

Enraizamiento *in vitro* y aclimatación de *Stevia rebaudiana* B.

Esteban Marcelo Cifuentes Hidalgo

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Diciembre, 2003

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Enraizamiento *in vitro* y aclimatación de *Stevia rebaudiana* B.

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero
Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura

Por:

Esteban Marcelo Cifuentes Hidalgo

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2003

Enraizamiento *in vitro* y aclimatación de *Stevia rebaudiana* B.

Presentado por:

Esteban Marcelo Cifuentes Hidalgo

Aprobada:

Dinie E. de Rueda, M. Sc.
Asesor Principal

Alfredo Rueda, Ph.D.
Coordinador de Area Temática

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

Jorge Iván Restrepo, MBA
Coordinador de la Carrera de
Ciencia y Producción Agropecuaria

Antonio Flores, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos del autor.

Esteban Marcelo Cifuentes Hidalgo

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2003

DEDICATORIA

A mis padres Marcelo y Magdalena por todo el amor y apoyo que me han brindado, por el sacrificio que han hecho para poder hacer realidad este logro.

A mis hermanas María Fernanda y Daniela por toda la paciencia, el cariño y la felicidad que me han regalado, lo que me ha impulsado a seguir adelante para alcanzar mis metas.

A mi novia Ellen por el infinito amor que me has dado, por la paciencia y el apoyo incondicional de cada día.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, fuente de luz, Fe y esperanza sin el cual nada de esto hubiera sido posible.

A mis padres Marcelo y Magdalena, por el apoyo, la comprensión y la confianza que me han tenido, y por el esfuerzo y sacrificio que hicieron en este tiempo.

A mis hermanas María Fernanda y Daniela, por brindarme la alegría que siempre necesité en tiempos difíciles, y por la ternura y calidez que me supieron dar incondicionalmente.

A mi novia Ellen, por estar a mi lado en todo momento, por el amor, el apoyo y la paciencia que siempre me has dado.

A mi tía Mónica por el apoyo tanto económico como moral, y el gran cariño que me ha demostrado.

A mis abuelitos Blanca y Lizardo por la preocupación, las plegarias y el cariño inmenso que me ayudaron en cada paso de mi carrera.

A Dinie de Rueda por la dedicación y la paciencia que me tuvo durante la realización de este estudio.

Al Doctor Raúl Espinal por la paciencia y ayuda brindada para la culminación de este estudio.

A mis grandes amigos: Sebastián, Cristina, Renato y Fernando; por la ayuda, la preocupación y el cariño que me han dado siempre.

A Antonina Castillo, Guillermo Cueva y sus hijos: Erna, Guillermo y Olga, por el cariño, la preocupación de padres y el calor familiar que me supieron brindar durante mi vida de estudios en Honduras.

A mis buenas amigas Erika, Zoila y Roxana, por el apoyo, la nobleza, el cariño y los consejos que siempre me supieron dar en todo momento.

A Byron y Luwbia, por la paciencia y la disposición que siempre tuvieron en ayudarme para culminar este estudio.

RESUMEN

Cifuentes, E. 2003-01-28. Enraizamiento *in vitro* y aclimatación de *Stevia rebaudiana* B. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 48 p.

La *Stevia rebaudiana* es originaria del noroccidente del Paraguay, es apreciada por el poder edulcorante de sus hojas que es 300 veces mayor que el de la sacarosa. No ha sido posible conseguir una plantación vigorosa y uniforme debido a la pequeñez de su semilla, la alta mortalidad de las plántulas en la germinación y la limitada capacidad de sobrevivencia en ambientes anegados. Estas desventajas pueden ser contrarestadas con la propagación *in vitro* como alternativa de producción. El objetivo fue establecer un protocolo para la etapa de enraizamiento *in vitro* y la aclimatación de vitroplantas del cultivo. En la etapa de enraizamiento *in vitro* se evaluó el tipo de auxina (ANA, AIA y AIB) y el nivel de auxina (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L). El mayor número y calidad de raíces se obtuvo con 0.5 mg/L de ANA a los 15 días después de su inducción. En la etapa de aclimatación se evaluaron en el primer experimento seis sustratos: a) 100% Promix[®], b) 75% Promix[®] 25% arena, c) 50% Promix[®] 50% arena, d) 25% Promix[®] 75% arena, e) bocashi+suelo+arena (1:2:1) y f) compost+arena+suelo (1:1:1) en tres sistemas de manejo de humedad (cámaras plásticas, nebulizado y microtúneles) y dos tipos de contenedores (bolsas plásticas y bandejas multiceldas). En el segundo experimento se evaluaron los mismos seis sustratos bajo un sistema de microinvernadero. Los mejores promedios de alturas y número de plantas aclimatadas se obtuvo usando microtúneles en bolsas plásticas para el primer experimento y utilizando un sustrato de 50% Promix y 50% Arena para el segundo. Es recomendable analizar los costos de producción clonal de *Stevia* y ampliar evaluaciones con otras auxinas para la etapa de enraizamiento y otro tipo de sustratos para la etapa de aclimatación.

Palabras claves: Aclimatación, cultivo de tejidos, edulcorante natural, enraizamiento, micropropagación.

CONTENIDO

Portadilla.....	ii
Página de firmas.....	iii
Autoría.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Resumen.....	vii
Contenido.....	ix
Indice de cuadros.....	xi
Indice de figuras.....	xii
Indice de anexos.....	xiii
Abreviaturas utilizadas.....	xvi
 1. INTRODUCCION.....	 1
1.1 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.....	3
1.2 OBJETIVOS.....	3
1.2.1 Generales.....	3
1.2.2 Específicos.....	3
 2. REVISION DE LITERATURA.....	 5
2.1 CONDICIONES AGROECOLOGICAS.....	5
2.2 PROPAGACION <i>IN VITRO</i>	5
2.2.1 Etapa III. Pre-transplante o enraizamiento <i>in vitro</i>	6
2.2.2 Etapa IV. Transplante, aclimatación y/o enraizamiento <i>in vivo</i>	7
2.2.2.1 La cutícula.....	7
2.2.2.2 Los estomas.....	7
2.2.2.3 Fotosíntesis.....	8
2.2.2.4 Las raíces.....	8
2.2.2.5 Intensidad lumínica.....	8
2.2.2.6 Temperatura.....	8
 3. MATERIALES Y METODOS.....	 9
3.1 UBICACION.....	9
3.2 CARACTERISTICAS DEL AREA DE ESTUDIO.....	9
3.3 DURACION.....	9
3.4 EXPERIMENTO 1. ETAPA III. PRE-TRANSPLANTE O ENRAIZAMIENTO <i>IN VITRO</i>	8
3.4.1 Proceso de elaboración del medio de cultivo.....	12

3.4.2	Siembra e incubación <i>in vitro</i>	12
3.4.3	Toma de datos.....	12
3.4.4	Análisis estadístico.....	13
3.5	EXPERIMENTO 2. ETAPA IV. USO DE CAMARAS PLASTICAS, RIEGO POR NEBULIZACION Y MICROTUNELES PARA LA ACLIMATACION DE <i>Stevia rebaudiana</i> EN INVERNADERO.....	13
3.5.1	Construcción de microtúneles.....	16
3.5.2	Cámaras plásticas.....	19
3.5.3	Sistema de riego por nebulización.....	19
3.5.4	Toma de datos.....	19
3.5.5	Análisis estadístico.....	19
3.6	EXPERIMENTO 3. ETAPA IV. USO DE MICROINVERNADEROS PARA LA ACLIMATACION DE <i>Stevia rebaudiana</i> EN INVERNADERO.....	20
3.6.1	Construcción de microinvernadero.....	20
3.7	PREPARACION Y PASTEURIZACION DE SUBSTRATOS.....	21
3.8	PROCEDIMIENTO UTILIZADO PARA LA TRANSFERENCIA DE VITROPLANTAS DE LA ETAPA III A LA ETAPA IV.....	22
3.9	TOMA DE DATOS.....	22
3.10.	ANALISIS ESTADISTICO.....	22
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	23
4.1	EXPERIMENTO 1. ETAPA II. PRETRANSPLANTE O ENRAIZAMIENTO <i>IN VITRO</i>	23
4.1.1	Días a formación de raíces (DFR).....	23
4.1.2	Porcentaje de vitroplantas enraizadas (PVE).....	24
4.1.3	Número de contenedores contaminados y tipo de contaminación.....	25
4.1.4	Respuesta morfogénica por tratamiento.....	25
4.2	ETAPA IV. ACLIMATACION EN INVERNADERO.....	26
4.2.1	EXPERIMENTO 2. ETAPA IV. USO DE MICROTUNELES, CAMARAS PLASTICAS Y RIEGO POR NEBULIZACION PARA LA ACLIMATACION DE <i>Stevia rebaudiana</i> EN INVERNADERO.....	26
4.2.1.1	Porcentaje promedio de sobrevivencia (PPS).....	26
4.2.1.2	Altura promedio de vitroplantas (APV).....	29
4.2.2	EXPERIMENTO 3. ETAPA IV. USO DE MICROINVERNADERO PARA LA ACLIMATACION DE <i>Stevia rebaudiana</i> EN INVERNADERO.....	30
4.2.2.1	Porcentaje promedio de sobrevivencia (PPS).....	30
4.2.2.2	Altura de plantas	31
5.	CONCLUSIONES.....	33
6.	RECOMENDACIONES.....	34

7.	BIBLIOGRAFIA.....	36
8.	ANEXOS.....	38

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1	Composición del medio nutritivo Murashige y Skoog con 100% de macronutrientes utilizado para el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.....	10
2	Tipo y niveles de auxina utilizados para evaluar el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.....	11
3	Evaluación de sistemas de manejo de humedad, sustrato y tipo de contenedor para la aclimatación (etapa IV) de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> . (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	15
4	Evaluación de sustratos bajo un sistema de microinvernadero para la aclimatación (etapa IV) de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> . (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.....	20
5	Efecto del tipo y nivel de auxina en el número de días a formación de raíces (DFR) y en el tipo de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.....	23
6	Efecto del tipo y nivel de auxina en el número de plantas enraizadas y el tipo de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.....	25
7	Efecto del sistema de aclimatación en la altura durante la aclimatación vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	30
8	Efecto del tipo de sustrato utilizado bajo un sistema de microinvernaderos en la altura promedio de vitroplantas (APV) durante la aclimatación de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.....	32

INDICE DE FIGURAS

Figura

1	Esquema del proceso de aplicación de bromuro de metilo para la esterilización de camas en el sistema de microtúneles para la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	17
2	Proceso de construcción de microtúneles para la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	18
3	Distribución de sustratos en bandejas multiceldas para su evaluación durante el proceso de aclimatación de <i>Stevia rebaudiana</i> . Zamorano, Honduras, 2002.....	21
4	Efecto del sistema de microtúneles en el porcentaje de sobrevivencia durante la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	27
5	Efecto del sistema de nebulización en el porcentaje de sobrevivencia durante la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	28
6	Efecto del sistema de manejo de humedad y tipo de contenedor utilizado en el porcentaje promedio de sobrevivencia (PPS) durante la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	29
7	Efecto del tipo de sustrato en la altura de vitroplantas (APV) durante la aclimatación de <i>Stevia rebaudiana</i> en bandejas múltiples bajo un sistema de microinvernadero (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.....	31

INDICE DE ANEXOS

Anexo

1	Sistema de cámaras plásticas utilizadas para la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	39
2	Sistema de nebulización utilizado para la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	39
3	Sistema de microtúneles utilizado para la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	40
4	Sistema de microinvernadero utilizado para la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.....	40
5	Metodología utilizada para la construcción de microinvernaderos utilizados para la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.....	41
6	Resultado de análisis de los substratos utilizados en la etapa IV de aclimatación de <i>Stevia rebaudiana</i> . Zamorano, Honduras, 2002.....	42
7	Efecto del tipo y nivel de auxina en el número de días a formación de raíces (DFR) durante el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.....	42
8	Rizogénesis de <i>Stevia rebaudiana</i> obtenidas a un nivel de 0.5 mg/l de ANA a los 15 días después de haber sido inducidas durante la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.....	43

9	Efecto del tipo y nivel de auxina en el porcentaje de vitroplantas enraizadas (PVE) de <i>Stevia rebaudiana</i> durante la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.....	43
10	Efecto del tipo y nivel de auxina en el número de plantas enraizadas de <i>Stevia rebaudiana</i> durante la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.....	44
11	Callogénesis observada en los tratamientos ausentes de auxinas ó con niveles de 0.5 mg/l de AIA en el medio nutritivo utilizado durante la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.....	44
12	Efecto del sistema de humedad y tipo de contenedor utilizado en el porcentaje promedio de vitroplantas sobrevivientes (PPS) durante la aclimatación de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	45
13	Efecto individual del sistema de humedad en la altura promedio de vitroplantas (APV) durante la aclimatación de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	45
14	Efecto del sistema de microtúneles utilizando bolsas plásticas, en la altura promedio de vitroplantas (APV) durante la aclimatación de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	46
15	Pudrición de plantas observada bajo un sistema de nebulización en bolsas plásticas durante la aclimatación de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.....	46
16	Efecto del tipo de sustrato en el porcentaje promedio de sobrevivencia (PPS) durante la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> utilizando bandejas multiceldas bajo un sistema de microinvernaderos (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.....	47
17	Resumen de datos del Experimento 3 que influenció el porcentaje promedio de sobrevivencia (PPS) durante la aclimatación de <i>Stevia rebaudiana</i> . Zamorano. Honduras, 2002.....	47

18	Compactación observada en el sustrato de Compost, Arena y Suelo (1:1:1) en bolsas plásticas bajo un sistema de microtúneles durante la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.....	48
19	Compactación observada en el sustrato de Bocashi, Arena y Suelo (1:2:1) en bandejas multiceldas bajo un sistema de microinvernadero durante la aclimatación de vitroplantas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.....	49

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AIA	Acido 3-indoleacético
AIB	Acido 3-indolebutírico
ANA	Acido a-nalftalenacético
DFR	Días a formación de raíces
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
MS	Murashige y Skoog
Mg/l	Miligramos por litro
NA	Nivel de auxina
NVE	Número de vitroplantas enraizadas
TA	Tipo de auxina

1. INTRODUCCION

El Ká a he´e, *Stevia rebaudiana* (Bertoni) es una especie nativa de la zona nororiental del Paraguay, que ha sido usada desde época inmemorial como edulcorante por los nativos de la región. La tecnología relacionada con el cultivo ha evolucionado notablemente desde su descubrimiento, identificación taxonómica y los trabajos realizados por el Agrónomo Juan Aranda y su esposa Vera Bertoni (Ministerio de Agricultura y Ganadería, Paraguay, 1994).

El preciado valor de la Stevia se debe al poder edulcorante de sus hojas, que es 300 veces mayor que el de la sacarosa. Su compuesto principal denominado “steviósido” es usado como sustituto del azúcar para la elaboración de dietas nutricionales y preparaciones farmacéuticas sin incurrir en desórdenes metabólicos (Lyakhovkin *et al.*, 1993).

El establecimiento de una plantación vigorosa y uniforme, esencial para la extracción del edulcorante, no ha sido posible por medio de la reproducción sexual de plantas debido a la pequeñez de la semilla, la alta mortalidad de las plántulas en la germinación (Carneiro *et al.*, 1997) y a la limitada capacidad de sobrevivencia en ambientes de extrema humedad (Lyakhovkin *et al.*, 1993).

Por tratarse de una planta de polinización cruzada (alógama), las plantaciones naturales presentan una alta variabilidad fenotípica (apariencia) y genotípica. Un alto rendimiento del edulcorante solo es posible si existe abundante material vegetal con alto porcentaje de edulcorante inherente en cada planta, por lo que dicha variabilidad afecta la cantidad de steviósido a extraerse.

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 (Ministerio de Agricultura y Ganadería, Paraguay, 1994).

Actualmente en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Zamorano se ha desarrollado ya un protocolo de reproducción *in vitro* de Stevia que incluye las etapas de establecimiento, siembra e incubación *in vitro* hasta la etapa de multiplicación, en la cual se han obtenido tasas de multiplicación de 4 en el primer subcultivo y de 6 a 8 en el segundo y tercer subcultivo, respectivamente. Mediante este protocolo desarrollado en los laboratorios de Zamorano es posible producir 216 plantas por explante en un periodo de tres meses y medio (105 días) aproximadamente.

Sin embargo, según Delvalle, (2001) el enraizamiento *in vitro* presenta, al igual que la aclimatación de las vitroplantas, uno de los principales problemas de la micropropagación de Stevia. Se ha observado que el cultivo presenta pobres respuestas a los tratamientos hormonales hasta hoy realizados para el enraizamiento *in vitro*, además de la falta de un método estandar y óptimo para su aclimatación comercial.

Importancia del estudio

- El cultivo es de alto interés económico y se presenta como una alternativa de diversificación para Honduras debido a las condiciones favorables que ofrece su ubicación tanto para su producción como para su exportación.
- Se buscará una alternativa para la formación de raíces *in vitro* y la aclimatación de vitroplantas, con el fin de obtener una producción comercial de plantas para proveer a los productores interesados.
- La elaboración de un protocolo adecuado para el enraizamiento *in vitro* de la Stevia servirá como base para posteriores estudios de investigación relacionados con su micropropagación.
- El desarrollo de un método adecuado para la aclimatación de Stevia ayudará a la producción comercial de este cultivo.

1.2 Objetivos

1.2.1 Generales

- Elaborar un protocolo para la etapa de enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.
- Evaluar y definir un método específico para el proceso de aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana*.

1.2.2 Específicos

- Evaluar el tipo de auxina más adecuado para la etapa de enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.
- Evaluar los niveles óptimos de auxina para el enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.
- Encontrar el mejor sistema para el manejo de la humedad en la etapa de aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana*.

- Evaluar el substrato más adecuado para la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana*.
- Evaluar el tipo de contenedor más adecuado para la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana*.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Condiciones agroecológicas

La Stevia es una planta tropical que puede crecer en óptimas condiciones en climas templados; de comportamiento fotosensible y capaz de florecer varias veces a lo largo del año. Sin embargo, su crecimiento puede ser afectado en suelos pesados con más de un 85% de humedad (Lyakhovkin *et al.*, 1993).

Su fecundación cruzada promueve una amplia diversidad fenotípica y genotípica que ha sido aprovechada por algunos fitomejoradores para la obtención de plantas altamente productivas y homogéneas necesarias para la extracción de cantidades comerciales de edulcorante (Ministerio de Agricultura y Ganadería, Paraguay, 1994). La siembra directa no es recomendada debido a la rápida pérdida de la viabilidad y la pequeñez de las semillas que causan una alta mortalidad de las plántulas (Carneiro *et al.*, 1997).

2.2 Propagación *in vitro*

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 (Lyakhovhin *et al.*, 1993).

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, 1994).

Según el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA, 1996), en los sistemas de micropropagación vegetal se conocen 5 etapas secuenciales:

Etapas 0. Selección y preparación de la planta madre

Etapas I. Establecimiento o iniciación del cultivo *in vitro*

Etapas II. Multiplicación e inducción de brotación

Etapas III. Pre-transplante o enraizamiento *in vitro* y

Etapas IV. Transplante, aclimatación y/o enraizamiento *In vivo*

Para este trabajo de investigación se trabajará en las dos últimas etapas, mismas que se detallan a continuación:

2.2.1 Etapa III. Pre-transplante o enraizamiento *in vitro*

En esta etapa las vitroplantas son preparadas en el laboratorio para ser transplantadas a su ambiente natural en el invernadero y posteriormente al campo si es que así se requiere. Para el enraizamiento *in vitro* se hace uso de algunos “reguladores de crecimiento”, definidas por Pierik (1990) como un grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas), que producen elongación y división celular, promueven o inhiben la aparición de raíces adventicias y/o de yemas adventicias (en los vástagos). Estas hormonas se encuentran presentes y activas en pequeñas cantidades y se las pueden clasificar en:

- Auxinas
- Citoquininas
- Giberelinas y
- Etileno

Para este trabajo de investigación se hizo uso de tres tipos de auxinas: el Acido 3-Indoleacético (AIA), considerada una auxina débil que se produce en forma natural en las plantas, y dos auxinas sintéticas fuertes: El Acido α -Naftaleneacético (ANA) y el Acido 3-Indolebutírico (AIB). Las auxinas inducen la formación de raíces adventicias y un desenvolvimiento de yemas axilares cuando se añaden a un medio de cultivo a bajas concentraciones (p.e. ANA a razón de 1 mg/l) (Esquibel y Lua, 1991) e inducen la formación de callo cuando se agregan a altas concentraciones (p.e. AIA a razón de 5 mg/l) (Pierik, 1990).

En la etapa III de enraizamiento *in vitro* la mayoría de las especies son expuestas a un ambiente de reducido nivel de carbohidratos, bajos niveles de macrosales y altos niveles de luz, como se ha reportado para el cultivo *in vitro* de algunos cultivares de rosas (Burgarín y Lozoya, 1992), y de *Gerbera jamesonii* (Andrade *et al.*, 2000), obteniéndose los mejores resultados al utilizar el 50% de las sales minerales de Murashige y Skoog (MS). Para las distintas etapas de la micropropagación, dependiendo de la especie y del cultivar, puede existir variaciones tanto en el tipo y niveles de auxinas como en los demás componentes de los medios de cultivo (Pierik, 1990).

En el caso de la Stevia, Delvalle (2001) utilizando un medio sólido basal MS con 100% de macroelementos y la adición de 0.1 mg/l de AIB, obtuvo aproximadamente un 20% de vitroplantas enraizadas, 40% de vitroplantas con callo y 40% de las vitroplantas no formó callos ni raíces. Lyakhovkin *et al.* (1993) sugieren para la etapa de enraizamiento *in vitro*, la utilización de un medio líquido basal MS con 100% de macroelementos y 0.05 mg/l de ANA, ó un medio sólido basal MS con 100% de macroelementos y 0.2 mg/l de ANA.

Con estos tratamientos se obtuvieron igualmente datos poco significativos en sus tratamientos lo que indica la dificultad existente para el enraizamiento *in vitro* de *Stevia* y justificando a la vez la importancia del presente estudio para encontrar un protocolo adecuado para dicha fase.

2.2.2 Etapa IV. Transplante, aclimatación y/o enraizamiento *in vivo*

El transplante 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 (Hartman y Kester, 1997). El éxito de esta etapa radica en el cuidado que se tenga controlando la susceptibilidad de las vitroplantas a la deshidratación (Espinal-Rueda, 2002), ya que a pesar de que se tengan condiciones controladas de temperatura, luminosidad y humedad, se puede obtener pérdidas muy cuantiosas (Borys *et al.*, 1995).

La duración de esta etapa depende principalmente de la rusticidad de las especies pero en general es de 45 a 60 días aproximadamente (Hartman y Kester, 1997).

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 transplante (Pierik y Van de Pol, 1995)

2.2.2.1 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).

2.2.2.2 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).

2.2.2.3 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).

2.2.2.4 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. Es aconsejable estimular la producción de pelos radicales *in vitro* lo que puede ser logrado algunas veces exponiendo las raíces en un medio líquido, mediante el uso de hormonas de crecimiento y la alternancia de períodos de luz y oscuridad como en el caso del cultivo *in vitro* de *Prunus salicina* (Magalhães y Peters, 1991). Un pobre desarrollo radical *in vitro* hace muy difícil el posterior crecimiento y desarrollo *in vivo*, especialmente cuando hay una elevada transpiración (Pierik, 1990).

2.2.2.5 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.

2.2.2.6 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 *et al.*, 1993).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación

La etapa III de enraizamiento *in vitro* se realizó en el área del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación (LCTM) de Zamorano, Honduras. Para la etapa IV de aclimatación se utilizaron conjuntamente dos de los invernaderos de aclimatación del mismo laboratorio, además de un sombreadero del área de Propagación de Plantas pertenecientes a la Zamoempresa de Cultivos Intensivos (ZECI), Zamorano, Honduras.

3.2 Características del área de estudio

El estudio estuvo ubicado a 30 km al oeste de Tegucigalpa a una altura de 800 msnm, una temperatura media anual de 24°C y una intensidad lumínica que varía entre 7000-10000 pies candela.

3.3 Duración

El ensayo se realizó en el período comprendido entre abril de 2001 y enero de 2002.

3.4 Experimento 1. Etapa III. Pre-transplante o enraizamiento *in vitro*

Se utilizaron 450 vitroplantas en la fase final del subcultivo cinco (S₅) de la etapa de multiplicación (Etapa II) producidas a partir de segmentos nodales. Las vitroplantas utilizadas fueron homogéneas en cuanto a tamaño, grosor del tallo y edad con el fin de disminuir la variabilidad de respuesta a enraizamiento en el ensayo. El medio basal utilizado fue el de Murashige y Skoog (MS) (Cuadro 1) que incluyó 100% de macroelementos, microelementos y hierro, tres tipos de auxina (AIA, AIB y ANA) y cinco concentraciones para cada tipo de auxina (0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l), para un total de 15 tratamientos (Cuadro 2). Cada tratamiento consistió en tres réplicas y cada réplica tuvo un total de diez unidades experimentales (UE's) para el total de 450 UE's.

Cuadro 1. Composición del medio nutritivo Murashige y Skoog con 100% de macroelementos utilizado para el enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

Componente	Cantidades (mg/l)
Macroelementos 100% MS	
NH ₄ NO ₃	1,650.000
KNO ₃	1,900.000
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440.000
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.000
KH ₂ PO ₄	170.000
Microelementos 100% MS	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.600
H ₃ BO ₃	6.200
KCl	0.830
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
FeNa EDTA	50.000
Azúcar-alcohol	
M-Inositol	100.000
Vitaminas	
Acido Nicotínico	0.500
Piridoxina	0.500
Tiamina	0.400
Azúcares	
Sacarosa	35,000.000
Agente gelatinizador	
Phytigel	2,500.000
pH = 5.8	

Fuente: Pierik (1990), adaptado por Delvalle (2001).

Cuadro 2. Tipo y niveles de auxina utilizados para evaluar el enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.

Número de Tratamiento	Tipo de Auxina [€]	Nivel de Auxina (mg/l)
1	AIA	0.0
2		0.5
3		1.0
4		1.5
5		2.0
6	AIB	0.0
7		0.5
8		1.0
9		1.5
10		2.0
11	ANA	0.0
12		0.5
13		1.0
14		1.5
15		2.0

[€]AIA= ácido 3-indoleacético, AIB= ácido 3-indolebutírico, ANA= ácido α -naftaleneacético.

3.4.1 Proceso de elaboración del medio de cultivo

En un beaker de vidrio de 1000 ml se colocó aproximadamente la mitad del volumen de agua destilada del total final de volumen de medio de cultivo deseado. A continuación se agregaron los macroelementos, el Acido Etilendiamino Tetracético (EDTA FeNa), los microelementos, las vitaminas y la sacarosa en las cantidades recomendadas, manteniendo la mezcla en agitación constante con el fin de disolver completamente todos los componentes. Finalmente se aforó al volumen final deseado en frascos volumétricos.

Para el enraizamiento *in vitro* del cultivo se prepararon 9 litros de medio, los mismos se dividieron en porciones de 600 ml para cada uno de los 15 tratamientos. A estos beakers se les agregó la dosis correspondiente de reguladores de crecimiento según el Cuadro 2. El pH fue ajustado a 5.8 utilizando soluciones de HCl y KOH. Seguidamente se añadió Phytigel a razón de 2.3 g/l a todos los tratamientos y se procedió a calentar el medio nutritivo en un microondas para disolver el agente gelatinizador. Una vez disuelto el agente gelatinizador, el medio fue dispensado en tubos de ensayo (25×150 mm) a razón de 10 ml por contenedor. Los tubos fueron tapados y esterilizados en un autoclave por 20 minutos, a una temperatura de 120 °C y 15 psi de presión.

3.4.2 Siembra e incubación *in vitro*

Se sembró una réplica de cada tratamiento por día (150 tubos/día), durante tres días. Considerando que se realizó un diseño estadístico de Bloques Completos al Azar, los bloques se hicieron por día de siembra ya que la cantidad de tratamientos dificultó efectuar la siembra en un solo día. Se utilizó una vitroplanta por cada tubo de ensayo.

3.4.3 Toma de datos

Se realizó revisión de contaminados y oxidación al quinto día y luego cada ocho días. Los explantes contaminados ya sea por hongos y/o bacterias y los que presentaron necrosis severa fueron sacados del cuarto de crecimiento para prevenir la contaminación cruzada hacia el resto de tubos no contaminados.

La observación de las variables de interés se realizó 15 días después de la siembra. Estos datos fueron cuantificados individualmente para cada vitroplanta en cada tubo de ensayo. Las variables a considerar se detallan a continuación:

- ❖ Días a Formación de Raíces (DFR)
- ❖ Porcentaje de Vitroplantas Enraizadas (PVE)
- ❖ Respuesta morfogénica por tratamiento, misma que fue categorizada de la siguiente manera:

- 0: no enraizamiento.
- 1: formación de callo.
- 2: raíces entre 1-3 mm
- 3: raíces entre 3-10 mm.
- 4: raíces mayores de 10 mm.

- ❖ Número de contenedores contaminados y tipo de contaminación

3.4.4 Análisis estadístico

Para la etapa III de enraizamiento *in vitro* los tratamientos fueron ordenados en un arreglo factorial con un diseño de bloques completos al azar. Se usó además una correlación entre los Días a Formación de Raíces (DFR) y el número de plantas enraizadas por cada tipo de auxina utilizada para encontrar inferencia estadística entre ellas. Los datos fueron analizados con el programa estadístico “Statistical Analysis System” versión 8.0 (SAS®, 1999). Se realizó Análisis de Varianza (ANDEVA) con los resultados de las dos etapas para determinar si los tratamientos influyeron sobre las variables de interés. Luego se realizó una separación de medias con el método “Student-Newman-Keuls” (SNK) y el comando LSMEANS para identificar los mejores tratamientos.

3.5 Experimento 2. Etapa IV. Uso de cámaras plásticas, riego por nebulización y microtúneles para la aclimatación de *Stevia rebaudiana* en invernadero

Se transplantaron al invernadero 1080 vitroplantas de *Stevia* que estaban ya al final de la etapa III en laboratorio y que tuvieran sus raíces bien formadas con el fin de encontrar el método óptimo de aclimatación (etapa IV). En el segundo experimento de este estudio se evaluó este total de vitroplantas en seis sustratos, con tres sistemas de manejo de humedad y dos tipos de contenedores para un total de 36 tratamientos.

Los sistemas evaluados durante la etapa de aclimatación fueron:

- Cámaras plásticas (Anexo 1)
- Sistema de nebulización (Anexo 2)
- Microtúneles (Anexo 3)

Los substratos evaluados fueron seis:

1. Arena (A), compost (Co) y suelo (Sue) en una proporción de 2:1:1
2. Arena (A), bocashi (Bo) y suelo (Sue) en una proporción de 1:1:1
3. 100% Promix (P) con 0% Arena (A)
4. 75% Promix (P) con 25% Arena (A)
5. 50% Promix (P) con 50% Arena (A)
6. 25% Promix (P) con 75% Arena (A)

Los tipos de contenedores evaluados fueron:

- Bandejas multiceldas (50 celdas) de poliestireno Pro TraysTM de 2 ¼ pulgadas de profundidad
- Bolsas plásticas de 5×4 pulgadas

En total para el segundo experimento se evaluaron 36 tratamientos como se puede apreciar en el Cuadro 3. Cada tratamiento consistió en tres réplicas y cada réplica tuvo un total de 10 unidades experimentales (UE's) para un total de 1080 UE's.

Cuadro 3. Evaluación de sistemas de manejo de humedad, sustrato y tipo de contenedor para la aclimatación (etapa IV) de vitroplantas de *Stevia rebaudiana*. (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.

TRT ² #	SISTEMA	SUBSTRATO ¹	CONTENEDOR
1	Cámaras plásticas	100% P	Bolsa
2		75%P / 25% A	
3		50%P / 50% A	
4		25%P / 75% A	
5		Co+ A+ Sue (1:1:1)	
6		Bo+ A+ Sue (1:2:1)	
7		100% P	Bandeja
8		75%P / 25%A	
9		50%P / 50% A	
10		25%P / 75% A	
11		Co+ A+ Sue (1:1:1)	
12		Bo+ A+ Sue (1:2:1)	
13	Nebulizado	100% P	Bolsa
14		75%P / 25%A	
15		50%P / 50% A	
16		25%P / 75% A	
17		Co+ A+ Sue (1:1:1)	
18		Bo+ A+ Sue (1:2:1)	
19		100% P	Bandeja
20		75%P / 25%A	
21		50%P / 50% A	
22		25%P / 75% A	
23		Co+ A+ Sue (1:1:1)	
24		Bo+ A+ Sue (1:2:1)	
25	Microtúnel	100% P	Bolsa
26		75%P / 25%A	
27		50%P / 50% A	
28		25%P / 75% A	
29		Co+ A+ Sue (1:1:1)	
30		Bo+ A+ Sue (1:2:1)	
31		100% P	Bandeja
32		75%P / 25%A	
33		50%P / 50% A	
34		25%P / 75% A	
35		Co+ A+ Sue (1:1:1)	
36		Bo+ A+ Sue (1:2:1)	

¹P= Promix, A=Arena, Sue=Suelo, Co= Compost, Bo= Bocashi.

²= Tratamiento.

3.5.1 Construcción de microtúneles

La construcción de microtúneles (Anexo 3) se realizó sobre dos camas, cada una de 7.0 m de largo por 1.4 m de ancho conteniendo un substrato de 75% arena y 25% casulla de arroz. Estas camas estaban ubicadas bajo un sarán que retiene el 40% de la luz que entra.

Para asegurar la sanidad de las vitroplantas y de los diferentes substratos, se esterilizaron las camas con bromuro de metilo. Para llevar a cabo este proceso se mojó cada cama hasta llegar casi a su capacidad de campo. Posteriormente se procedió a cubrir bien cada cama con un plástico transparente de 2.0 m de ancho por 8.0 m de largo. Este plástico se aporcó con suelo húmedo a los lados de cada cama dejando un lado largo sin aporcar. Por el lado que se dejó sin aporcar, se procedió a introducir el bromuro de metilo hasta dejarlo en el centro de la cama. A continuación, para evitar el escape de gas, se selló bien el lado faltante aporcándolo también con tierra húmeda. Finalmente se presionó la lata de bromuro para dejar escapar el gas esterilizante.

Para fijar el contenedor de bromuro de metilo se utilizó una pequeña plataforma de madera (20×20 cm) en la que se insertaron cinco clavos de acero de 2 ½ plg. Cuatro de estos clavos se colocaron perpendicularmente, más o menos de acuerdo a las dimensiones de la lata de bromuro de metilo. El quinto clavo se colocó en el centro de la tabla introduciéndolo por el lado inferior de la misma hasta que su punta quedó sobresalida 1 ½ cm. de alto. La lata fue ubicada en forma horizontal sobre la plataforma y sostenida por los cuatro clavos colocados de acuerdo a las dimensiones de la misma. El gas se dispersa al traspasar la lata con la punta del clavo del centro (Figura 1).

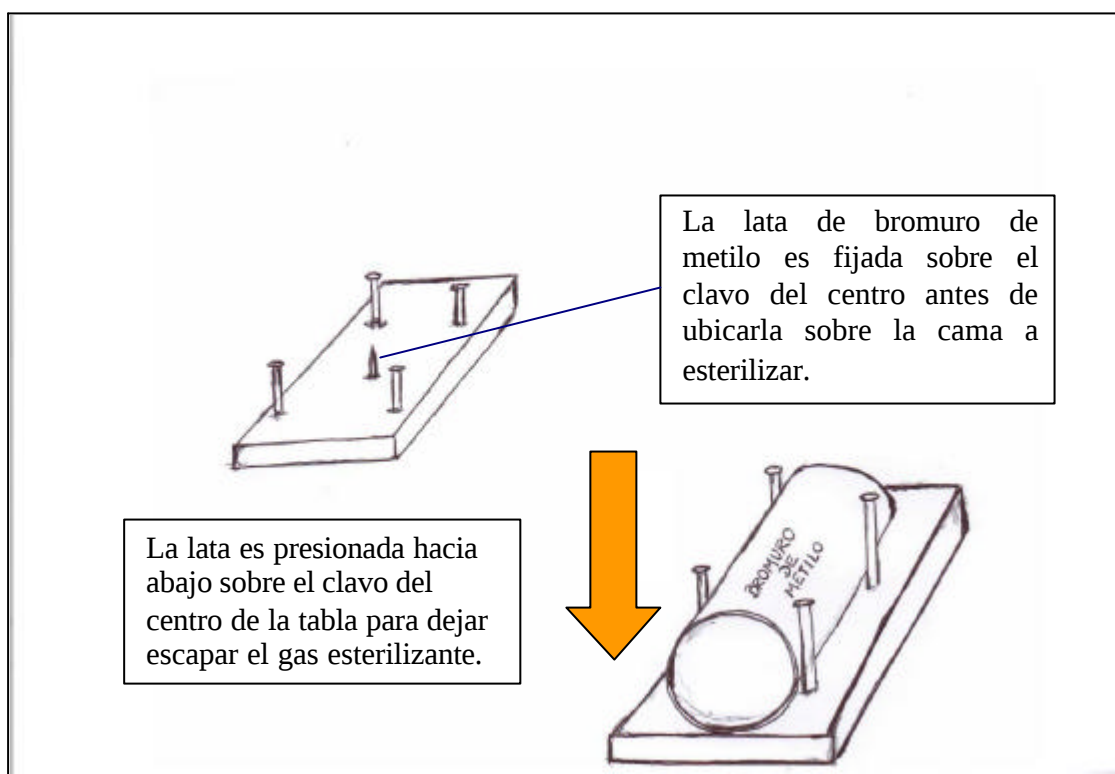


Figura 1. Esquema del proceso de aplicación de bromuro de metilo para la esterilización de camas en el sistema de microtúneles para la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.

Las camas estuvieron cubiertas 72 horas y se dejaron aerear por 72 horas más. Una vez esterilizado el substrato se ubicó 8 tubos de PVC de 25 cm de largo y 2 plg. de ancho a lo largo de la calle de los lados de cada cama (Figura 2a). Estos tubos fueron ubicados a una distancia de 1.0 m uno del otro. Sobre los tubos de base se pusieron 16 arcos de PVC de 1.5 plg. de ancho y 2.5 m de largo que constituyeron las estructuras principales de los microtúneles (Figura 2b). Luego se colocaron tres estacas aproximadamente a 20 cm de distancia de la parte frontal de cada cama (Figura 2c), en donde se ataron unas cuerdas plásticas que amarraban cada arco uno con otro a lo largo de la cama (Figura 2d). Estas cuerdas plásticas se colocaron con el propósito de darle la fortaleza necesaria a los arcos para que pudieran sostener el peso del plástico que fue colocado a continuación.

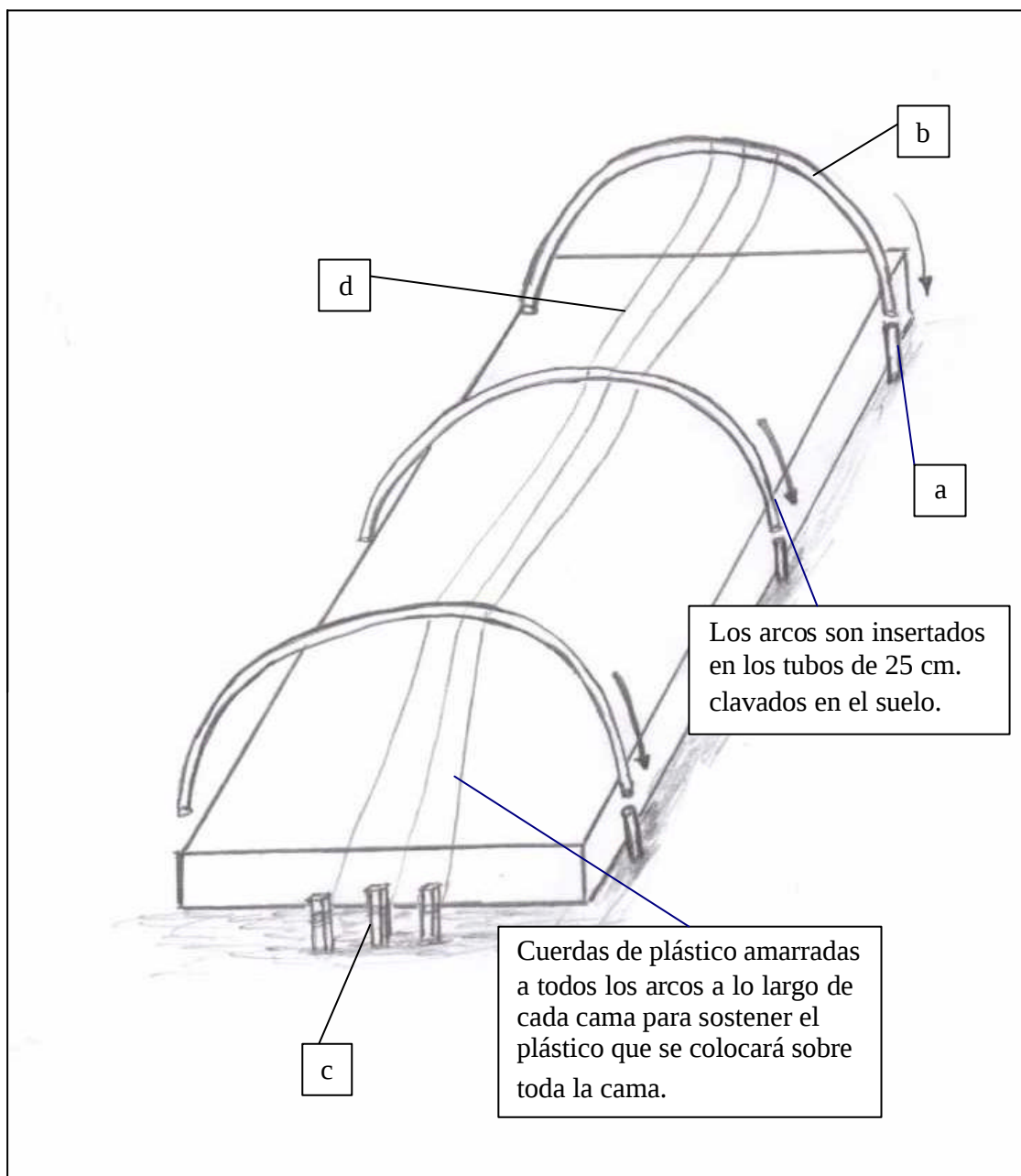


Figura 2. Proceso de construcción de microtúneles para la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.

Finalmente los tratamientos en bolsa fueron ubicados en un microtúnel y las bandejas en otro microtúnel con el fin de disminuir la variabilidad de condiciones para las vitroplantas en los distintos medios y tipos de contenedores.

3.5.2 Cámaras plásticas

Las cámaras plásticas (Anexo 1) son armazones contruídos con tiras de madera que forman un rectángulo de 2.0 m. de largo por 1.2 m. de ancho y 0.5 m. de altura. Estas cámaras estan cubiertas de plástico transparente en todas sus caras.

Las cámaras plásticas fueron ubicadas bajo un sombreadero cubierto con un sarán que retiene el 60% de la luz solar.

Las tres cámaras plásticas que se utilizaron en este experimento fueron previamente lavadas y desinfectadas con cloro al 20% y finalmente con alcohol al 70%. Posteriormente fueron colocadas sobre plataformas de metal a 30 cm. de altura del suelo.

3.5.3 Sistema de riego por nebulización

Para este sistema (Anexo 2) las vitroplantas fueron expuestas a un régimen de riego de 20 segundos cada cinco minutos desde las ocho de la mañana hasta las cuatro de la tarde. Este es el método que actualmente utiliza el Laboratorio de Cultivo de Tejidos para la aclimatación de la mayoría de especies que se producen.

3.5.4 Toma de datos

Se tomaron datos del tamaño de las vitroplantas (altura en cm.) y mortalidad a partir del tercer día de siembra y luego cada ocho días durante cuatro semanas contínuas. La medición de las plantas se hizo en forma individual con la ayuda de un “pie de rey” o escalímetro, desde la base de la planta en el contenedor hasta la hoja más alta. La toma de datos comenzó el 21 de diciembre del 2001 y concluyó el 10 de Enero del 2002.

3.5.5 Análisis estadístico

Para este segundo experimento, los tratamientos fueron ordenados en un arreglo factorial con un diseño de bloques completos al azar. Los datos fueron analizados con el programa estadístico “Statistical Analysis System” versión 8.0 (SAS[®],1999) y Minitab. Release 13 for Windows[®] 95/98 and NT[™]. Se realizó primeramente un Análisis de Varianza (ANDEVA) con los resultados de las dos etapas para determinar si los tratamientos influyeron sobre las variables de interés. Luego se realizó una separación de medias con el método de “Tukey” para identificar los mejores tratamientos.

Para ésta etapa de aclimatación se analizaron los datos separadamente. Primero se analizaron los tratamientos por tipo de contenedor, de manera que el número elevado de tratamientos no provocara demasiadas interacciones que pudieran haber influído en la inferencia estadística.

Posteriormente se evaluaron en conjunto los 12 mejores tratamientos resultantes del análisis anterior para poder encontrar el mejor sistema de manejo de humedad, sustrato y tipo de contenedor para la aclimatación de *Stevia rebaudiana*.

3.6 Experimento 3. Etapa IV. Uso de microinvernaderos para la aclimatación de *Stevia rebaudiana* en invernadero

En un tercer experimento se aclimató 180 vitroplantas utilizando el sistema de microinvernaderos (Anexo 4). Se evaluó el crecimiento de las plantas en los seis tipos de sustratos involucrados por lo que se obtuvo seis tratamientos (Cuadro 4). Se llevaron a cabo tres réplicas por tratamiento en cada uno de los experimentos y cada tratamiento tuvo 10 unidades experimentales para un total de 180 UE's.

Cuadro 4. Evaluación de sustratos bajo un sistema de microinvernadero para la aclimatación (etapa IV) de vitroplantas de *Stevia rebaudiana*. (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.

TRT ² #	SISTEMA	SUBSTRATO ¹	CONTENEDOR
1	Microinvernaderos	100% P	Bandeja
2		75%P / 25%A	
3		50%P / 50% A	
4		25%P / 75% A	
5		Co+ A+ Sue (1:1:1)	
6		Bo+ A+ Sue (1:2:1)	

¹P= Promix, A=Arena, Sue=Suelo, Co= Compost, Bo= Bocashi

²= Tratamiento

3.6.1 Construcción de microinvernaderos

Para la construcción de los microinvernaderos se siguió el mismo procedimiento descrito por Castro (1999) y que se describe en el Anexo 5.

3.7 Preparación y pasteurización de sustratos

De cada tipo de sustrato se preparó cuatro pies cúbicos a excepción del Pro-mix® Bx (Premier Brands Inc. Canadá) que fue importado y se compone de: turba de musgo esfagníneo Canadiense (Canadian Sphagnum Peat Moss), perlita, vermiculita cal dolomítica, piedra caliza y agente humectante. Todos los sustratos fueron pasteurizados durante 45 minutos a una temperatura de 200°C. De cada sustrato pasteurizado se tomaron muestras representativas a las cuales se les realizó una prueba de pH y se analizó la cantidad de Nitrógeno, Fósforo y Potasio. Los resultados de estos análisis se muestran en el Anexo 6.

Los sustratos fueron distribuidos en las bandejas multiceldas (50 celdas) y en bolsas. Los tratamientos debidamente identificados se fueron ubicando en cada uno de los sistemas de aclimatación bajo los invernaderos y el sarán. Para el caso de las bandejas multiceldas se ubicó dos sustratos por bandeja. Cada sustrato fue ubicado en las diez primeras celdas de cada extremo, dejando las 30 celdas del centro vacías (Figura 3). Finalmente se midió la luminosidad con un espectrofotómetro de triple rango (General Electric 214).

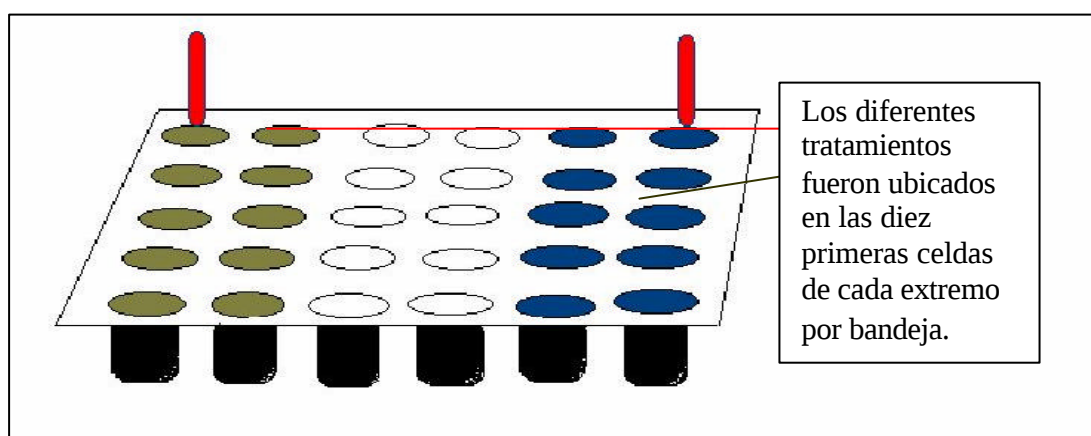


Figura 3. Distribución de sustratos en bandejas multiceldas para su evaluación durante el proceso de aclimatación de *Stevia rebaudiana*. Zamorano, Honduras, 2002.

Los resultados de luminosidad de cada sistema de aclimatación que se presentan a continuación fueron derivados a partir de 8500 pies candela totales de un día soleado tomado al azar en el sitio y época de la realización del experimento:

- Cámaras plásticas: 60% de sombra – 3400 pies candela.
- Riego nebulizado: 40% de sombra – 5100 pies candela.
- Microtúnel: 40% de sombra – 5100 pies candela.
- Microinvernadero: 40% de sombra – 5100 pies candela.

3.8 Procedimiento utilizado para la transferencia de vitroplantas de la etapa III a la etapa IV

Las vitroplantas utilizadas en esta etapa de la investigación fueron obtenidas de la producción del LCTM y del primer experimento de este estudio. Cinco días antes del trasplante y con el fin de que las vitroplantas adquiriesen mayor resistencia a la baja humedad relativa del medio ambiente, se removió el sello de parafilm de todos los frascos que estaban en el cuarto de crecimiento y que iban a ser transplantados.

Las plantitas fueron extraídas de cada frasco con la ayuda de pinzas. Luego se lavaron muy bien con agua de la llave para remover los residuos del medio de cultivo. Seguidamente se sumergieron en una solución funguicida-bactericida (Benomil 1 gr/l y Agrimicin 0.6 g/l) por 20 minutos y se sembraron en los distintos contenedores con los diferentes sustratos que fueron previamente humedecidos. De cada tratamiento se sembró una réplica por día durante tres días.

3.9 Toma de datos

La toma de datos en este experimento se realizó de la misma manera que en el experimento 2 y evaluando las mismas variables, sin embargo para este experimento fue agregada la variable de ganancia de altura final (GAF). La GAF se obtuvo mediante la suma de todas las diferencias de altura de vitroplantas entre una semana y la anterior.

3.10 Análisis estadístico

Para el tercer experimento, los tratamientos fueron ordenados en un arreglo factorial con un diseño de bloques completos al azar. Los datos fueron analizados con el programa estadístico “Statistical Analysis System” versión 8.0 (SAS[®], 1999) y Minitab. Release 13 for Windows[®] 95/98 and NT[™]. Se realizó Análisis de Varianza (ANDEVA) con los resultados de las dos etapas para determinar si los tratamientos influyeron sobre las variables de interés. Luego se realizó una separación de medias con el método “Tukey” para identificar los mejores tratamientos.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 EXPERIMENTO 1. ETAPA III. PRE-TRANSPLANTE O ENRAIZAMIENTO *IN VITRO*

Las auxinas utilizadas para el enraizamiento *in vitro* de las vitroplantas mostraron datos muy variados al ser analizados estadísticamente, los resultados de dichos análisis para cada una de las variables analizadas se detallan a continuación.

4.1.1 Días a Formación de Raíces (DFR)

Se encontraron diferencias significativas en cuanto al Tipo de Auxina (TA) y el Nivel de Auxina (NA) utilizados y sus interacciones (Anexo 7).

Como se puede apreciar en el Cuadro 5, durante esta etapa de enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* se observó el menor DFR (15 días) con un nivel de 0.5 mg/l de ANA. A este nivel de auxina se obtuvo igualmente un mayor número de vitroplantas con raíces mayores de 10 mm.

Cuadro 5. Efecto del tipo y nivel de auxina en el número de días a formación de raíces (DFR) y en el tipo de enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.

Auxina*	Dosis (mg/l)	^s Días a formación de raíces (DFR)
ANA	0.5	15.00a
ANA	0.0	16.00b
AIB	1.0	17.00c
AIA	0.5	17.00c
AIA	0.0	17.00c
ANA	1.0	17.00c
AIA	1.0	17.50c
AIB	0.0	17.50c
AIA	1.5	17.66c
AIB	0.5	18.00c
AIB	1.5	18.33d
ANA	1.5	18.33d
ANA	2.0	19.00d
AIA	2.0	19.22d
AIB	2.0	19.30d

^s Promedios seguidos de letras minúsculas diferentes son estadísticamente diferentes Tukey (P<0.05).* ANA= ácido naltalenacético; AIB= ácido indolbutírico; AIA= ácido indoleacético.

Con una concentración de 1.5 mg/l de AIB o ANA ó utilizando cualquiera de las auxinas tratadas a 2.0 mg/l se obtienen pobres enraizamientos ó formación de callo a los 18 y 19 días después de su inducción, por lo que resultaron ser los tratamientos en que se observó el mayor DFR en este experimento. Estos resultados se asemejan a los encontrados por Lyakhovkin *et al.*, (1993) los cuales demuestran que se obtiene una óptima rizogénesis de *Stevia in vitro* con el uso de bajas concentraciones de ANA (0.05 y 0.2 mg/l). Con estas concentraciones las vitroplantas enraizadas pudieron ser transplantadas a los 18 a 20 días después de haber sido inducidas y cuando ya presentaban un vigoroso sistema radicular (Anexo 8).

4.1.2 Porcentaje de vitroplantas enraizadas (PVE)

Para obtener el PVE en cada tratamiento, se tomó en cuenta el promedio de vitroplantas enraizadas por tratamiento. Los resultados obtenidos en esta parte del experimento van acompañados de la respuesta morfogénica de las vitroplantas.

Como se puede observar en el Cuadro 6, los PVE más altos se obtuvieron con 1.0 y 0.5 mg/l de AIA y ANA, respectivamente, y con 0.5 y 0.0 mg/l de AIB y ANA, respectivamente, aunque estadísticamente todos estos tratamientos tuvieron iguales resultados para la PVE (Anexo 9).

Se distinguió un enraizamiento tipo 4 (> a 10 mm de largo) utilizando 0.5 mg/l de ANA (Anexo 8) a pesar de que estadísticamente no existió una correlación directa entre el porcentaje de vitroplantas enraizadas y el tipo de auxina utilizado (Anexo 10).

La mayor formación de callo y un pobre desarrollo de las raíces se observó en aquellos tratamientos cuyos medios nutritivos se encontraban ausentes de auxinas y con niveles de 2.0 mg/l en cualquiera de las auxinas tratadas (Anexo 11).

Cuadro 6. Efecto del tipo y nivel de auxina en el número de plantas enraizadas y el tipo de enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.

Tipo de Auxina	Dosis de Auxina (mg/l)	[€] Tipo de enraizamiento	% de vitroplantas enraizadas (PVE)	[§] Grupo SNK
AIA	1.0	1	90	a
ANA	0.5	4	73	ab
AIB	0.5	2	60	abc
ANA	0.0	1	60	abcd
AIA	0.5	1	50	bcd
AIB	0.0	0	50	bcd
AIB	1.5	2	50	bcd
AIA	0.0	2	45	bcde
AIB	1.0	0	40	bcde
ANA	1.0	1	40	cde
AIA	1.5	0	40	cde
AIB	2.0	0	35	cdef
ANA	1.5	1	30	def
ANA	2.0	0	30	def
AIA	2.0	1	30	def

[§] Promedios seguidos de letras minúsculas diferentes son estadísticamente diferentes SNK (P<0.05).

[€] Tipo de enraizamiento: 0 = no enraizamiento; 1 = formación de callo; 2 = raíces entre 1-3 mm; 4 = raíces > de 10 mm

Estos resultados superan los encontrados por Delvalle, 2001 en los que utilizando una concentración de 0.1 mg/l de ácido indolbutírico (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.

4.1.3 Número de contenedores contaminados y tipo de contaminación

No se presentó contaminación significativa (aproximadamente 15%) durante el enraizamiento *in vitro* del cultivo. La mayor parte fue afectada por hongos como agente causal.

4.1.4 Respuesta morfogénica por tratamiento

Como se mostró en el Cuadro 6, la mayor parte de las vitroplantas formaron callo, sin embargo se obtuvo un número considerable de vitroplantas con raíces que superaron los 10 milímetros de longitud (tipo 4), mismas que correspondieron en su mayoría al tratamiento del Ácido Nalftalenacético (ANA) a un nivel de 0.5 mg/l.

4.2 ETAPA IV. ACLIMATACIÓN EN INVERNADERO

En esta etapa de aclimatación se presentan resultados en respuesta a las variables propuestas y para cada uno de los dos experimentos realizados que se llevaron a cabo durante el periodo de aclimatación de vitroplantas.

4.2.1 Experimento 2. Etapa IV. Uso de microtúneles, cámaras plásticas y riego por nebulización para la aclimatación de *Stevia rebaudiana* en invernadero

Los resultados del segundo experimento corresponden a los métodos de manejo de humedad en cámaras plásticas, nebulización y microtúneles para la aclimatación de vitroplantas en invernadero.

4.2.1.1 Porcentaje Promedio de Supervivencia (PPS). Para el PPS de las vitroplantas aclimatadas se encontraron diferencias estadísticas para el sistema de manejo de humedad y el tipo de contenedor utilizado. No se encontraron diferencias significativas entre los sustratos evaluados, ni para las interacciones de las variables estudiadas (Anexo 12). Una importante y significativa tasa promedio de supervivencia (aprox. 82.7%) se logró bajo el sistema de humedad de microtúneles e influenciadas por el uso de bolsas plásticas como contenedor (Figura 4).

Tal como se observa en la Figura 4, se encontró un mayor PPS (aproximadamente 11% más) al utilizar bolsas plásticas, dicha diferencia significativa se vio acentuada en el sustrato compuesto por 50% Promix y 50% Arena, en donde sobrevivieron el 100% de las vitroplantas siendo el mejor PPS observado en este experimento.

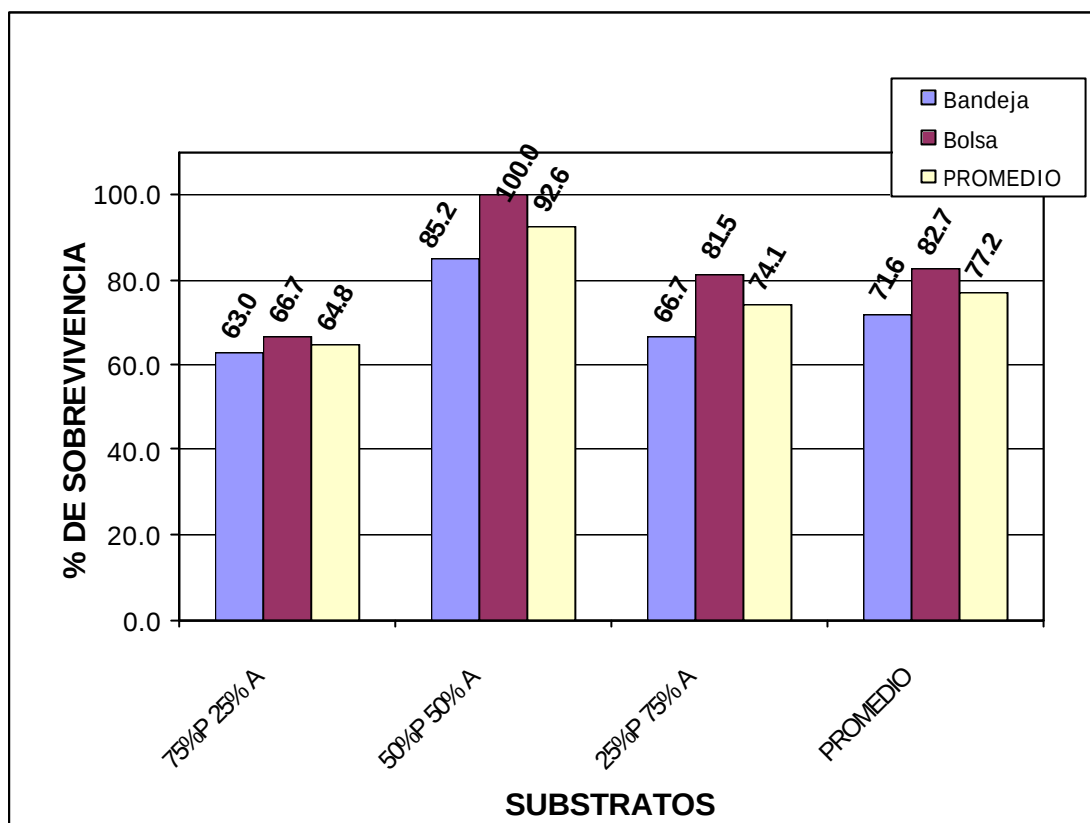


Figura 4. Efecto del sistema de microtúneles en el porcentaje de sobrevivencia durante la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.

El sistema de microtúneles superó significativamente al sistema de nebulización (Figura 5) en donde solo se pudo aclimatar un promedio de 9% de las plantas independientemente del tipo de sustrato y del tipo de contenedor utilizado. Bajo el sistema de nebulización el tratamiento de bolsas plásticas con el sustrato compuesto de 75% Promix con 25% Arena fue donde se pudo observar el mejor porcentaje de sobrevivencia (26% aproximadamente).

En general, tanto en bolsas como bandejas para el sistema de microtúneles el mejor PPS de 92.6% fue observado en el sustrato de 50% Promix 50% Arena, mientras que en el sistema de nebulización el mejor PPS se logró con el sustrato de 25% Promix 75% Arena con un promedio de 13% de sobrevivencia.

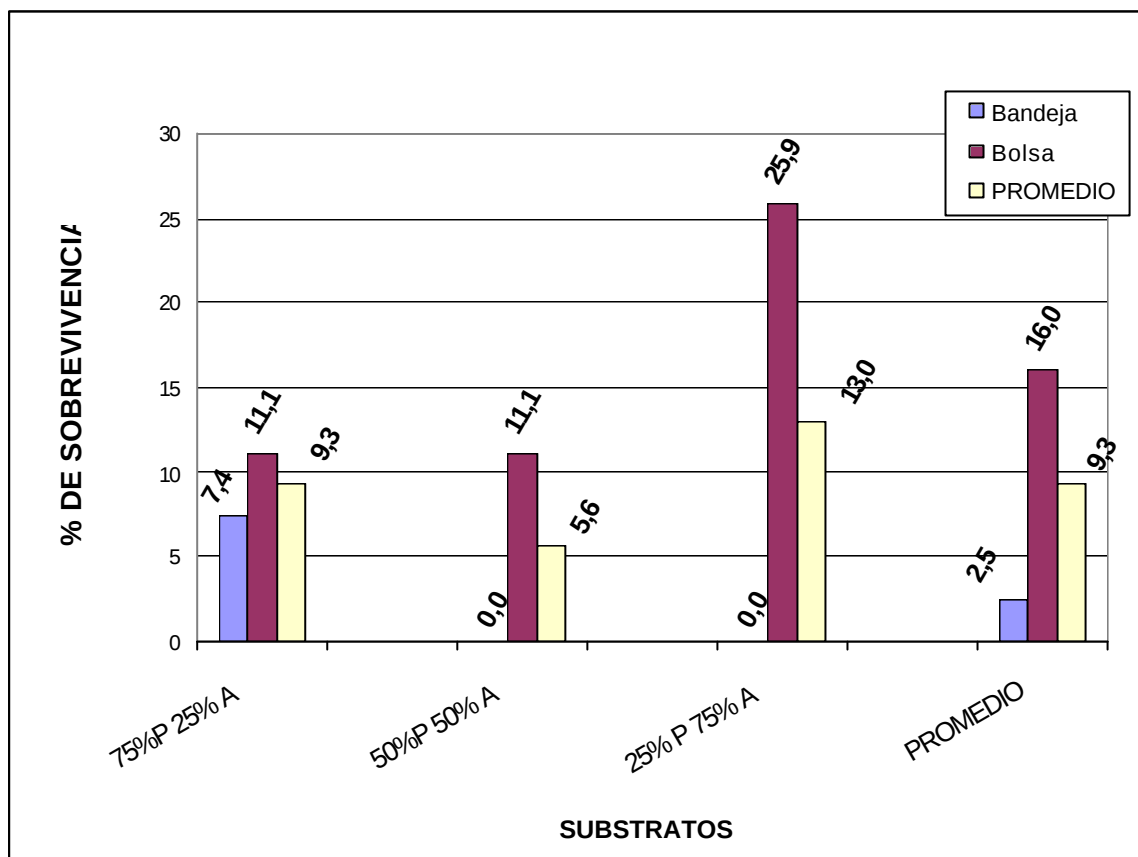


Figura 5. Efecto del sistema de nebulización en el porcentaje de sobrevivencia durante la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudina* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.

Bajo el sistema de cámaras plásticas casi la totalidad de las vitroplantas perecieron antes de cumplir la cuarta semana de aclimatación; según lo observado, esto pudo ser consecuencia de la baja humedad a la que las plantas estuvieron expuestas ya que dichas cámaras no permanecían herméticamente cerradas, dejando escapar la humedad.

Como se puede apreciar en la Figura 6, el PPS fue superior en el sistema de microtúneles. En ambos sistemas de humedad el uso de bolsas plásticas superó el uso de bandejas multiceldas.

En el sistema de microtúneles se observó un PPS de 82.7% y 71.6% para bolsas y bandejas multiceldas respectivamente. En el sistema nebulizado se obtuvo un PPS de 16% y 2.5 % para bolsas y bandejas multiceldas respectivamente.

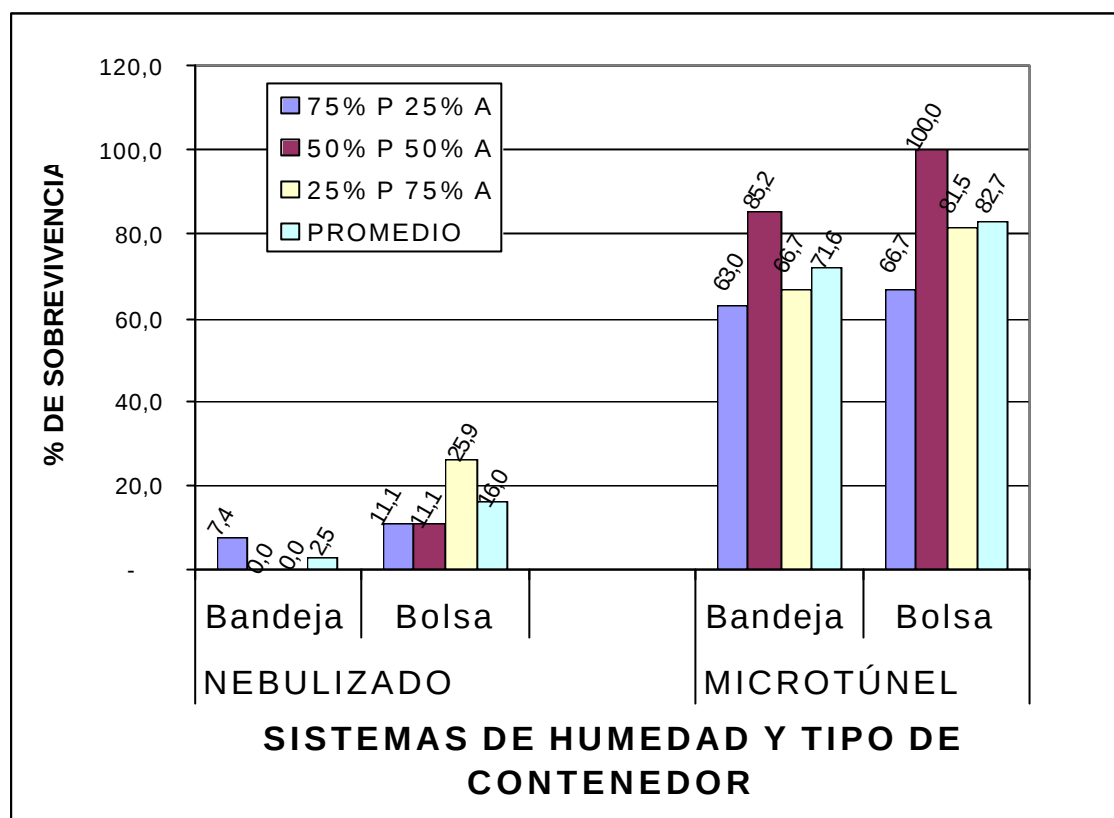


Figura 6. Efecto del sistema de manejo de humedad y tipo de contenedor utilizado en el porcentaje promedio de sobrevivencia (PPS) durante la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.

4.2.1.2 Altura Promedio de Vitroplantas (APV). Para este análisis solo se tomó en cuenta los mejores tratamientos de sobrevivencia correspondientes a los sistemas de manejo de humedad de microtúneles y nebulizado. En este experimento, independientemente de las otras variables, fue el sistema de humedad donde se encontró diferencia estadística (Anexo 13).

Como se aprecia en el Cuadro 7 los mejores resultados se obtuvieron con el sistema de microtúneles, en el cual se logró una altura promedio de 5,8 cm por vitroplanta aproximadamente, comparado con el sistema de nebulización en donde se logró una altura promedio de 4.1 cm por vitroplanta (Cuadro 7).

Esto pudo deberse a que los microtúneles proveyeron del ambiente adecuado de humedad necesaria para la adaptación gradual al medio externo de las vitroplantas (Anexo 14). Mientras que en el sistema de nebulización, a medida que se avanzó en las semanas durante el proceso de aclimatación el régimen de riego se fue tornando danino (Anexo 15), ya que el exceso de humedad provocó una pudrición en algunos tratamientos.

Cuadro 7. Efecto del sistema de aclimatación en la altura durante la aclimatación vitroplantas de *Stevia rebaudiana* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.

Sistema	Substrato	ALTURA (cm)		
		Bandeja (b) [§]	Bolsa (a) [§]	Promedio
Microtúnel (a) [§]	75% P ¹ 25% A ²	5.2911	7.0109	6.1510
	50% P 50% A	5.6789	6.7033	6.1911
	25% P 75% A	4.4221	5.9776	5.1999
	Promedio	5.1307	6.5640	5.8473
Nebulizado (b)	75% P ¹ 25% A ²	4.3500	4.4000	4.3750
	50% P 50% A	0	4.0000	4.0000
	25% P 75% A	0	3.9500	3.9500
	Promedio	4.3500	4.0500	4.0929

[§] Letras minúsculas diferentes son estadísticamente diferentes Tukey (P<0.05).

Estos datos concuerdan con los observados por Lyakhovkin *et al.*, (1993), los que indican que la mayor formación de raíces se obtiene manteniendo una alta humedad por un corto lapso de tiempo durante la formación de nuevas raíces. Este comportamiento fue observado en el sistema de riego por nebulización durante la primera semana de aclimatación.

Lyakhovkin *et al.*, (1993), observaron además que reduciendo gradualmente la humedad con intervalos largos de riego a uno o dos diarios se puede adaptar rápida y gradualmente a las plantas a las condiciones climáticas naturales, tal como se observó en el sistema de microtúneles utilizando riego al criterio.

Estos resultados concuerdan con los observados por Delvalle, 2001 obteniendo una buena sobrevivencia en la primera semana de aclimatación de *Stevia* utilizando un riego nebulizado pero con pobre desarrollo de raíces verdaderas.

4.2.2 Experimento 3. Etapa IV. Uso de microinvernaderos para la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* en invernadero

4.2.2.1 Porcentaje Promedio de Supervivencia (PPS). En este segundo experimento de aclimatación sobrevivieron un número bajo de plantas de *Stevia rebaudiana* en los diferentes substratos evaluados (cinco vitroplantas en promedio), por lo que no hubo diferencia estadística significativa como se muestra en el Anexo 16.

Al igual que en el primer experimento se observaron altas mortalidades en los substratos de compost, arena más suelo y en el substrato compuesto de bocashi, arena y suelo (Anexo 17). El resto de substratos indicaron una baja o nula sobrevivencia significativa debido a intoxicaciones con altas concentraciones de Fósforo (P) y Potasio (K) (Kidder y

Rhue, 1998) como es el caso del sustrato de bocashi con arena y suelo (1:1:1) (Anexo 18), ó de una mala estructura física como es el caso del compost con arena y suelo (1:2:1), el cual tendió a compactarse rápidamente (Anexo 19).

Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Lyakhovkin *et al.*, (1993), los que indican que se obtiene una alta sobrevivencia en la aclimatación de *Stevia* utilizando sustratos sueltos, especialmente en la mezcla de arena con suelo (1:1) ó simplemente en arena pura.

Los resultados de esta investigación contrastan con los obtenidos por Delvalle (2001) en los que se obtuvo tan solo un 10% de sobrevivencia utilizando un medio que consistió en aserrín, tierra y arena en proporción de 3:2:1 respectivamente con dos riegos al día durante cinco minutos.

4.2.2.2 Altura de las plantas. Las mejores alturas promedios que se encontraron en este segundo experimento de aclimatación, se obtuvieron con los sustratos compuestos de 50% Promix®-50% Arena (4.9 cm) y 25% Promix®-75% Arena (3.4 cm) durante la cuarta semana de aclimatación (Figura 6), lo cual pudo deberse a un adecuado equilibrio entre la capacidad de retención y desalojo del agua de exceso que se pudo conseguir con estos sustratos.

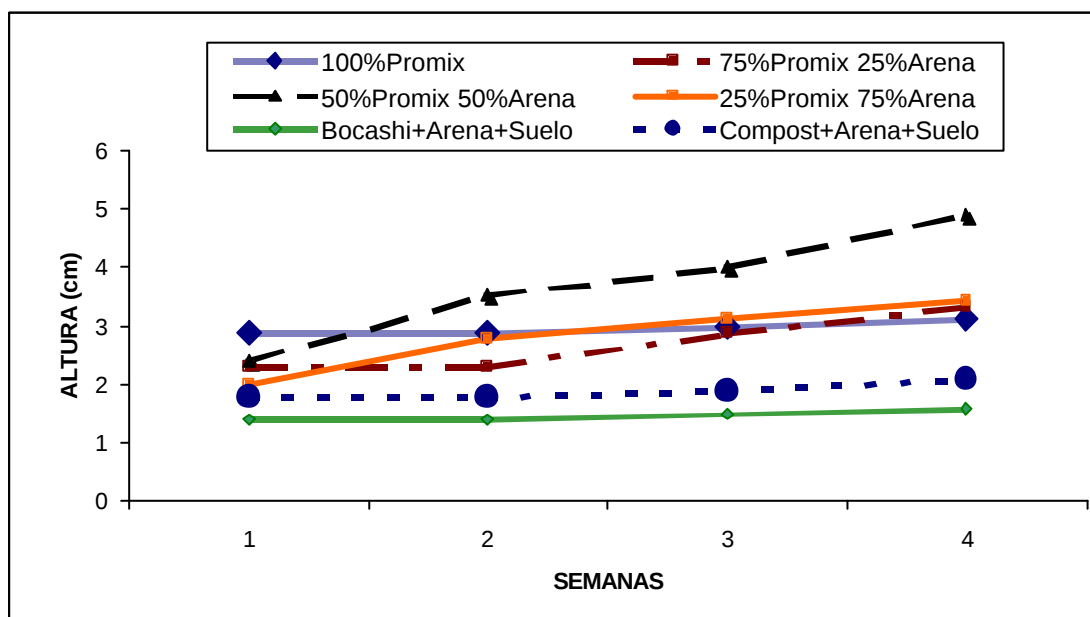


Figura 7. Efecto del tipo de sustrato en la altura de vitroplantas (APV) durante la aclimatación de *Stevia rabaudiana* en bandejas múltiples bajo un sistema de microinvernadero (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.

De acuerdo al Cuadro 8, el mayor crecimiento de las vitroplantas se observó entre la tercera y cuarta semana de aclimatación en donde la mayor parte de las vitroplantas mostraron crecimiento en los sustratos evaluados. Se observó una adaptación especialmente rápida de aquellas vitroplantas que se encontraron en el sustrato de 25% Promix 75% Arena, ya que en la primera semana de aclimatación este sustrato presentó el mejor promedio de crecimiento y como consecuencia mostró la mejor Ganancia de Altura Final (GAF) en este experimento.

El sustrato de 50% Promix y 50% Arena presentó una mejor tendencia de crecimiento a pesar de no resultar con el mejor GAF en este experimento. Los sustratos cuyas características de retención de humedad resultaban ser las menos equilibradas fueron igualmente los menos propensos a un crecimiento adecuado debido a las condiciones adversas de su sustrato para su aclimatación.

Cuadro 8. Efecto del tipo de sustrato utilizado bajo un sistema de microinvernaderos en la Altura Promedio de Vitroplantas (APV) durante la aclimatación de *Stevia rebaudiana* (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.

Sustratos	^s Diferencia de altura de vitroplantas (cm) entre semanas incremento en altura en 4 semanas									
	1	2	DIF	2	3	DIF	3	4	DIF	^{&} GAF
100% P ¹	1.79 cd	1.85 b	0.06	1.85 b	1.86 b	0.01	1.86 b	1.92 b	0.06	0.13
75% P 25% A ²	1.64 bc	1.78 ab	0.14	1.78 ab	1.83 b	0.05	1.83 b	1.99 b	0.16	0.35
50% P 50% A	3.21 a	3.32 a	0.11	3.32 a	3.67 a	0.35	3.67 a	4.19 a	0.52	0.98
25% P 75% A	2.31 ab	3.29 a	0.98	3.29 a	3.58 a	0.29	3.58 a	3.98 a	0.40	1.67
³ Bo+A+ Sue (1:2:1)	0.13 d	0.13 b	0.0	0.13 b	0.13 b	0.0	0.13 b	0.14 b	0.01	0.01
Co ⁴ +A+ Sue ⁵ (1:1:1)	1.72 bc	1.73 b	0.01	1.73 b	1.74 b	0.01	1.74 b	1.78 b	0.04	0.06

^s promedios seguidos de letras minúsculas diferentes son estadísticamente diferentes. SNK (P<0.05)

¹ Promix[®], ² Arena, ³ Bocashi, ⁴ Compost ⁵ Suelo

[&]GAF= Ganancia de Altura Final

5. CONCLUSIONES

5.1 Etapa III. Pre-transplante o enraizamiento *in vitro*

- Se obtiene un mejor enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* utilizando 100% de un medio Murashige & Skoog (MS) + 0.5 mg/L ANA + 35 g/L sacarosa + 2.5 mg/L Phytigel y pH ajustado a 5.8 (Cuadro 1).
- Utilizando dicho medio se obtiene raíces de más de 10 mm de longitud a los 15 días.

5.2 Etapa IV. Aclimatación en invernadero

- El sistema de microtúneles resultó ser el mejor sistema de manejo de humedad para aclimatar *Stevia rebaudiana*.
- Dentro del sistema de microtúneles se obtuvo un mejor PPS (82.7%) y una mejor altura (6.19 cm) utilizando bolsas plásticas y con un sustrato compuesto de 50% Promix-50% Arena.
- Dentro del sistema de nebulización se obtuvo un mejor PPS (25.9%) utilizando bolsas plásticas y con un sustrato compuesto de 25% Promix-75% Arena.
- El uso de sustratos más sueltos resultan ser los más favorables para la aclimatación de *Stevia rebaudiana*.
- El uso de sustratos compuestos de arena, compost y suelo (1:1:1) y de arena, bocashi y suelo (2:1:1) no son favorables.

6. RECOMENDACIONES

6.1 Etapa III. Pre-transplante o enraizamiento *in vitro*

1. Utilizar un medio de 100% MS de su formulación original + 0.5 mg/L ANA + 35 g/L sacarosa + 2.5 mg/L Phytigel y pH ajustado a 5.8 (Cuadro 1).
2. Realizar pruebas de enraizamiento *in vitro* utilizando diferentes cantidades de sacarosa en el medio de cultivo para acelerar la formación de raíces duras necesarias para una adecuada aclimatación.
3. Realizar un análisis de costo para la producción comercial de *Stevia rebaudiana* a partir de vitroplantas clonadas *in vitro*.
4. Realizar más evaluaciones sobre el enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* utilizando y/o alternando períodos de luz y oscuridad para una efectiva rizogénesis.
5. Realizar un análisis de costo para la producción comercial de *Stevia rebaudiana* a partir de vitroplantas clonadas *in vitro*.

6.2 Etapa IV. Aclimatación en invernadero

1. Utilizar un sistema de riego por nebulización bajo un régimen de riego de 20 segundos cada 5 minutos, de 8:00 am a 5:00 pm, por una semana aproximadamente.
2. Después del riego por nebulización se recomienda trasladar las vitroplantas a un sistema de microtúnel con un sarán de 40% por un período de 3 a 4 semanas aproximadamente y regando cuando la superficie del substrato se comienza a secar.
3. Utilizar bolsas plásticas de 5"×4" para el proceso de aclimatación.
4. Utilizar un substrato de 50% Promix – 50% Arena.
5. Probar remojar las vitroplantas en una solución con una pequeña concentración de ANA (3 mg/L) por unas horas, antes de ser sembradas en cualquier substrato.
6. Realizar evaluaciones reduciendo la frecuencia y duración del riego nebulizado.

7. Probar el efecto de la luminosidad en el enraizamiento de las plantas y su aclimatación.
8. Probar otro tipo de substratos con características más sueltas en distintas proporciones para lograr una mejor adaptación de las vitroplantas.
9. Realizar otros estudios evaluando substratos constituidos de suelo, arena y gallinaza u otro tipo de abono orgánico.

7.BIBLIOGRAFIA

- Andrade, M.; Gutiérrez, M. A.; Gutiérrez, J. A.; Olivera, V. Z. 2000. Cultivo *in vitro* de Gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. Barquisimeto (Venezuela) 12(3): 75 – 80.
- Borys, M. W.; García, M.; Leszczyńska, B. 1995. Enraizamiento de esquejes de *Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Hamsl. cv. White Marble en función de radiación solar. Revista Chapingo (México) 1(4):109 – 112.
- Burgarín, M. R.; Lozoya, H. 1992. Propagación *in vitro* del portainjerto *Rosa x noisettiana* cv. “Manetii” a partir de yemas axilares. Revista Chapingo (México) 16(78):39 – 44.
- Carneiro, J. W. P.; Muniz, A. S.; Guedes, T. A. 1997. Greenhouse bedding plant production of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni. Canadian Journal. Plant Science. (Canadá) 77: 473 – 474.
- 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). Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 35 p.
- Delvalle Báez, W. E. 2001. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 44 p.
- Espinal - Rueda, D. 2002. Cultivo de tejidos vegetales y propagación *In vitro*. Guía de lectura y prácticas de módulo. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano Academic Press. 79 p.
- Esquibel, M. A.; Lua, S. F. 1991. Callogenesis, organogenesis and micropropagation of *Datura insignis* Barb. Rodr. Revista Brasileira de Fisiología Vegetal (Brasil) 3(2):63 – 68.
- Hartmann, H. T.; Kester, D. E. 1997. Propagación de plantas. Trad Compañía Editorial Continental, S.A. DEC.V. Ed. Compañía Editorial Continental, S.A. DEC.V. México. 760 p.

ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola). 1996. I Simposio Nacional sobre Cultivo de Tejidos Vegetales. Cultivo de tejidos y su aplicación en agricultura. Orozco, C. Guatemala, Guatemala. p 1-2

Kidder, G; Rhue, R. D. 1998. Procedures used by the Extension Soil Testing Laboratory and Interpretation of Results. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, Gainesville. p 33 – 3

Lyakhovkin, A. G.; Tran, D. L.; Titov, D. A.; Mai, P. A. 1993. Cultivation and utilization of Stevia. Agricultural Publishing House. (Vietnam). 5 – 43 p.

Magalhães, A. M.; Peters, J. 1991. Cultura *in vitro* de Amexeira: efeito do ácido indolbutírico, tipo de lâmpada e intensidade luminosa no enraizamento. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal (Brasil) 3(1):57-61.

Ministerio de Agricultura y Ganadería; Subsecretaría de estado de Agricultura, Paraguay. 1994. Producción de Ka'a he'e. Ed. L. Alvarez; R. Casaccia; G. López. 2 ed. Paraguay, Ministerio de Agricultura y Ganadería. 48 p.

Minitab. 2000. Minitab, Release 13 for Windows® 95/98 and NT™ .USA..

Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *In vitro* de plantas superiores. Trad. L. Eyerbe. 3 ed. Madrid, España, Mundi – Prensa. 325 p.

Pierik, R. L. M. 1994. Biotecnología vegetal como herramienta en la horticultura ornamental. Revista Chapingo (México) 1(1):49-71.

Pierik, R. L. M.; Van de Pol, P. A. 1995. Factors controlling adventitious root formation on stem explants of Rose (*Rosa hybrida* cv. "Motrea") *in vitro*. Revista Chapingo (México) 1(3): 23 – 29.

SAS Institute Inc. 1997. SAS/S TAT® Software: Changes and Enhancements through Release 6.12, Cary, N.C: SAS Institute Inc. 1167 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Sistema de cámaras plásticas utilizadas para la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.



Anexo 2. Sistema de nebulización utilizado para la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.



Anexo 3. Sistema de microtúneles utilizado para la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.



Anexo 4. Sistema de microinvernadero utilizado para la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.



Anexo 5. Metodología utilizada para la construcción de microinvernaderos utilizados para la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* (Experimento 3).
Zamorano, Honduras, 2002.

Para la construcción de microinvernaderos se cortaron tablas de madera de 56 × 30 cm. A estas tablas se les hicieron tres perforaciones en cada extremo, procurando no atravesar toda la tabla, con el fin de colocar arcos de alambre número 8.

Después de haber introducido las bandejas ya sembradas con los diferentes tratamientos, se prosiguió a cubrir el microinvernadero con una bolsa plástica y se le selló amarrando la misma al frente con un alambre de cobre emplasticado. Una vez sellados, los microinvernaderos se trasladaron a un invernadero con sarán que retiene el 60% de la luz.

Una vez trasladados y sellados los microinvernaderos, se procedió a regar una vez por semana con el fin de evitar la pérdida de humedad relativa. Esto se realizaba con una botella aspersora que emitía el agua en forma de nebulización. Los microinvernaderos se abrían lo menos posible con el fin de que no se escapara la humedad de los mismos y nuevamente se volvían a sellar después del riego.

Fuente: Castro, A (1999).

Anexo 6. Resultado de análisis de los substratos utilizados en la etapa IV de aclimatación de *Stevia rebaudiana*. Zamorano, Honduras, 2002.

# Lab	Muestra	pH (H ₂ O)	% N _{total}	ppm (Disponible)	
				P	K
1506	100 %Promix	LA 6.28	A 0.54	N/A 25	A 628
1507	75 % Promix 25 % Arena	LA 6.52	A 0.25	B 3	N 300
1508	50 % Promix 50% Arena	MLAL 7.20	B 0.04	B 3	B 122
1509	25% Promix 75% Arena	MLAL 7.39	B 0.05	B 2	B 82
1510	Suelo -arena- Compost (1:2:1)	MLA 6.65	M 0.19	A 618	A 1082
1511	Bokashi-arena- suelo (1:1:1)	MLAL 7.10	M 0.17	A 601	A 1570
<u>Interpretación:</u> A= Alto pH M= Medio LA= Levemente ácido B= Bajo MLA= Muy levemente ácido N= Normal MLAL= Muy levemente N/A= Normal/Alto alcalino.					

Fuente: Laboratorio de Suelos de la Carrera de Ciencia y Producción.

Anexo 7. Efecto del tipo y nivel de auxina en el número de días a formación de raíces (DFR) durante el enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.

Fuentes de Variación	GL	CME	Valor F	*P>F
Tipo de Auxina (TA)	2	1.13	5.77	0.0064
Nivel de Auxina (NA)	4	14.81	18.89	0.0001
TA × NA	6	6.89	1.15	0.0002
Total	12	22.83		
R ²	0.98		*P< 0.05	
C.V	2.57		¹ DFR: 17.22	

¹DFR= Días a formación de raíces.

Anexo 8. Rizogénesis de *Stevia rebaudiana* obtenidas a un nivel de 0.5 mg/l de ANA a los 15 días después de haber sido inducidas durante la etapa de enraizamiento *in vitro* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.



Anexo 9. Efecto del tipo y nivel de auxina en el porcentaje de vitroplantas enraizadas (PVE) de *Stevia rebaudiana* durante la etapa de enraizamiento *in vitro* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.

Fuentes de Variación	GL	CME	Valor F	*P>F
Tipo de Auxina (TA)	2	8.69	3.41	0.0410
Nivel de Auxina (NA)	4	8.71	3.45	0.0382
TA× NA	8	5.56	2.18	0.0450
R ²	0.68		*P< 0.05	
C.V	49.33		¹ NPE: 3.24	

¹NPE: Número de plantas enraizadas

Anexo 10. Efecto del tipo de auxina en el porcentaje de vitroplantas enraizadas (PVE) de *Stevia rebaudiana* durante la etapa de enraizamiento *in vitro* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.

Coeficiente de correlación de Pearson		
$P > r $ bajo la hipótesis nula $H_0: \rho = 0$		
Días a formación de raíces (DFR)	1.00000	0.07979
		0.4599
Dosis de Auxina	0.079790	1.00000

Anexo 11. Callogénesis observada en los tratamientos ausentes de auxinas ó con niveles de 0.5 mg/l de AIA en el medio nutritivo utilizado durante la etapa de enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2002.



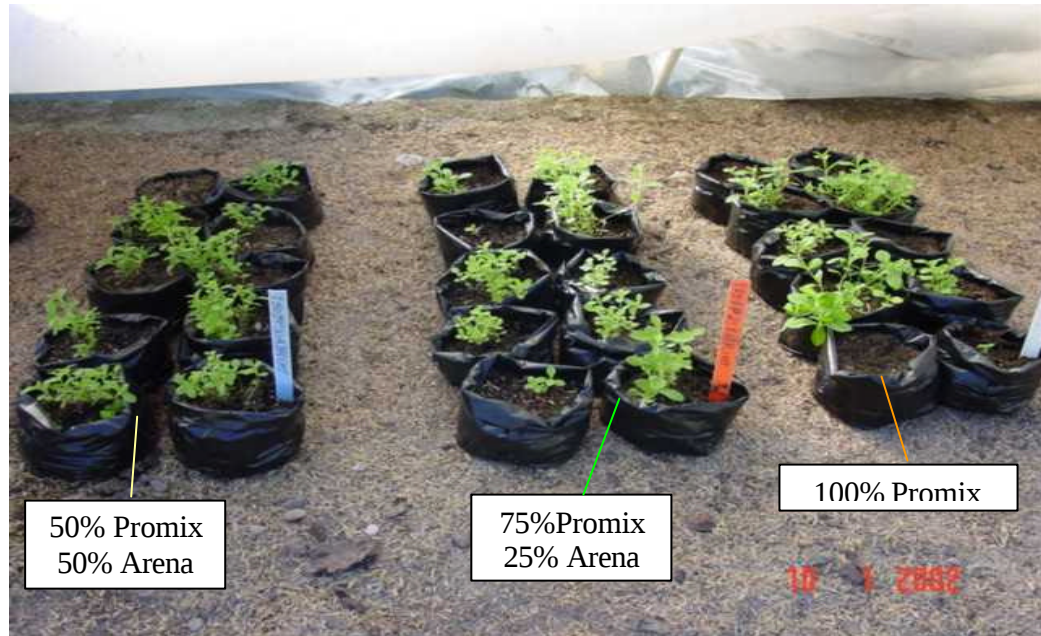
Anexo 12. Efecto del sistema de humedad y tipo de contenedor utilizado en el porcentaje promedio de vitroplantas sobrevivientes (PPS) durante la aclimatación de *Stevia rebaudiana* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.

Fuentes de Variación	GL	CME	Valor F	*P>F
Sistema (SI)	1	33611.1	124.04	0.000...
Substrato (SU)	2	705.6	1.30	0.292
Contenedor (CO)	1	1111.1	4.10	0.055
SI × SU	2	1372.2	2.53	0.102
SI × CO	1	11.1	0.04	0.841
SU × CO	2	338.9	0.63	0.544
SIS× CON× SUS	2	72.2	0.13	0.876
ERROR	22	5961.1		
Total	35			

Anexo 13. Efecto individual del sistema de humedad en la altura promedio de vitroplantas (APV) durante la aclimatación de *Stevia rebaudiana* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.

Fuentes de Variación	GL	CME	Valor F	*P>F
Sistema (SI)	1	16.703	5.23	0.040
Substrato (SU)	2	4.578	1.30	0.305
Contenedor (CO)	1	7.555	0.52	0.484
SI × SU	2	1.112	0.02	0.984
SI × CO	1	0.861	1.01	0.333
SU × CO	2	0.396	0.19	0.828
ERROR	13	13.492		
Total	24	60.129		

Anexo 14. Efecto del sistema de microtúneles utilizando bolsas plásticas, en la altura promedio de vitroplantas (APV) durante la aclimatación de *Stevia rebaudiana* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.



Anexo 15. Pudrición de plantas observada bajo un sistema de nebulización en bolsas plásticas durante la aclimatación de *Stevia rebaudiana* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2002.



Anexo 16. Efecto del tipo de sustrato en el porcentaje promedio de sobrevivencia (PPS) durante la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* utilizando bandejas multiceldas bajo un sistema de microinvernaderos (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.

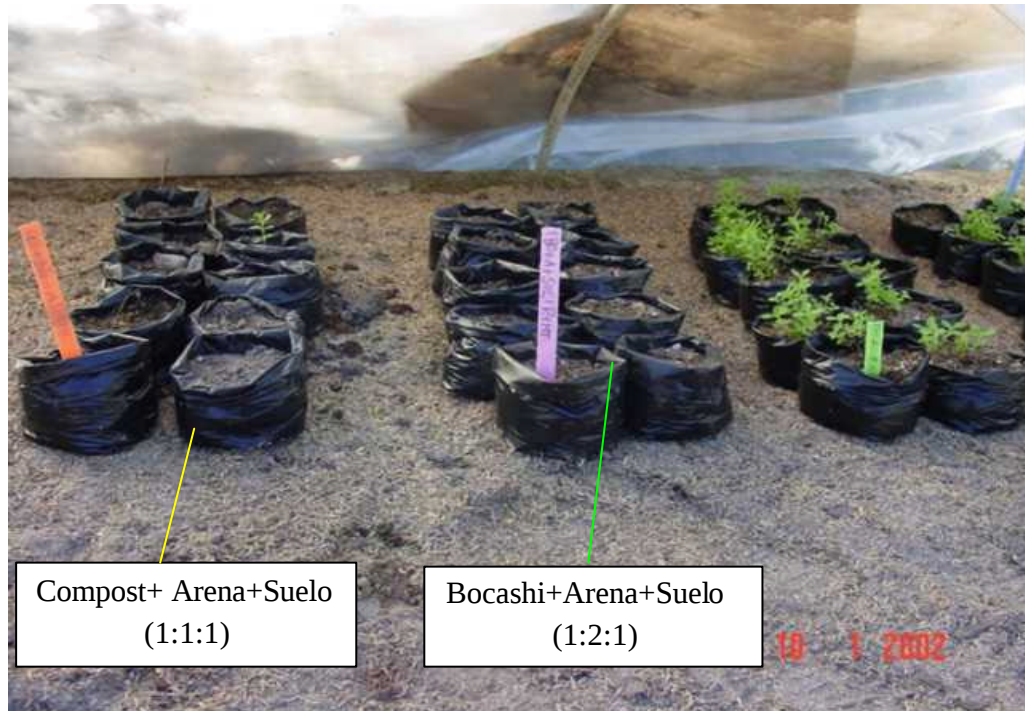
Fuente de Variación	GL	CME	Valor F	P>F
Substrato	5	8.93	1.06	0.4295
R ²	0.31			
CV	174.35		¹ NPP: 5.33	

¹ NPP: Número de plantas promedio

Anexo 17. Resumen de datos del Experimento 3 que influenció el porcentaje promedio de sobrevivencia (PPS) durante la aclimatación de *Stevia rebaudiana*. Zamorano. Honduras, 2002.

Substrato	Plantas sobrevivientes en cuarta semana
100% P	1
75%P / 25%A	9
50%P / 50% A	11
25%P / 75% A	9
Co+ A+ Sue (1:1:1)	0
Bo+ A+ Sue (1:2:1)	2
PROMEDIO	5.33

Anexo 18. Compactación observada en el sustrato de Compost, Arena y Suelo (1:1:1) en bolsas plásticas bajo un sistema de microtúneles durante la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.



Anexo 19. Compactación observada en el sustrato de Bocashi, Arena y Suelo (1:2:1) en bandejas multiceldas bajo un sistema de microinvernadero durante la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2002.

