BERTONI*. Montecillo, Texcoco, Edo. de México: Colegio de Postgraduados.
- Baxcajay, L. V. (2012). *Cultivo invitro de Stevia rebaudiana BERTONI*. Montecillo Texcoco: Colegio de posgrados.

- Benítez, B. (2009). *Morfología y micrografía del ka'a he'e, Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni, provenientes de diferentes cultivares del país*. Paraguay: Investigación realizada en el Herbario FACEN- Departamento de Biología de la Facultad de.
- Carlos Nieto L., N. M. (2010). *Desarrollo en vivero de vitroplantas de Dendrobium Lorrie Mortimer cultivados en seis sustratos*. Barquisimeto, Lara, Venezuela: Unidad de Biotecnología Vegetal (UCLA) Universidad Centroccidental.
- Casilimas, C. A. (2002). *Investigacion Cualitativa*. Bogotá, Colombia: Programa de especializacion en teoria, metodos y tecnicas de investigacion social.
- Castillo, A. (2008). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Las Brujas, Uruguay: INIA.
- Castillo, V. (2011). *Conferencia. Stevia rebaudiana: Edulcorante saludable*.
- Castro Doomernik, A. F. (1999). *Aclimatación de dos especies de helecho propagadas in vitro: Nephrolepis exaltata cv. Bostoniensis (helecho bostoniensis) y Nephrolepis cordigera (helecho cola de quetzal)*. HONDURAS: ZAMORANO.
- CIAT. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura; Fundamentos y Aplicaciones*. Ed. Roca, W. M.; Mroginski, L.A. Cali, Colombia,; Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- CONACYT. (1998). *MICROPROPAGACION*. México: Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
- Courtis, A. (2014). *CRECIMIENTO Y DESARROLLO VEGETAL*. ARGENTINA: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura.
- Cuadras, C. M. (2007). *Nuevos metodos multivariabes*. Barcelona, España: Manacor.
- Daniel V. Hurtado M., M. E. (1994). *Cultivo de tejidos vegetales*. México: Trillas.
- Diego Martínez Rivillas, A. U. (2016). *Estrategia para la propagación in vitro de Stevia rebaudiana Bertoni*. Medellín. Antioquia. Colombia: Instituto de Biotecnología de las Plantas Vol. 16,.
- Dumas Oviedo-Pereira, S. A.-M. (2015). *Micropropagación de Stevia rebaudiana Bertoni, un Cultivo Promisorio para México*. San Isidro. Yautepec, Morelos. México CP: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico.
- Espinal de Rueda D., D. v. (2006). *Propagación in Vitro de Stevia rebaudiana B. a Partir de Segmentos Nodales*. Ceiba .

- (2008). *Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (Stevia rebaudiana Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano*. Colombia: Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería .
- FAO. (7 de julio de 2008). *Hoja Informativa, Glicósidos de esteviol*. Obtenido de Stevia y sus propiedades:
http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/FACTSHEET_%20STEVIOGLYCOSIDES_final1.pdf
- FAO-OMM. (2012). *Legalidad de Consumo de la Stevia* . Organización Mundial de la Salud, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Folgueras, M. H. (2011). *La contaminación microbiana en la micropropagación in vitro de las raíces y tubérculos tropicales*. Libro de reportes cortos. Ciego de ávila: Taller internacional BioVeg.
- FUNCFOS. (2000). Manual de la Stevia. Stevia rebaudiana Bertoni. Kaá-hé-é. En F. C. Social.. Colombia: http://es.scribd.com/doc/39933345/Manual-Stevia#open_download.,
- Gállego, J. T. (2012). *Cómo cura la estevia (Manuales integral)*. RBA Integral.
- García, M. B., Abeal, E. E., Rodríguez, I. P., & Rodríguez, S. M. (2009). *Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de Dioscorea alata L. clon caraqueño*. Bogota: Revista Colombiana de Biotecnología.
- Girgebv. (1994). *Tejidos., Laboratorio de Genética-unidad de Cultivo de Tejidos. Resumen del primer curso nacional de Propagación In Vitro de especies ornamentales*”. Perú.
- Griboaud, I. N. (2001). *Improved control of water loss from micropropagated grapevines (Vitis vinifera cv. Nebbiolo*. Torino, Italia.
- Gutiérrez, M. (2002). *Estación Experimental Fabio Baudrit M*. Universidad de Costa Rica.
- Hanson J. R., D. O. (1993). *Esteviosido y glucósidos dulditerpenoides relacionados*. Informes de productos naturales.
- Hanson J. R., D. O. (1993.). *Stevioside and related sweetditerpenoid glycosides*. Natural Products Reports.
- Hernández, A. H. (2008). *Agricultura Protegida*. México.
- Ibrahim IA, N. M.-Z. (Plant growth regulators affecting in vitro cultivation of Stevia rebaudiana.). 2008.

- ICTA. (1996). *I Simposio Nacional sobre Cultivo de Tejidos Vegetales. Cultivo de tejidos y su aplicación en agricultura*. Guatemala, Guatemala: Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola.
- INIFAP. (2011). *Manual Tecnológico de Stevia*. Mocochoá. Yucatán: Centro de Investigación Regional Sureste.
- Isidro E. Suárez¹, J. A. (2008). *Propagación in vitro de Stevia rebaudiana BERT. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogenesis*. Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería Agronomía.
- J, Á. E. (2006). *Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del ka''a he''e (Stevia rebaudiana (Bertoni)) en el Paraguay*. Paraguay: Ministerio de Agricultura y Ganadería Manual Técnico N°8.
- Jiménez T., C. G. (2010). *Evaluación del contenido de esteviósido y rebaudiósido A en una población de Stevia rebaudiana Bertoni (kaâ heê) cultivada comercialmente. Estudio preliminar*. Paraguay: Instituto Nacional de Tecnología y Normalización (INTN). Asunción-Paraguay e Instituto Agronómico Nacional (IAN). Caacupé Paraguay.
- Juaquín Azcón-Bieto, M. T. (2000). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. España: Edición Universitaria de Barcelona.
- Kozai, T. (1991). *Micropropagación under photo autotrophic aconditions*. Technology and application DEBERG, P, C; ZIN MERMAN, R. H (eds) KLUWER.
- Laukkanen, H., Rautiainen, L., Taulavuori, E., & Hohtola, A. (2000). *Changes of cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds*. Tree Physiology.
- Levitus G., E. V. (2010). *Bioteología y Mejoramiento Vegeal II, Consejo Argentino para la Informacion el Desarrollo de la Bioteología*. Argentina : Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuarias.
- Levitus G., E. V. (2010). *Bioteología y Mejoramiento Vegetal II Ediciones*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información el Desarrollo de la Bioteología.
- Libre, P. (27 de Octubre de 2012). Cultivan planta para endulzar. *Prensa Libre*.
- López, C. P. (2014). *Técnicas de Análisis Multivariante de Datos: Aplicaciones con SPSS®*. Plearson.

- Lyakhovkin, A. G., Tran, D. L., Titov, D. A., & Mai, P. A. (1993). *Cultivo y utilización de Stevia*. (Vietnam): Casa editorial agrícola.
- M, N. J. (2003). *Estudios morfoanatómicos y fisiológicos en la aclimatización de plantas in vitro de Dieffenbachia maculata Schott 'Sublime'*. Maracay-Venezuela: Tesis Doctoral Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía.
- M, R. F. (2007). *Comportamiento del cultivo de Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni en Cuba*. Cuba: Plant Med.
- M., T. Y. (1984). *Propagación clonal de Stevia rebaudiana Bertoni por el cultivo de puntas*. Japón: Informes de células de plantas.
- Manjarrez, A. T. (2000). *Fertilizante foliar, un respaldo importante en el crecimiento de las plantas*. Montecillo, Estado de México: Area de Fertilidad de Suelos. IRENAT, Colegio de Postgraduados.
- MARIA ANGÉLICA SANCLEMENTE, E. J. (2008). *Growth and Photosynthetic Efficiency of Ludwigia decurrens Walter (Onagraceae) Under Different Concentrations of Nitrogen*. Cali Colombia: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle.
- Molinas, S. (1989). *Fortuna Stevia del Paraguay S.R.L.: Promoción cultivo industrialización y comercialización de la Stevia rebaudiana Bertoni (ka" a he"e)*. Paraguay: Asunción, Paraguay.
- Monteiro, R. (2006). *Estudios cromosómicos em Stevia rebaudiana Serie Multiaristatae*. Brasil: Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Campinas, SP, Brazil.
- Mukundan, L. S. (2003). *In vitro culture studies on Stevia rebaudiana. In Vitro*. India: editor C. Chetsang.
- Murashige, T. a. (1962). *Un medio revisado para un crecimiento rápido y bioensayos con cultivos de tabaco*. *Physiol. Plant*.
- Noordin N, I. R. (2012). *Micropropagation of Stevia rebaudiana Bertoni through temporary immersion bioreactor system*. *South African Journal of Botany*.
- Osman M, S. N. (2013). *Factores que afectan a los microcortes de Stevia utilizando una caja de propagación de cámara de niebla*. Kuala Lumpur, Malaysia: Instituto de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Malaya.
- Osorio, C. B. (2007). *Stevia dulce sabor de tu vida*. Bogota Colombia.

- Paraguay, M. d. (1994). *Produccion de Ka'a he'e en Paraguay*. Paraguay: Luis Alberto Alvarez, Roberto Casaccia y Gerardo López.
- Paredes, J. J. (Julio 2012). *Guía para la construcción de Invernaderos o Fitotoldos*. Bolivia : FAO.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. España: Mundi-Prensa.
- Pinedo, F. (2000). *Propagación y conservación In Vitro de la Uña de Gato (Uncaria spp.)*. San Roque. Lima Perú: INIA-Experimental.
- PROCOMER. (14 de Octubre de 2014). *CentralAmericaData.com*. Obtenido de Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica: http://www.centralamericadata.com/es/article/home/Crece_consumo_de_endulzantes_naturales
- PROCOMER, P. d. (2014). Crece consumo de endulzantes naturales. *CentralAmericaData.com Informacion de Negocios*.
- Ramesh K., S. V. (2007). *Potencial de producción de Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni. Bajo sistemas de cultivo intercalado de productos de plantas naturales*. Palampur: Instituto de Tecnología de Biorresources del Himalaya.
- Riquelme, C. G. (1991). *Preacondicionamiento y aclimatación, en condiciones de invernáculo, de plántulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid*. Mexico: ΦYTON 52(1): 73-82.
- Rodríguez Margarita, J. M. (2008). *Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (Dioscorea alata L.)*. Venezuela: Interciencia.
- Ruiz, R. M. (1997). *Establecimiento del sistema de regeneración por embriogénesis somática de Azadirachta indica A. Juss*. Mexico: UACH.
- Sakaguchi, R., & Kan, T. (1982.). *Estudios japoneses sobre Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni & stevioside*. Brazil.
- Shahid Akbar, R. Z. (2014). *Selección del método de propagación adecuado para la producción consistente de plántulas en Stevia rebaudiana (Bertoni)*. Revista Saudita de Ciencias Biológicas Pakistán: Instituto Nuclear para la Alimentación y la Agricultura (NIFA).
- Sivaram L., M. U. (2003). *Estudios de cultivo in vitro sobre Stevia rebaudiana*. Malassia: Universidad Universitaria Twintech Internacional de Tecnología.
- Suárez E. I., S. A. (2008). *Propagación In Vitro de Stevia rebaudiana Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis*. Cordoba Argentina: Universidad de Córdoba, Universidad de Córdoba,.

- Tabiyed, D. B. (2006). *Investigation of glutathione, salicylic acid and GA, effects on brown ing in pistacia vera shoot tips culture*. Acta Horticulturae.
- Taware, A. D. (2010). *Estudios comparativos de plantas cultivadas in vitro e in vivo y callo de Stevia Rebaudiana (Bertoni)*. Aurangabal, India: Int. J. Integr. Biol.
- Thiyagarajan M, V. P. (2012). *Large scale in vitro propagation of Stevia rebaudiana (Bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb*. Industrial Crops and Products.
- Truffer, I. I. (2010). *LA INVESTIGACIÓN CUALITATIVA EN AGRONOMÍA*. Buenos Aires, Argentina: Facultad de Ciencias Agropecuarias UNER .
- USAC, U. d. (2011). *Manual de estadística descriptiva*. Guatemala: Facultad de Ingeniería, Área de Estadística.
- Valencia, J. (1996). *Gestión Local y Participación Comunitaria en el Mejoramiento de la prestación del Servicio de agua potable*. Instituto CINARA, universidad del Valle Colombia.
- Van Staden, J. C. (2006). *El estrés de las plantas in vitro: el papel de las fitohormonas* . Acta horticulturae.
- Végvari, G. (2001). *cambios morfológicos de las plantas de manzana in vitro durante la aclimatación*. Acta Horticulturae.
- Villegas, M. A. (2006). *Apuntes del curso de Propagación in vitro de frutales, Fruticultura. Recursos Genéticos y Productividad*. Montecillo, México.
- W., F. C. (1988). *Producción, mantenimiento y regeneración de plantas a partir de cultivos de suspensión de células de Stevia rebaudiana (Bert.)*. Bertoni. Célula vegetal.
- Wilmer, M. (2004). *Sondeo del Mercado de estevia*. Alexander Von Humboldt, Bogotá Colombia: Instituto de Investigación de Recursos biológicos .
- Woelwer-Rieck U, L. C. (2012). *Método de HPLC mejorado para la evaluación de los principales glicósidos de esteviol en hojas de Stevia rebaudiana*. Eur. Food Res Technol.
- ZAMARANO. (2003). *Enraizamiento in vitro y aclimatación de Stevia rebaudiana B.* HONDURAS: Esteban Marcelo Cifuentes Hidalgo.
- ZAMORANO. (2001). *Propagación in vitro de Stevia rebaudiana B. a partir de segmentos nodales*. En W. E. Báez. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana.

XV ANEXO

Figura 37 *Plantas madres de Stevia rebaudiana de tres meses de edad para la obtención de explantes para su micropropagación.*



Figura 38 *Uso de Cámara de flujo laminar para la esterilización de los explantes de Stevia*

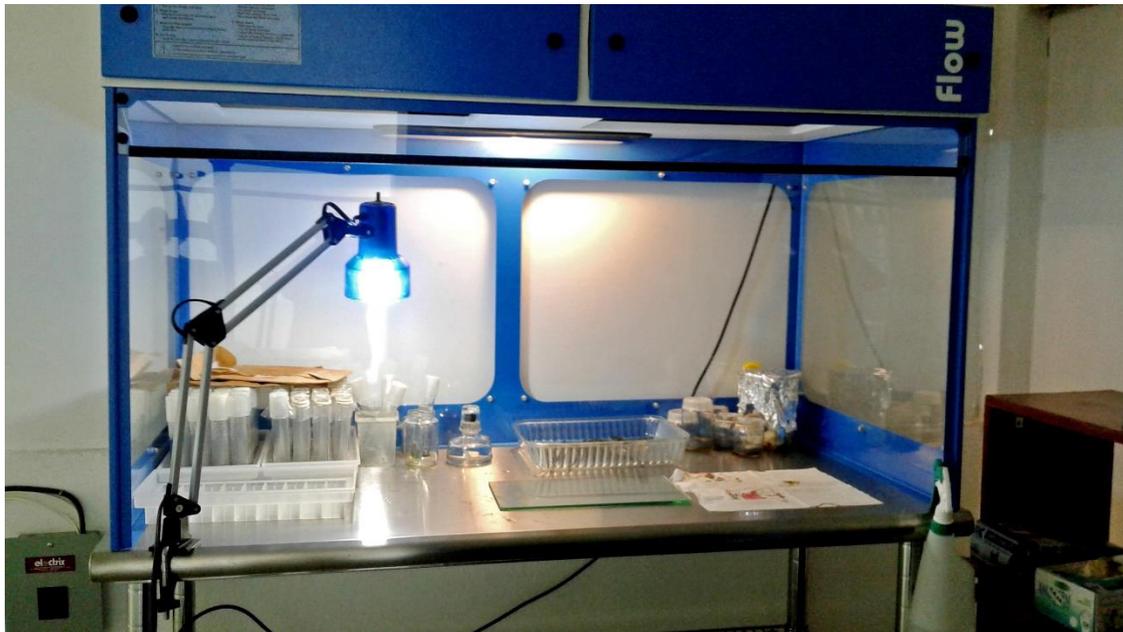


Figura 39 Cuarto de crecimiento de biotecnología vegetal, área de incubación de las microplantas de *Stevia rebaudiana*.



Figura 40 Materiales para el establecimiento del cultivo in vitro de *Stevia rebaudiana*.



Figura 41 Autoclave para la esterilización de los materiales y medio de cultivo MS.



Figura 42 *Traslado de las microplantas de Stevia rebaudiana en el cuarto de crecimiento para su incubación.*



Figura 43 *Crecimiento y desarrollo de las microplantas dentro del cuarto de crecimiento hasta los 45 días después de la siembra.*



Figura 44 Construcción del invernadero para la adaptación y aclimatación de las microplantas del cultivo de *Stevia rebaudiana*



Figura 45 Registro de temperatura y humedad relativa dentro del sistema de adaptación y aclimatación de las vitroplantas de *Stevia rebaudiana*.

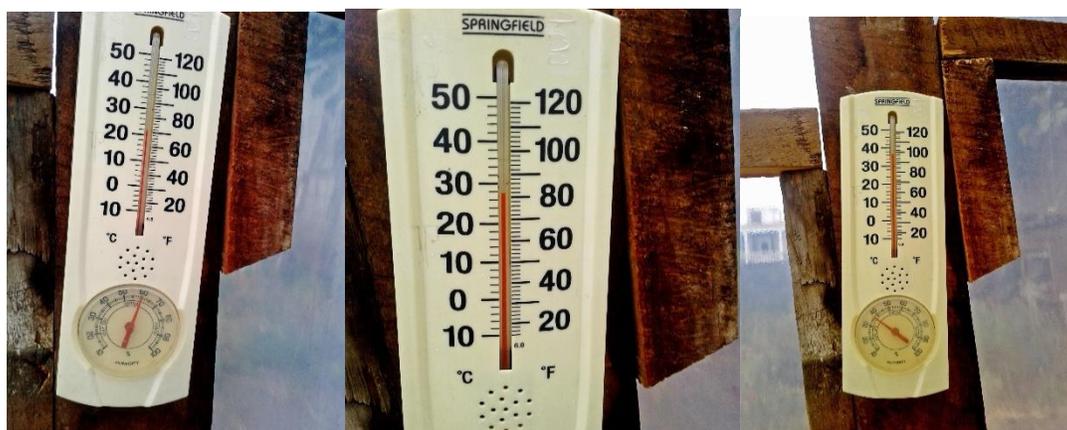


Figura 46 *Altura de las microplantas al momento del traspaso de la siembra al invernadero*



Figura 47 *Crecimiento de las vitroplantas de Stevia a los 15 días después de la siembra,*



Figura 48 *Mantenimiento de las vitroplantas de Stevia rebaudiana dentro del invernadero*



Figura 49 *Crecimiento de las vitroplantas de Stevia a los 60 días después de la siembra dentro del macrotúnel.*



XVI GLOSARIO DE TERMINOS

ácido 3-indolbutírico: AIB, Se lo considera un regulador del crecimiento vegetal de la familia de las auxinas.

aclimatación: adaptación de un organismo vivo a un cambio medioambiental que le somete a un estrés fisiológico. No debe confundirse con adaptación.

Adaptación: Ajuste de una población durante generaciones a cambios medioambientales asociado a los cambios genéticos que resultan de la selección impuesta por el propio cambio ambiental. no puede confundirse con aclimatación.

Aquenio: Fruto seco, indehisciente, de una sola semilla, con el pericarpio no soldado a ella.

Autoclave: Aparato para esterilizar por vapor que consiste en un recipiente cilíndrico, de paredes resistentes.

Auxina: son un grupo de fitohormonas que actúan como reguladoras del crecimiento vegetal. Esencialmente provocan la elongación de las células.

BAP: Bencilaminopurina, Es un regulador de crecimiento de las plantas de la clase de las citoquininas.

Camara de Flujo Laminar: Espacio donde se realiza las operaciones de inoculación. Suele contar con un dispositivo que hace circular una corriente de aire esteril que

arrastra los contaminantes fuera del área de trabajo,

Citocinina: Son hormonas fundamentales en el proceso de organogénesis en las plantas y en la regulación de diversos procesos fisiológicos como fotosíntesis, regulación del crecimiento.

Diabetes: Un grupo de enfermedades que tiene como resultado un exceso de azúcar en la sangre (glucosa sanguínea elevada).

Ecotipo: Forma genéticamente diferenciada de una especie que vive en un hábitat o ecosistema determinados.

Ex vitro: Organismo extraído de un cultivo de Tejido y trasplantado al suelo o maceta

Explanto: Fragmento de una planta que se escinde y se prepara de forma aseptica para su cultivo en un medio nutritivo,

FeNa EDTA: Se trata de un tipo de quelato estable de metal soluble en agua con oxidabilidad, ferrum existido en un estado de quelato.

Glucosa: Es un carbohidrato o glúcido que está relacionada con la cantidad de azúcar que el organismo es capaz de absorber a partir de los alimentos y transformar en energía para realizar diferentes funciones o simplemente ayudar a mantener el cuerpo caliente.

Glucósido: Son compuestos que por descomposición hidrolítica dan glucosa y otra u otras sustancias.,

HCl: Acido Clorhídrico, Se emplea comúnmente como reactivo químico y se trata de un ácido fuerte que se disocia completamente en disolución acuosa.

KOH Hidroxido de Potacio: La mayoría de las aplicaciones explotan la reactividad con ácidos y la corrosividad natural.

Medio de cultivo: gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas.

Micropropagación: Práctica que consiste en multiplicar rápidamente y/o regenerar materia vegetal para producir una gran cantidad de nuevas plantas genéticamente idénticas, con métodos de laboratorio modernos.

Multicaule: Que tiene varios troncos o tallos principales

Protandria: Maduración de las gónadas masculinas antes que las gónadas femeninas en organismos hermafroditas.

Pubescente: Cualquier órgano vegetal que tiene pelo suave, fino y no muy largo., 6

Rebaudiosido A: es un glucósido de esteviol doscientas veces más dulce que el azúcar, su perfil dulce es diferente al de la sacarosa; la sensación dulce ocurre más tarde y es más persistente,

Steviósido: es uno de los azúcares obtenidos naturalmente de Stevia rebaudiana no aumenta la concentración de glucosa en sangre (lo que lo hace apto para diabéticos). Por este motivo se utiliza como endulzante no calórico. Es entre 250–300 veces más dulces que la sacarosa.

Tween 20: usado como detergente y emulsionante en numerosas aplicaciones domésticas, científicas, alimentarias, industriales y farmacológicas,

Variabilidad fenotípica: son aquellas particularidades visibles en los organismos, es decir, la sumatoria de todas las características observables de un individuo y que son el resultado de la interacción entre genotipo y el ambiente.

Variabilidad genética: se refiere a la variación en el material genético de una población o especie, e incluye los genomas. Para que la selección natural pueda actuar sobre un carácter, debe haber algo que seleccionar, es decir, varios alelos para el gen que codifica ese carácter.