

**Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B.
a partir de segmentos nodales**

Wilma Estefana Delvalle Báez

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Septiembre, 2001

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCION AGROPECUARIA

**Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos
nodales**

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

Por:

Wilma Estefana Delvalle Báez

Honduras: septiembre, 2001

Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales

Presentado por

Wilma Estefana Delvalle Báez

Aprobada:

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

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

Raúl Espinal, Ph.D.
Asesor

Antonio Flores, Ph.D.
Decano Académico

Pablo Emilio Paz, Ph.D.
Coordinador PIA

Keith L. Andrews, Ph.D.
Director General

Alfredo Rueda, Ph.D.
Coordinador de Area Temática

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 de autor.

Wilma Estefana Delvalle Báez

Zamorano, Honduras
Septiembre, 2001

DEDICATORIA

A mis padres Adriano y Virginia por todo el amor y el apoyo que me han brindado durante toda mi vida.

A mis hermanos Carlos, Zuny, Milton, Sixta, Rufo y Dominga que me han alentado a seguir adelante y poder cumplir mis objetivos.

A mis sobrinos por toda la ternura y el cariño que me han dado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen de Ca'acupe que me han acompañado en los tiempos más difíciles.

A mi familia por todo el amor y el apoyo incondicional que me han brindado siempre.

A la familia González – Valle por el cariño de padres que me dieron durante mi estadía en Honduras.

A Dinnie de Rueda por el apoyo, dedicación y el ánimo que me daba para seguir trabajando cada vez mejor, ya que valora mucho las cosas buenas que uno hace.

Al Dr Espinal por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Gracias Dr. por su confianza, amistad y consejos oportunos que nos ha dado y por haber sido un jefe y persona ejemplar!

A todo el equipo del Proyecto Frijol gracias por todo el apoyo que me han brindado

Al Dr. Antonio Flores por haberse preocupado de que yo terminara el PIA. Gracias por su confianza.

A mi colonia paraguaya por hacer que mis días en Zamorano sean mas alegres.

A Héctor Ruiz por todos los detalles que lo hacen ser un amigo tan especial.

A Cristina Iglesias por su amistad y cariño

A Rina por haber sido mi mejor compañera en Zamorano. Gracias por todos los buenos consejos, alagos y reproches que me has hecho.

A Wendy, Erica, Doña Bertha, Max y Juan Carlos por ser tan acogedor.

A mis queridos amigos Carlos Chango, Santos, Héctor Vanegas, todos han ayudado en realización de éste estudio. Gracias por todo su apoyo y cariño.

A Gabriel Da Souza y Mony, aunque no los conozca, siempre han estado conmigo.

A Zoila por toda su buena voluntad y colaboración para la realización de los experimentos en el laboratorio.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A la Cooperación Suiza para el Desarrollo (COSUDE) por haber financiado mis estudios en el Programa Agrónomo.

Al Proyecto USAID/ZAMORANO, componente Frijol por haberme dado la oportunidad de participar en el Programa Estudio – Trabajo que ha sido una experiencia muy enriquecedora, tanto en lo profesional como en lo personal.

RESUMEN

Delvalle, W. 2001. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 44 p.

La *Stevia rebaudiana* es una planta herbácea, perteneciente a la familia compositae, 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. El estudio se realizó con el propósito de establecer un protocolo de producción *in vitro* del cultivo a partir de segmentos nodales. En la etapa de establecimiento se evaluó la consistencia del medio (sólido y líquido), la concentración de macroelementos (50 y 100%), el tipo de citocinina (Kin y BAP) y el nivel de cada citocinina (0, 2, 4 y 6 μM) en el medio basal de Murashige y Skoog. El mayor tamaño de brotes resultó en el medio líquido con 50% de macroelementos y 6 μM de Kin. Este tratamiento fue sometido a nuevas evaluaciones de nivel de Kin (2, 4 y 6 μM) en la etapa de multiplicación para inducir más brotes y crecimiento. El mejor resultado se obtuvo en el medio con 6 μM de Kin. Todas las vitroplantas multiplicadas se transfirieron a un medio estándar de enraizamiento, pero formaron pocas raíces *in vitro*. Es recomendable analizar los costos de utilización del medio sólido o líquido, ya que no presentó diferencias en crecimiento de brotes durante la etapa de establecimiento, y ampliar las evaluaciones en la etapa de enraizamiento.

Palabras claves: Cultivo de tejidos, edulcorante natural, hierba dulce, micropropagación, reguladores de crecimiento.

Nota de Prensa

La Stevia, una alternativa de diversificación agrícola en Honduras

La *Stevia rebaudiana* es una planta originaria del Paraguay, considerada como el único edulcorante natural no calórico. Fue introducida a Honduras mediante la Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria (DICTA) como una alternativa de diversificación para los pequeños y medianos productores, ya que agronómicamente su producción es factible y se puede obtener muy buenos ingresos mediante la venta de hojas secas para la industrialización del “steviosido”. Se llama steviosido al conjunto de compuestos dulces que contiene la planta, aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa.

La Stevia es una alternativa al consumo de aspartame, ya que la calidad del dulzor es muy similar, siendo un producto completamente natural. Además tiene un poder edulcorante 2 veces más potente que el aspartame. Podemos decir que 1 kg de steviósido equivale aproximadamente a 2 kg de aspartame y a 300 kg de sacarosa o azúcar de caña.

En Zamorano se desarrolló un protocolo para la producción *in vitro* de Stevia a partir de segmentos nodales. Para el establecimiento se evaluó la concentración de macroelementos MS, la consistencia del medio (sólido y líquido), el tipo y nivel de cada citocinina (Kinetina y Bencilaminopurina). Para la etapa de multiplicación se evaluó el nivel de Kinetina (Kin), se validó una formulación nutritiva para el enraizamiento *in vitro* y se probó diferentes substratos y frecuencias de riego para su aclimatación.

Para la etapa de establecimiento el mejor tratamiento fue el de 6 μ M (micromoles) de Kin en un medio líquido al 50% de macroelementos MS, y este mismo tratamiento dio muy buenos resultados para la etapa de multiplicación, resultando en una tasa de multiplicación bastante elevada, 4 en el primer subcultivo y de 6 a 8 en los siguientes subcultivos.

Las vitroplantas fueron enraizadas en el laboratorio mediante la validación de un procedimiento de inducción de raíces *in vitro*. Las pruebas preliminares realizadas en la etapa de aclimatación no dieron muy buenos resultados por lo que se recomienda ampliar las evaluaciones en esta etapa.

La reproducción *in vitro* de Stevia es factible y es una alternativa para proveer de plántulas a los productores interesados en su producción

Lic. Sobeyda Alvarez

CONTENIDO

	Portadilla	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimiento a patrocinadores	vi
	Resumen	vii
	Nota de prensa.....	viii
	Contenido	ix
	Indice de Cuadros.....	x
	Indice de Figuras.....	xi
	Indice de Anexos.....	xii
1.	INTRODUCCION	1
1.1	IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.....	2
1.1.1	Reproducción sexual.....	2
1.1.2	Reproducción asexual.....	3
1.1.2.1	Por división o separación de macollos.....	3
1.1.2.2	Por esquejes.....	3
1.1.3	Propagación <i>in vitro</i>	3
1.2	JUSTIFICACION.....	4
1.2.1.1	Cultivo	4
1.2.2	Micropropagación	4
1.3	OBJETIVOS.....	4
1.3.1	Generales	4
1.3.2	Específicos	4
2.	REVISION DE LITERATURA.....	6
2.1	PROPAGACION <i>IN VITRO</i>	6
2.2	INDUCCION DE EMBRIOGENESIS SOMATICA DIRECTA....	6
2.3	INDUCCION DE ORGANOGENESIS DIRECTA.....	6
2.4	REGANOGENESIS DIRECTA A PARTIR DE PUNTOS DIRECTOS DE CRECIMIENTO.....	7
2.4.1	Apices meristemáticos.....	7
2.4.2	Segmentos nodales.....	7
2.5	ETAPAS EN EL PROCESO DE MICROPROPAGACION DE <i>STEVIA REBAUDIANA</i>	8
2.5.1	Etapa 0: Selección y preparación de plantas madres.....	8
2.5.2	Etapa I: Establecimiento o iniciación del cultivo.....	8
2.5.3	Etapa II: Multiplicación.....	9
2.5.4	Etapa III: Pre-transplante o enraizamiento <i>in vitro</i>	9
2.5.5	Etapa IV: Aclimatación y/o enraizamiento <i>ex vitro</i>	9

3.	MATERIALES Y METODOS	10
3.1	LOCALIZACION.....	10
3.2	DURACION.....	10
3.3	ORIGEN DE LAS PLANTAS.....	10
3.4	PLANTACION MADRE.....	10
3.4.1	Ubicación	10
3.4.2	Substrato	10
3.4.3	Riego y fertilización.....	10
3.4.4	Tratamiento fitosanitario	11
3.5	SELECCION DEL MATERIAL VEGETAL	11
3.6	ESTERILIZACION SUPERFICIAL Y PREPARACION DEL MATERIAL VEGETAL.....	11
3.6.1	Resultado del estudio preliminar sobre esterilización superficial del material vegetal.....	11
3.7	PREPARACION DE LOS EXPLANTES.....	12
3.8	ETAPA DE ESTABLECIMIENTO.....	12
3.8.1	Medio de cultivo	12
3.8.1.1	Preparación del medio de cultivo.....	14
3.8.1.2	Proceso de elaboración del medio de cultivo	15
3.8.2	Preparación de contenedores para medio líquido.....	15
3.8.3	Siembra e incubación <i>in vitro</i>	15
3.8.4	Toma de datos	16
3.9	ETAPA DE MULTIPLICACION	16
3.9.1	Medio de cultivo	17
3.9.2	Preparación del medio de cultivo.....	17
3.9.3	Transferencias	17
3.9.4	Toma de datos.....	17
3.9.5	Subcultivos	18
3.10	ETAPA DE ENRAIZAMIENTO.....	18
3.10.1	Toma de datos.....	19
3.11	ETAPA DE ACLIMATACION.....	19
4.	ANALISIS ESTADISTICO.....	20
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	21
5.1	ETAPA I (ESTABLECIMIENTO).....	21
5.1.1	Tamaño Promedio de Brotes por Explante (TPBE) a los 15 días después de siembra (dds).....	21
5.1.2	Tamaño Promedio de Brotes por Explante (TPBE) a los 8 días después de siembra (dds).....	21
5.1.3	Brotación	23
5.1.4	Contaminación	23
5.1.5	Efectos individuales de las principales variables en el Tamaño Promedio de Brotes por Explante (TPBE) a los 15 días después de siembra (dds).....	24
5.1.5.1	Efecto de la concentración de macroelementos en el Tamaño Promedio de Brotes por explante.....	24
5.1.5.2	Efecto de la consistencia del medio en el Tamaño Promedio de Brotes por explante.....	24

5.1.5.3	Efecto del tipo y nivel de citocinina en el Tamaño Promedio de Brotes por explante.....	24
5.1.6	Efecto de las interacciones en el Tamaño Promedio de Brotes por Explante.....	24
5.2	ETAPA II (MULTIPLICACION).....	25
5.2.1	Número Promedio de Brotes por Explante (NPBE).....	25
5.2.1.1	Efecto del nivel de Kin en el Número Promedio de Brotes por Explante.....	25
5.2.2	Tamaño Promedio de Brotes por explante.....	25
5.2.3	Contaminación.....	26
5.3	RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS EN LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACION...	27
5.4	ETAPA III (ENRAIZAMIENTO).....	28
5.5	ETAPA IV (ACLIMATACION).....	28
6.	CONCLUSIONES.....	29
6.1	MATERIAL VEGETAL.....	29
6.2	ESTERILIZACION SUPERFICIAL DEL MATERIAL VEGETAL.....	29
6.3	ETAPA DE ESTABLECIMIENTO	29
6.4	ETAPA DE MULTIPLICACION.....	30
6.5	ETAPA DE ENRAIZAMIENTO.....	30
6.6	ETAPA DE ACLIMATACION.....	30
7.	RECOMENDACIONES.....	31
8.	BIBLIOGRAFIA.....	32
9.	ANEXOS.....	33

INDICE DE CUADROS

Cuadro		
1	Ensayo sobre esterilización superficial de explantes de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	11
2	Evaluación de formulaciones nutritivas para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	13
3	Formulación y preparación del medio nutritivo utilizado para el establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	14
4	Composición del medio basal nutritivo Murashige y Skoog con 100% de macroelementos utilizado para el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	19
5	Efecto de la concentración de macroelementos MS en el medio, consistencia del medio, tipo de citocinina y nivel de citocinina en el tamaño promedio de brotes por explante a los 15 días después de la siembra, durante el establecimiento <i>in vitro</i> del cultivo, Zamorano, Honduras, 2001.....	24
6	Efecto del nivel de Kinetina (Kin) en el número Promedio de Brotes por Explante (NPBE) durante la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	26
7	Efecto del nivel de Kinetina (Kin) en el Tamaño Promedio de Brotes por Explante (TPBE) durante la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	26
8	Resumen de los efectos principales de los tratamientos en el Tamaño Promedio de Brotes por Explante (TPBE) en las etapas de establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	27

INDICE DE FIGURAS

Figura

1	Efecto de la concentración de macronutrientes MS en el tamaño promedio de brotes por explante (TPBE) a los 8 y 15 días después de siembra (dds), Zamorano, Honduras, 2001.....	23
2	Efecto del tipo y nivel de citocinina en el Tamaño Promedio de Brotes por Explante (TPBE) a los 8 y 15 días después de siembra (dds), Zamorano, Honduras, 2001.....	24

INDICE DE ANEXOS

Anexo		
1	Composición de la solución hidropónica utilizada para la fertilización de la plantación madre de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	34
2	Ramas de brotación joven de <i>Stevia rebaudiana</i> utilizados para la obtención de explantes para el establecimiento <i>in vitro</i> del cultivo, Zamorano, Honduras, 2001.....	35
3	Contaminación por hongo observada durante el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	36
4	Contaminación por bacteria observada durante el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	36
5	Brotos observados a simple vista durante el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> ,	37
6	Explante utilizado para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	38
7	Explante sembrado en medio sólido durante el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	39
8	Explante sembrado en medio líquido durante el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	39
9	Tamaño inicial de los explantes transferidos al medio de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	40
10	Efecto de la concentración de macroelementos MS, consistencia del medio, tipo y nivel de citocinina en el tamaño promedio de brotes por explante (TPBE) de <i>Stevia rebaudiana</i> a los 15 días después de siembra <i>in vitro</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	41
11	Efecto de la concentración de macroelementos MS, consistencia del medio, tipo y nivel de citocinina en el tamaño promedio de brotes por explante (TPBE) de <i>Stevia rebaudiana</i> a los 8 días después de siembra <i>in vitro</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	41

12	Efecto del nivel de Kinetina en el número promedio de brotes por explante (NPBE) de <i>Stevia rebaudiana</i> durante la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	42
13	Raíces <i>in vitro</i> formadas durante la Etapa de enraizamiento de <i>Stevia rebaudiana</i> , Zamorano, Honduras, 2001.....	43

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AIA	Acido 3-indolacético
AIB	Acido 3-indolbutírico
ANA	Acido &-naftalenacético
BA	Benciladenina
BAP	Bencilaminopurina
Cma	Concentración de macroelementos MS
Cme	Consistencia del medio
dds	Días después de la siembra
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
KOH	Hidróxido de potasio
Kin	Kinetina
LS	Linsmaier y Skoog
MS	Murashige y Skoog
mg/l	miligramos por litro
μM	Micromoles
NaOCl	Hipoclorito de Sodio
NC	Nivel de citocinina
NPBE	Número promedio de brotes por explante
TC	Tipo de citocinina
TPBE	Tamaño promedio de brotes por explante
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
2 ip	6 - (γ, γ- dimetilalilamino) purina

1. INTRODUCCION

La *Stevia rebaudiana*, comúnmente conocida como “ka’a he’e”, hierba dulce o simplemente Stevia es una planta herbácea (0.80-1.20 m de altura), semiperenne (6-8 años), perteneciente a la familia compositae, tribu Eupatoriae. Esta especie nativa de la zona norte de la región oriental del Paraguay, es conocida desde épocas inmemoriales por los nativos guaraníes por su poder edulcorante y algunas propiedades medicinales.

La tecnología relacionada con su cultivo evolucionó considerablemente desde que el sabio Moisés S. Bertoni lo descubrió e identificó taxonómicamente (1905), y luego que el agrónomo Juan B. Aranda y su esposa comenzaron a establecer los métodos de multiplicación y de producción que condujeron a su “domesticación” (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1994).

Por otro lado, el químico Ovidio Rebaudi realizó los primeros estudios sobre la composición química de la planta e identificó sus compuestos dulces. Eventualmente esos compuestos dulces fueron considerados como edulcorante natural no calórico, con un poder edulcorante aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa. Los steviosidos están compuestos solamente de Carbono, Hidrógeno y Oxígeno, siendo su fórmula química $C_{38} H_{60} O_{18}$ (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1994), a diferencia de la sacarosa cuya composición química es $C_{12} H_{22} O_{11}$.

Los compuestos edulcorantes son diterpenoides formados por nueve glucósidos, cuyo contenido promedio en las hojas son los siguientes. steviosido (10%); rebaudiosidos A, C, D, E (3-4%); dulcósidos A, B; isosteviol; steviol-glicósido (en proporciones menores al 1%). Entre estos componentes, el rebaudiosido A, es el que presenta mayor grado de dulzor siendo aproximadamente 400 veces más dulce que la sacarosa. Actualmente se denomin.a steviosido total al conjunto de todos estos componentes (Molinas, 1989).

En el año de 1967 fueron enviadas muestras de la planta al Japón, donde comenzaron una serie de estudios y en donde actualmente se concentra la industria, comercialización y los mayores conocimientos acerca de la planta.

1.1 Importancia del estudio

La importancia de este estudio radica en buscar un método alternativo de reproducción clonal para producir mayor cantidad de plantines en menor tiempo, para proveer a productores interesados en su comercialización e industrialización. La propagación de la Stevia fuera de su ambiente natural, puede tener complicaciones utilizando métodos tradicionales de propagación. Los métodos de propagación mas comunes son los siguientes.

1.1.1 Reproducción sexual

Bajo condiciones naturales, la Stevia se reproduce por semilla, pero éste proceso de multiplicación para fines comerciales tiene varias desventajas.

- Las semillas son viables únicamente cuando las flores provienen de una polinización cruzada, generalmente por abejas; por lo que se recomienda tener 3 a 4 apiarios por Ha de Stevia (Molinas, 1989). Esto conlleva a una floración desuniforme, además de una alta heterogeneidad en la población. Se puede identificar la viabilidad de las semillas observando su color: oscuro si la semilla está fértil y claro si la semilla es infértil.
- 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.
- Considerando que las plantas de Stevia son altamente autoincompatibles, la mayoría de la variación se debe probablemente a la segregación de genes. Esta segregación dificulta mantener la estabilidad e integridad genética de los cultivares seleccionados por su alto contenido de steviosido. Para evitar la segregación y mejorar el rendimiento de steviosido es necesario utilizar métodos vegetativos de propagación para obtener poblaciones genéticamente homogéneas de plantas seleccionadas con caracteres deseables (Tamura *et al.*, 1984)
- Trabajar con semilla es a veces un trabajo difícil, considerando que las semillas son muy pequeñas y rápidamente pierden su capacidad de germinación. (Lyakhovkin *et al.*, 1993).

1.1.2 Reproducción asexual.

1.1.2.1 Por división o separación de macollos. Este método es el más usado por los pequeños cultivadores. Una planta puede proveer 3 a 4 plántulas por año. Estas plantas tienen sus propios sistemas radiculares que pueden ser divididos y fácilmente regenera una nueva planta (Molinas, 1989).

La calidad y la cantidad de brotes que conforman cada cepa están directamente relacionados, entre otros factores, con la edad y el manejo del cultivo que se ha de llevar a cabo para la obtención del material de propagación. Por ello se recomienda escoger para este fin una plantación constituida por cepas vigorosas de 3 a 4 años, las cuales pueden contar con 20 o más brotes. La extracción de cepas se debe realizar a inicios de la brotación (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1994).

1.1.2.2 Por esqueje. Consiste en pedazos de tallo, principalmente terminales, provenientes de brotes nuevos que crecen después de una poda o cosecha. El tallo debe ser tratado con hormonas enraizadoras para facilitar la formación de suficientes raíces para sobrevivir al trasplante en su lugar definitivo.

Según Cenóz *et al.* (1997), la propagación vegetativa de la Stevia por medio de esquejes apicales es factible utilizando hormonas enraizadoras y un sustrato consistente en una mezcla de arena y compost; con estos tratamientos se puede lograr un prendimiento de hasta un 70 %. Adicionalmente se ha observado que las estacas terminales o apicales enraízan mejor. Este método de propagación, aunque no muy generalizado, es una alternativa de buena factibilidad económica, dada la rapidez de propagación y la posibilidad de realizarlo con poco material vegetal.

1.1.3 Propagación *in vitro*

Es un método alternativo para producir mayor cantidad de plantines en menor tiempo. Lyakhovkin *et al.* (1993) reporta 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 75% de sobrevivencia. Además, La clonación *in vitro* es la técnica más factible a la hora de realizar mejoramiento genético, ya sea para la obtención de plantas uniformes y con alto contenido de steviosido y rebaudiosido A (glucósidos de mayor poder edulcorante), así como para lograr plantas con mayor rendimiento en hojas.

1.2 Justificación

1.2.1 Cultivo

- Es un cultivo de interés nacional, como un rubro de diversificación
- Es un cultivo de gran potencial económico, sabiendo que el steviosido puede ser usado como edulcorante natural no calórico, ya que no es asimilado por el organismo humano, puede ser utilizado como azúcar dietético. Existen industrias a nivel nacional e internacional interesados en la extracción del steviosido.
- Diferentes zonas agroecológicas de Honduras son favorables para la producción de Stevia.
- La ubicación geográfica de Honduras favorece la exportación.

1.2.2 Micropropagación

- Este estudio es la primera investigación realizada en micropropagación de la *Stevia rebaudiana*, en Honduras
- El protocolo de producción desarrollado servirá como guía a otros laboratorios de investigación y/o producción.
- El estudio servirá como base para posteriores investigaciones en temas relacionados a su propagación *in vitro*.

1.3 Objetivos

1.3.1 Generales

- Desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* a partir de segmentos nodales.

1.3.2 Específicos

- Evaluar el medio basal Murashige y Skoog (MS) a diferentes concentraciones de macroelementos para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.
- Evaluar la consistencia del medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.
- Evaluar el tipo de citocinina para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.

- Evaluar el nivel de citocinina para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*
- Evaluar el nivel de Kinetina que promueva una mejor proliferación de brotes durante la multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.
- Validar un protocolo estándar para el enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.
- Validar substratos para la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana*.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Propagación *in vitro*

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 mas en las técnicas de micropropagación.

Varias técnicas de cultivo de tejido exitosas han sido reportadas, no obstante un limitado número de ellas han sido publicados en forma clara.

2.1.1 Inducción de embriogénesis somática directa

Embriones somáticos asexuales o adventicios son aquellos iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979; citado por CIAT, 1993). Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical que no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser también capaces de crecer y formar plantas normales (CIAT, 1993).

En estudios realizados en el Instituto Agronómico de Paraná, embriones somáticos de *Stevia rebaudiana* fueron inducidos directamente a partir de hojas cultivadas *in vitro* en medio basal MS con 2,4 - D (10-25 mM) y BAP (1 mM) y con una alta concentración de sacarosa (120 g/l). Sin embargo los embriones somáticos no maduraron y cuando fueron inoculados en medio MS sin reguladores de crecimiento formaron raíces, pero no formaron parte aérea. (Bespalhok *et al.*, s.f.)

2.1.2 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 (Tran Thanh Van, citado por CIAT, 1993).

Ferreira y Handro (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*.

2.1.3 Organogénesis directa a partir de puntos directos de crecimiento

2.1.3.1 Apices 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). Una examinación anatómica 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. (Tamura *et al.*, 1984).

2.1.3.2 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. Este es el método más natural y común de propagación vegetativa de las plantas *in vitro*. Cada una de las yemas que se encuentra en las axilas de las hojas, idénticas a las del ápice del tallo, pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, desarrolladas *in vitro* y repicadas cuando es necesario (Pierik, 1990).

En 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*)¹.

¹ Alvarez, E. 2001. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*. Ca'acupe, Paraguay, Instituto Agronómico Nacional. (Comunicación personal)

2.2 Etapas en el proceso de micropropagación de *Stevia rebaudiana*

Según CIAT (1990) la mayoría de las plantas cultivadas *in vitro* pasan por las siguientes etapas en el proceso de micropropagación:

2.2.1 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.

2.2.2 Etapa I: Establecimiento o iniciación del cultivo

El objetivo de esta etapa es llegar a establecer un cultivo aséptico *in vitro* del material vegetal que se ha seleccionado. Esta etapa involucra la selección, preparación y desinfección del explante escogido, y su cultivo aséptico *in vitro*. El tipo de medio a utilizar en esta etapa depende de la especie con que se está trabajando y del tipo de explante.

Varios tipos de respuesta se pueden presentar en esta etapa:

- a) No hay respuesta visible por parte del explante a su adaptación *in vitro*
- b) Contaminación
- c) Iniciación de callo a partir de las superficies cortadas del explante, mas regeneración indirecta de yemas adventicias.
- d) Regeneración directa a través de la estimulación de brotes axilares, o a la iniciación de brotes adventicios a partir de explantes de tallos, hojas, escapos florales, cotiledones, y otros órganos.

En la etapa primera de establecimiento, en el caso de que se busque la estimulación de brotes axilares a partir de puntos directos de crecimiento:

- Se debe agregar citocinina en un rango de aproximadamente 0.5-1 mg/l de cualesquiera de las citocininas: BAP, Kin o 2iP; y
- Se debe mantener el nivel de auxinas muy bajo en un rango de 0.01-0.1 mg/l, o debe ser omitida completamente.

Por lo general los explantes pasan de 4 a 6 semanas en etapa I antes de estar listos para la siguiente etapa. Plantas leñosas requieren de un mayor tiempo que puede ser hasta de un año.

2.2.3 Etapa II: Multiplicación

En esta etapa el objetivo es alcanzar un nivel de multiplicación óptimo sin perder la estabilidad genética del cultivo. Para esta etapa el explante ya ha crecido y se ha desarrollado en un grupo de microesquejes provenientes directamente del explante o de una masa basal de tejido semejante a callo. Esta masa de brotes se divide y se transplanta a un medio fresco con la misma composición. Este proceso denominado “subdivisión”, “subcultivo” o “repique”, se repite cuantas veces sea necesario (generalmente de 4 a 6) y como se mencionó antes, sin dañar la estabilidad genética del cultivo.

El tipo de medio a utilizar depende del genotipo y el tipo de explante. En algunos casos el medio etapa II tiene la misma composición que el medio etapa I, pero a menudo sucede que el nivel de citocinina y de algunos minerales se incrementa en el medio etapa II. Si algunos ajustes son necesarios, éstos se encuentran mediante la experimentación.

2.2.4 Etapa III: Pre-transplante o enraizamiento *in vitro*

Esta etapa involucra la preparación de las vitroplantas en el laboratorio para su transplante a su ambiente natural de invernadero y posteriormente al campo si así se requiere. Durante la etapa III los microesquejes enraízan en un ambiente de reducido nivel de carbohidratos y mayores niveles de luz.

Para la diferenciación de raíces se requieren medios con una relación baja de citocinina:auxina. (CIAT, 1993) o que contengan solamente auxina. El tipo de medio a utilizar depende así mismo de la especie, el cultivar y el tipo de cultivo.

2.2.5 Etapa IV: Aclimatación y/o enraizamiento *in vivo*

La transferencia de plantas regeneradas *in vitro* (vitroplantas) al invernadero es un proceso sistemático que requiere de mucho cuidado ya que estas plantas son particularmente susceptibles a una excesiva deshidratación inmediatamente después de que se las retira del contenedor en que han estado creciendo en el laboratorio. Si no se toman las medidas necesarias para realizar la aclimatación, las pérdidas de vitroplantas pueden ser muy grandes.

La aclimatación de las vitroplantas se realiza en invernadero bajo condiciones controladas de luminosidad, humedad y temperatura. El tiempo de endurecimiento depende mucho de la rusticidad de las especies. Esta etapa puede durar de 45 a 60 días aproximadamente.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de Zamorano, Zamorano, Honduras.

3.2 Duración

El ensayo se realizó en el periodo comprendido entre enero y agosto de 2001.

3.3 Origen de las plantas

Las plantas madres de Stevia fueron proveídas por la Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria (DICTA), de la Secretaría de Agricultura y Ganadería de Honduras. Estos son clones mejorados con 13% de steviosido, traídos desde Canadá.

3.4 Plantación madre

3.4.1 Ubicación

Las plantas madres se mantuvieron bajo invernadero en condiciones controladas de riego e intensidad lumínica, en maceteros grandes de aproximadamente 10 litros de capacidad.

3.4.2 Substrato

Las plantas madres se mantuvieron en un substrato hidropónico, compuesto por casulla de arroz y arena

3.4.3 Riego y Fertilización

Las plantas madres fueron regadas dos veces al día (evitando mojar las hojas) la primera con solución hidropónica A (macroelementos) y B (microelementos) (Anexo 1), y la segunda con abundante agua, hasta que el substrato quede completamente húmedo.

3.4.4 Tratamiento fitosanitario

Las plantas madres fueron fumigadas semanalmente, durante un mes, previo al establecimiento del ensayo, con las siguientes soluciones.

- Bactericida (Agri-mycin[®] – 16.5 WP. 1.5 g/l)
- Fungicida (Benlate[®] 50 WP. 0.8 g/l)
- Insecticida (Vydate[®] 24 SL. 6 ml/l)

3.5 Selección del material vegetal

Se colectaron ramas de brotación joven de unos 10 a 12 cm de longitud (Anexo 2), realizando los cortes con tijeras de podar bien desinfectadas con alcohol al 70%. Se recolectaron las ramas en horas tempranas de la mañana para evitar que se deshidrataran.

3.6 Esterilización superficial y preparación del material vegetal

Se realizaron unas pruebas preliminares de esterilización superficial del material, para facilitar el establecimiento *in vitro* del cultivo. Se probaron cuatro concentraciones de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) y cuatro tiempos de exposición de los materiales al NaOCl, para un total de 16 tratamientos (Cuadro 1). 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. Se sembraron 10 tubos por tratamiento.

Cuadro 1. Ensayo sobre esterilización superficial de explantes de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.

Concentración de NaOCl (%)	Tiempo de exposición (min)			
	10	15	20	25
1.2	(1) *	(2)	(3)	(4)
1.6	(5)	(6)	(7)	(8)
1.8	(9)	(10)	(11)	(12)
2.0	(13)	(14)	(15)	(16)

* Número de tratamiento

3.6.1 Resultado del estudio preliminar sobre esterilización superficial del material vegetal.

La menor contaminación (11%) se presentó con la exposición de los explantes durante 15 min. a una solución de NaOCl al 1.2%. Se consideraron las siguientes variables:

- Número de explantes y contenedores contaminados.

- Tipo de contaminación: se identificó contaminación por hongos (Anexo 3) y bacterias (Anexo 4). Resultó que la mayor parte de los tratamientos fueron contaminados por bacterias y unos pocos por hongos.
- Grado de clorosis: se usó una escala de 0 a 4 en base al porcentaje de área clorótica del explante:
 - C0: sin clorosis
 - C1: clorosis leve (0-25%)
 - C2: clorosis media (25-50%)
 - C3: clorosis alta (50-75%)
 - C4: clorosis total (75-100%)
- Número de explantes brotados: un explante brotado se consideró a partir del surgimiento de un brote visible a simple vista (Anexo 5).

Se concluye que los pasos a seguir para una desinfección superficial del material, son los siguientes:

1. Deshojar las ramas y lavarlas con agua destilada esterilizada.
2. Desinfectar las ramas con alcohol al 70% durante 30 segundos, mantenidos en un recipiente en agitación. Luego escurrirlos completamente.
3. Sumergir las ramas desinfectadas durante 15 min. en una solución desinfectante de NaOCl al 1.2%, mas tres gotas de "Tween 20" por cada 100 ml de solución. Mantener en agitación constante.
4. A nivel de la Cámara de Flujo Laminar se debe realizar tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

3.7 Preparación de los explantes

A nivel de la Cámara de Flujo Laminar, las ramas desinfectadas fueron divididas en segmentos nodales, conteniendo por lo menos una yema axilar. Estos segmentos nodales medían aproximadamente 1.5 a 2 cm de longitud y de 2 a 3 mm de grosor (anexo 6).

3.8 Etapa de establecimiento

3.8.1 Medio de cultivo

Durante la etapa de establecimiento *in vitro* del cultivo se utilizó el medio basal Murashige y Skoog (MS). Para esta etapa se evaluaron dos concentraciones de macroelementos del medio nutritivo (50 y 100%), dos consistencias del medio (sólido y líquido), dos tipos de citocinina (Kin y BAP), y cuatro niveles para cada tipo de citocinina (0, 2, 4 y 6 μ M), para un total de 36 tratamientos (Cuadro 2). Cada tratamiento consistió en 3 réplicas y cada réplica tuvo un total de 10 unidades experimentales.

Cuadro 2. Evaluación de formulaciones nutritivas para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.

# Tto.	Concentración de macroelementos MS	Consistencia del medio	Tipo de citocinina	Nivel de citocinina (μM)
1	50%	SÓLIDO	Kin	2
2				4
3				6
4				8
5			BAP	2
6				4
7				6
8				8
9				Testigo
10		LÍQUIDO	Kin	2
11				4
12				6
13				8
14			BAP	2
15				4
16				6
17				8
18				Testigo
19	100%	SÓLIDO	Kin	2
20				4
21				6
22				8
23			BAP	2
24				4
25				6
26				8
27				Testigo
28		LÍQUIDO	Kin	2
29				4
30				6
31				8
32			BAP	2
33				4
34				6
35				8
36				Testigo

3.8.1.1 Preparación del medio de cultivo. El medio de cultivo basal MS utilizado para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* fue modificado según los resultados obtenidos en el estudio (Cuadro 3).

Cuadro 3. Formulación y preparación del medio nutritivo utilizado para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.

Compuestos	Cantidad final en el medio de cultivo (mg/l)	Solución madre: cantidad (mg) disuelto en 1 l de agua destilada	Cantidad de solución madre por litro de medio (ml)
Macroelementos 50% MS		10X	
KNO ₃	950.000	9,500.000	100.0
NH ₄ NO ₃	825.000	8,250.000	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	220.000	2,200.000	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185.000	1,850.000	
KH ₂ PO ₄	85.000	850.000	
Microelementos 100% MS		1000X	
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.300	22,300.000	1.0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.600	8,600.000	
H ₃ BO ₃	6.200	6,200.000	
KI	0.830	830.000	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	25.000	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.250	250.000	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	25.000	
Solución de Hierro		200X	
FeNaEDTA	50.000	10,000.000	5.0
Azúcar - alcohol			
M-Inositol	100.000		
Vitaminas		Dilución (mg/ml)	
Tiamina HCl	0.400	1:1	0.4
Acido nicotínico	0.500	1:1	0.5
Piridoxina HCl	0.500	1:1	0.5
Otros compuestos			
Sacarosa	30,000.000	No requieren preparación de soluciones madres	
Phytigel	0		
pH	5.8		

Fuente: Pierik (1990), adaptado por el autor.

3.8.1.2 Proceso de elaboración del medio de cultivo. En un beaker de vidrio, se coloca la mitad del volumen de agua destilada del total final de medio de cultivo deseado, luego se agregan los macroelementos, FeNa EDTA, microelementos, vitaminas y sacarosa en las cantidades recomendadas. Se mantiene en agitación constante hasta que todos los componentes estén completamente disueltos. Finalmente se aforó al volumen final deseado en frascos volumétricos.

Para el establecimiento del cultivo se preparó 10.8 litros de medio, que fue dividido en porciones de 300 ml para cada uno de los 36 tratamientos, en beakers de 500 ml. A cada beaker se le 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 el Phytigel a razón de 3 g/l a los tratamientos en sólido; al añadir el Phytigel, se calentó el medio nutritivo en un microondas para poder disolver el agente gelatinizador. 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. Los tubos fueron tapados y esterilizados en un autoclave por 20 min. a una temperatura de 120 °C y 15 PSI de presión.

3.8.2 Preparación de contenedores para medio líquido

Para los tratamientos con medio líquido, los contenedores fueron previamente preparados de la siguiente manera: se cortó papel filtro de 5.5 cm de largo y 1.5 cm de ancho que fueron colocados en forma de puente dentro de cada tubo de ensayo (25*150 mm). Al colocar el papel filtro dentro del contenedor se debe evitar que éste se hunda en el medio de cultivo o que quede muy alto de manera que las plantas no puedan absorber eficientemente los nutrientes.

3.8.3 Siembra e incubación *in vitro*

Se sembraron aleatoriamente 10 tubos de ensayo de cada tratamiento por día, considerando que se realizó un diseño estadístico de Bloques Completos al azar. Se realizó bloqueo por días de siembra debido a la cantidad de tratamientos que dificultó realizar la siembra en un solo día. Se utilizó un segmento nodal por cada tubo de ensayo.

Tratamientos sólidos. Cada segmento nodal se ubicó en forma vertical al medio (Anexo 7) de manera que aproximadamente 0.5 cm de la porción distal a la yema axilar fue introducido en el medio de cultivo.

Tratamientos líquidos. Cada segmento nodal se ubicó en los tubos de ensayo en forma horizontal sobre un puente de papel filtro (Anexo 8).

Los tubos fueron colocados en gradillas en el cuarto de crecimiento, el cual permanece a una temperatura de 21 °C, con un fotoperíodo de 16 horas luz, utilizando tubos fluorescentes del tipo blanco frío.

3.8.4 Toma de datos

La revisión de los cultivos contaminados y/u oxidados se comenzó el tercer día después de la siembra y, a partir de allí cada 8 días. Los explantes contaminados, ya sea por hongo ó bacteria, y los explantes oxidados completamente, fueron descartados para evitar una contaminación cruzada hacia los tubos no contaminados.

Las variables de interés fueron tomadas a los 8 y 15 días después de siembra, tratando de realizarlo siempre a la misma hora. Se tomaron datos de cada tubo individualmente. Las variables evaluadas fueron las siguientes.

1. Número de explantes y contenedores contaminados
2. Tipo de contaminación: Hongo o bacteria
3. Clorosis: El grado de clorosis fue medido en una escala de 0 a 4. Los explantes que presentaron oxidación alta y oxidación total fueron descartados.
C0: sin clorosis.
C1: clorosis leve (0-25%)
C2: clorosis media (25-50%)
C3: clorosis alta (50-75%)
C4: clorosis total (75-100%)
4. Brotación: SI o NO, esto para medir sobrevivencia de los explantes
5. Número de brotes por explante: se consideró un explante brotado a partir del surgimiento de un brote visible a simple vista.
6. Tamaño de cada explante: se midió en forma aproximada con una regla milimetrada desde la parte externa del tubo de ensayo.

3.9 Etapa de Multiplicación

A los 30 días después de la siembra los explantes alcanzaron suficiente ramificación y se procedió al repicado en un medio basal MS con 50% macroelementos (Cuadro 3) y la adición de correspondiente de Kin. Los explantes que sobrepasaron los 30 días en el medio de establecimiento se fueron debilitando, ya que el medio no contenía suficiente cantidad de nutrientes para mantener el crecimiento del cultivo.

3.9.1 Medio de cultivo

Los dos mejores tratamientos que superaron la etapa de establecimiento fueron:

- 50% macroelementos MS en medio Líquido, con 6 μM de Kin.
- 50% macroelementos MS en medio Líquido, con 4 μM de Kin.

Estos dos tratamientos fueron sometidos a nuevas pruebas hormonales en la etapa de multiplicación: 2, 4 y 6 μM de Kin, para un total de 6 tratamientos. Se utilizó un medio líquido basal MS con 50% macroelementos, resultado del mejor tratamiento en la etapa de establecimiento. Se utilizó 10 repeticiones por tratamiento.

3.9.2 Preparación del medio de cultivo

El procedimiento que se siguió fue similar al realizado para preparar el medio de establecimiento. Se preparó 600 ml de medio de cultivo, que fue dividido en porciones de 100 ml por tratamiento en beaker de 300 ml. A cada beaker se agregó la dosis correspondiente de Kin en prueba. El pH fue ajustado a 5.8.

3.9.3 Transferencias

Los microesquejes que fueron desarrollados en el contenedor en la etapa I, fueron sacados del medio a los 30 días, se colocaron en un plato de Petri y se volvieron a cortar en segmentos nodales 1 a 1.2 cm de longitud. El grosor de cada explante fue de aproximadamente 1 a 2 mm. Estos explantes fueron transplantados a un medio fresco (Cuadro 3), sobre los puentes de papel filtro para sujetar el material, considerando que el medio utilizado fue líquido. se colocó un explante por tubo de ensayo de forma horizontal al puente. El tubo fue flameado, tapado y sellado con parafilm, para luego ser trasladados al cuarto de crecimiento nuevamente.

3.9.4 Toma de datos

Se tomaron datos del tamaño inicial de los explantes transplantados a etapa II, para considerarlo como una covariable al momento del análisis estadístico.(anexo 9.)

La revisión de contaminados y oxidación se realizó al tercer día y luego cada 8 días. Los explantes contaminados ya sean por hongos y/o bacterias y los que presentaron necrosis severa fueron sacados del cuarto de crecimiento. La toma de datos de las variables de interés se realizaron los días 8 y 15 después de siembra.

Las variables se analizaron con los mismos criterios que en la etapa de establecimiento. Las variables consideradas fueron:

1. Número de contaminados: por hongos o bacterias.
2. Número de brotes por explante
3. Tamaño de brotes

3.9.5 Subcultivos

Los microesquejes fueron subcultivados en el mejor medio resultante del ensayo en la etapa II (50% macroelementos MS líquido con 2 μ M de Kin). Se realizaron 3 subcultivos en total, cada 20-25 días.

3.10 Etapa de enraizamiento

Las *vitroplantas* provenientes de la etapa de multiplicación, fueron transplantadas a un medio sólido basal MS con 100% de macroelementos y la adición de 0.1 mg/l de AIB (Cuadro 4), para el desarrollo de raíces *in vitro*.

Cuadro 4. Composición del medio basal nutritivo Murashige y Skoog con 100% macroelementos utilizado para el enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.

Compuestos	Cantidades (mg/l)
Macroelementos MS 100%	
NH ₄ NO ₃	1650.000
KNO ₃	1900.000
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
KI	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
Reguladores de Crecimiento	
AIB	0.100
Azúcares	
Sacarosa	35,000.000
Agente gelatinizador	
Phytigel	2,500.000
PH=5.8	

3.10.1 Toma de datos

Se realizaron observaciones semanales, sobre el progreso del enraizamiento.

3.11 Etapa IV (Aclimatación)

Para la etapa de aclimatación de Stevia se probó dos tipos de sustratos:

1. Pro-mix[®] Bx (Premier Brands Inc. Canadá), cuyos componentes son: turba de musgo esfagnino Canadiense (Canadian Sphagnum Peat Moss), perlita, vermiculita, cal dolomítica, piedra caliza y agente humectante.
2. Mezcla de aserrín descompuesto, tierra y arena en proporción 3:2:1

Cada uno de estos sustratos fue sometido a tres tipos de riego colocados bajo invernadero:

1. Riego nebulizado, donde las bandejas múltiples que contienen las plántulas fueron cubiertas con plástico transparente en forma de microtúnel para evitar que el agua cayera directamente sobre las plantas.
2. Riego automático dos veces al día, durante 5 min.
3. Riego manual según necesidad de las plantas

4. ANALISIS ESTADISTICO

En el experimento realizado en la primera etapa de establecimiento *in vitro* los tratamientos fueron ordenados en un arreglo factorial con un diseño de bloques completos al azar. En la II de multiplicación se utilizó un diseño completo al azar, incluyendo como covarianza el tamaño inicial de los brotes provenientes de la etapa I.

Los datos fueron analizados con el programa estadístico “Statistical Analysis System” versión 6.12 (SAS[®], 1997). 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 la separación de medias usando el método “Student –Newman-Keuls” (SNK) para identificar los mejores tratamientos.

En la etapa I el tamaño de los brotes fue medido en dos periodos, 8 y 15 días después de siembra, por lo que se realizó el análisis de medidas repetidas en el tiempo, el cual salió altamente significativo, por lo tanto todos los análisis se separaron por tiempo. Los datos a los 8 días después de la siembra (dds) se tomaron únicamente para ver la tendencia en el crecimiento promedio de los brotes, pero la decisión sobre los mejores tratamientos se basó en los resultados obtenidos a los 15 dds.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Etapa I (Establecimiento)

5.1.1 Tamaño Promedio de Brotes por Explante (TPBE) a los 15 dds

El TPBE a los 15 dds se vio influenciado por la concentración de macroelementos MS (Cma), el tipo de citocinina (TC) y el nivel de citocinina (NC); además también influyeron las interacciones: Cma con consistencia del medio (Cme), Cma con TC y Cme con NC (Anexo 10)

5.1.2 Tamaño Promedio de Brotes por Explante (TPBE) a los 8 días después de la siembra (dds)

Los resultados obtenidos indican que el TPBE a los 8 dds se vio influenciado mayormente por el NC utilizado y las interacciones entre Cma y el TC. Además también influyeron las interacciones: Cma con el NC, la Cme con el TC y la Cme con el TC. La Cma, Cme, el TC y la interacción entre TC y NC no fueron lo suficientemente determinantes en el TPBE (Anexo 11).

5.1.3 Brotación

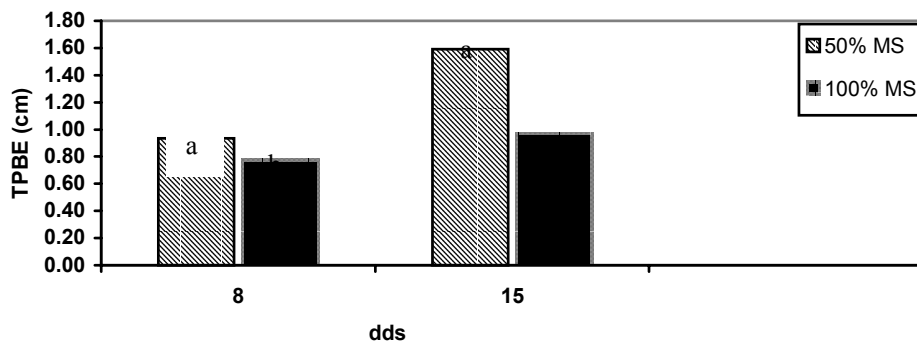
La Cma, la Cme, el TC, el NC y la interacción entre los mismos no influyó en la formación de brotes, probablemente esto dependa mas del tamaño, el estado fitosanitario y la edad fisiológica del explante, tal como menciona Montoya (1991).

5.1.4 Contaminación

El porcentaje de contaminación durante el establecimiento del cultivo fue bastante alto (aproximadamente 60%), utilizando los resultados del estudio preliminar de desinfección. Probablemente haya contribuido a esta contaminación la entrada y salida de varias personas a la cámara de flujo laminar durante el desarrollo de la investigación.

5.1.5 Efectos individuales de las principales variables en el Tamaño Promedio de Brotes por Explante (TPBE) a los 15 días después de siembra (dds)

5.1.5.1 Efecto de la concentración de macroelementos en el Tamaño Promedio de Brotes por Explante. Independientemente de las otras variables estudiadas con respecto a la Cme, las mejores respuestas se lograron utilizando 50% de macroelementos en el medio MS. Utilizando esta concentración de macroelementos, el TPBE a los 15 dds fue de 1.59 cm en el medio de 50% macroelementos MS, mientras que en el medio 100% macroelementos MS solo se logró 0.97 cm (Figura 1)



Kin: Kinetina. BAP: Bencilaminopurina

¹50% MS= Medio básico MS con 50% de concentración de macroelementos

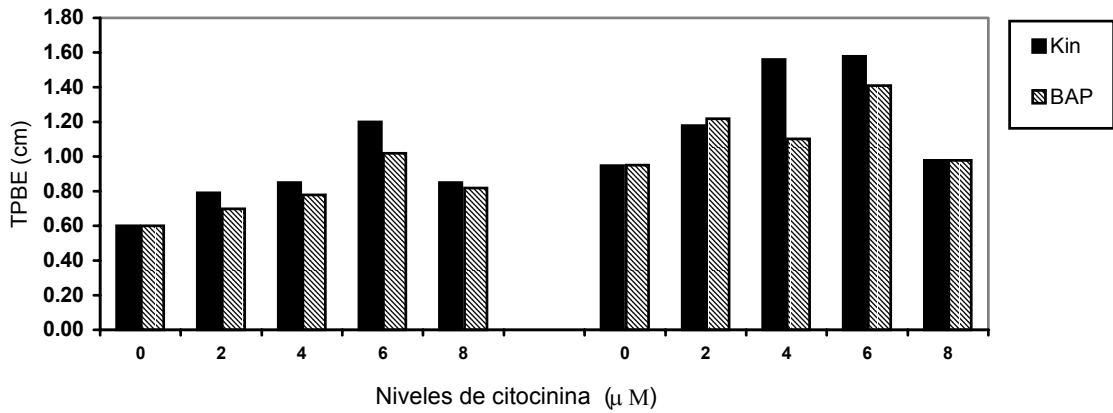
²100% MS. Medio básico MS con 100% de concentración de macroelementos

*medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes. SNK (P<0.05)

Figura 1. Efecto de la concentración de macroelementos MS en el tamaño promedio de brotes por explante (TPBE) a los 8 y 15 días después de siembra (dds), Zamorano, Honduras, 2001.

5.1.5.3 Efecto del tipo y nivel de citocinina en el Tamaño Promedio de Brotes por Explante.

Se observó que la Kin tuvo un mejor efecto que el BAP en el crecimiento de los brotes, aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa, pero sí hubo diferencias significativas con el testigo el cual consistía en no citocinina. El mejor TPBE a los 15 dds se logró con 6 μ m de Kin, aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa con la respuesta obtenida con 4 μ m de Kin (Figura 2)



* Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes. SNK ($P < 0.05$)

Figura 2. Efecto del tipo y nivel de citocinina en el Tamaño Promedio de Brotes por Explante (TPBE) a los 8 y 15 días después de siembra (dds), Zamorano, Honduras, 2001.

5.1.6 Efecto de las interacciones en el Tamaño Promedio de Brotes por Explante

La mejor respuesta se observó con 6 μM de Kin en medio líquido con 50% de macroelementos MS, seguido del tratamiento que consistió de 4 μM de Kin en medio líquido con 50% de macroelementos MS. El menor tamaño de brotes se observó con 8 μM de BAP en medio sólido con 50% de macroelementos MS (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de la concentración de macroelementos MS en el medio, consistencia del medio, tipo de citocinina y nivel de citocinina en el tamaño promedio de brotes por explante a los 15 días después de la siembra durante el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.

N° de tratamiento	Concentración de macroelementos MS (%)	Consistencia del medio	² Citocinina	Nivel de citocinina (μm)	Tamaño de brote (cm)	¹ Grupo SNK
12	50	líquido	Kin	6	2.50	a
11	50	líquido	Kin	4	2.45	ab
24	100	sólido	BAP	4	2.12	bc
7	50	sólido	BAP	6	2.00	bc
23	100	sólido	BAP	2	2.00	bc
18	50	líquido	Test	0	2.00	bc
10	50	líquido	Kin	2	2.00	bc
1	50	sólido	Kin	2	1.86	bc
2	50	sólido	Kin	4	1.75	bc
15	50	líquido	BAP	4	1.71	bc
13	50	líquido	Kin	8	1.66	bc
3	50	sólido	Kin	6	1.62	bc
20	100	sólido	Kin	4	1.50	bc
27	100	sólido	Test	0	1.50	bc
19	100	sólido	Kin	2	1.41	bc
4	50	sólido	Kin	8	1.33	bc
16	50	líquido	BAP	6	1.27	bc
34	100	líquido	BAP	6	1.20	bc
30	100	líquido	Kin	6	1.10	bc
33	100	líquido	BAP	4	1.05	bc
5	50	sólido	BAP	2	1.00	bc
9	50	sólido	Test	0	1.00	bc
17	50	líquido	BAP	8	1.00	bc
35	100	líquido	BAP	8	1.00	bc
6	50	sólido	BAP	4	0.83	bc
26	100	sólido	BAP	8	0.83	bc
14	50	líquido	Kin	2	0.80	bc
25	100	sólido	BAP	6	0.80	bc
32	100	líquido	BAP	2	0.77	bc
28	100	líquido	Kin	2	0.76	bc
22	100	sólido	Kin	8	0.75	bc
29	100	líquido	Kin	4	0.71	bc
36	100	líquido	Test	0	0.68	bc
21	100	sólido	BAP	6	0.65	c
31	100	líquido	Kin	8	0.64	c
8	50	sólido	BAP	8	0.63	c

¹letras minúsculas diferentes son estadísticamente diferentes. SNK (P<0.05)

²Kin: Kinetina BAP: Bencilaminopurina Test: testigo (0 μM de citocinina)

5.2 Etapa II (Multiplicación)

5.2.1 Número Promedio de Brotes por Explante (NPBE)

El tamaño inicial (covarianza) no influyó en el número de brotes por explante. El nivel de Kin utilizado sí influyó (Anexo 12).

5.2.1.1 Efecto del nivel de Kin en el Número Promedio de Brotes por Explante

a) En explantes provenientes de la etapa I del medio líquido con 50% de macroelementos a un nivel de 6 μ M de Kin

El mayor NPBE en la etapa de multiplicación se encontró con el tratamiento con 6 μ M de Kin, aunque estadísticamente no fue diferente del tratamiento con 2 μ M de Kin (Cuadro 7).

b) En explantes provenientes de la etapa I del medio líquido con 50% de macroelementos a un nivel de 4 μ M de Kin

El mayor NPBE en la etapa de multiplicación para ésta procedencia se logró con 6 μ M a pesar de que no fue estadísticamente diferente de los tratamientos con 2 μ M y 4 μ M (Cuadro 7).

c) Comparación de Número Promedio de Brotes por Explante entre las 2 procedencias

Las mejores respuestas en NPBE se obtuvieron con los tratamientos provenientes del medio de establecimiento líquido con 50% de macroelementos a un nivel de 6 μ M de Kin, siendo el mejor tratamiento durante la etapa de multiplicación el medio con 6 μ M de Kin, es decir el mismo tratamiento que resultó mejor en la etapa de establecimiento.

Utilizando el mejor medio que resultó de la etapa de establecimiento y multiplicación se logró una tasa de multiplicación de 4 en el primer subcultivo y de 6 a 8 en el segundo y tercer subcultivo.

Los menores NPBE se presentaron con los tratamientos provenientes del medio de establecimiento líquido con 50% de macroelementos a un nivel de 4 μ M de Kin, siendo el peor tratamiento durante la etapa de multiplicación el medio con 4 μ M de Kin (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto del nivel de Kinetina (Kin) en el Número Promedio de Brotes por Explante (NPBE) durante la multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.

¹ Procedencia de la Etapa I	Nivel de Kin (μ M)	NPBE	*Grupo SNK
50% MS/L/6 μ M Kin ¹	6	2.50	a
	2	1.90	ab
	4	1.30	b
50% MS/L/4 μ M Kin ²	6	1.37	b
	2	1.30	b
	4	1.00	b

¹50% MS/L/6 μ M Kin: 50% de concentración de macroelementos en medio líquido con 6 μ M de Kinetina

²50% MS/L/4 μ M Kin: 50% de concentración de macroelementos en medio líquido con 4 μ M de Kinetina
*promedios seguidos de letras minúsculas diferentes son estadísticamente diferentes. SNK (P<0.05)

5.2.2 Tamaño Promedio de Brotes por Explante (TPBE)

El tamaño inicial y el nivel de Kin en el medio de multiplicación no influyeron en el TPBE. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 8)

Cuadro 8. Efecto del nivel de Kinetina (Kin) en el Tamaño Promedio de Brotes por Explante (TPBE) durante la multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.

¹ Procedencia de la Etapa I	Nivel de Kin (μ M)	TPBE (cm)	*Grupo SNK
50% MS/L/6 μ M Kin ¹	2	2.12	a
	6	1.45	a
	4	1.15	a
50% MS/L/4 μ M Kin ²	4	1.42	a
	2	1.18	a
	6	1.17	a

¹50% MS/L/6 μ M Kin: 50% de concentración de macroelementos en medio líquido con 6 μ M de Kinetina

²50% MS/L/4 μ M Kin: 50% de concentración de macroelementos en medio líquido con 4 μ M de Kinetina
*promedios seguidos de letras minúsculas diferentes son estadísticamente diferentes. SNK (P<0.05)

5.2.3 Contaminación

Durante la multiplicación del cultivo no se presentó contaminación significativa (aproximadamente 10%), la mayoría fueron contaminados por hongos.

5.3 Resultados de los experimentos realizados en la etapa de Establecimiento y Multiplicación

En el cuadro 9 se presenta el resumen de los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento de los brotes durante la etapa de Establecimiento y Multiplicación

Cuadro 9. Resumen de los efectos principales de los tratamientos en el tamaño promedio de brotes por explante (TPBE) en las etapas de establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.

Etapas	Variable principal	¹ TPBE (cm)	
		8	15
E s t a b l e c i m i e n t o	Concentración de macroelementos MS (%)		
	50	0.9 ^a	1.5 ^a
	10	0.7 ^b	0.9 ^b
	Consistencia del medio		
	sólido	0.8 ^a	1.2 ^a
	líquido	0.8 ^a	1.2 ^a
	Tipo de citocinina		
	Kinetina	0.9 ^a	1.4 ^a
	Bencilaminopurina	0.8 ^a	1.1 ^b
	Nivel de citocinina (μM)		
6	1.1 ^a	1.4 ^{ab}	
4	0.8 ^b	1.5 ^a	
8	0.8 ^b	0.9 ^c	
2	0.7 ^b	1.1 ^{bc}	
0	0.6 ^b	0.9 ^c	
M u l t i p l i c a c i ó n	Nivel de Kinetina (μM)		
	Explantes provenientes tratamiento ² (Etapa I)	no se midió	
	2		2.1 ^a
	4		1.1 ^a
	6		1.4 ^a
	Nivel de Kinetina (μM)		
Explantes provenientes tratamiento ³ (Etapa I)	no se midió		
2		1.1 ^a	
4		1.4 ^a	
6		1.1 ^a	

¹ letras diferentes en cada columna son diferentes estadísticamente. SNK (P<0.05)

² Tratamiento 12 (Etapa I). 6 μM de Kin en medio líquido con 50% de macroelementos MS

³ Tratamiento 11 (Etapa I). 4 μM de Kin en medio líquido con 50% de macroelementos MS

5.4 Etapa III (Enraizamiento)

Las vitroplantas transferidas al medio estándar para el enraizamiento *in vitro* (Cuadro 5) reaccionaron de diferente manera: aproximadamente un 40% de las vitroplantas formó callo, un 40% no formó callos ni raíces y solamente un 20% formó raíces (Anexo 13).

5.5 Etapa IV (Aclimatación)

Las vitroplantas transferidas a invernadero para aclimatación tuvieron una baja sobrevivencia. Solamente un 10% de las plantas sobrevivió en un medio que consistió en aserrín, tierra y arena en proporción de 3:2:1 respectivamente con dos riegos al día durante 5 minutos.

Las vitroplantas tratadas con riego manual no sobrevivieron.

Las vitroplantas expuestas a riego nebulizado tuvieron buena sobrevivencia durante la primera semana, pero no desarrollaron raíces verdaderas.

6. CONCLUSIONES

6.1 Material vegetal

- Los explantes extraídos de material vegetal endurecido o en plena floración generalmente no brotaron o tardaron para iniciar la brotación; por lo que se debe de escoger material vegetal de brotación joven de 10 a 12 cm de longitud y de 2 a 3 mm de grosor.
- Los segmentos nodales provenientes de brotes apicales e intermedios brotaron mejor que los explantes provenientes de brotes basales.

6.2 Esterilización superficial del material vegetal

- Desinfectar las ramas deshojadas con alcohol al 70% durante 30 segundos
- Sumergir las ramas en una solución de NaOCl al 1.2% mas 3 gotas de “Tween 20” por cada 100 ml de solución desinfectante, durante 15 min. en agitación constante.
- A nivel de la cámara de flujo laminar, realizar tres enjuagues con agua bidestilada esterilizada

6.3 Etapa de establecimiento

- El mayor tamaño de brotes promedio por explante a los 15 días después de la siembra se presentó en el medio líquido con 50% macroelementos MS, utilizando 6 μM de Kin. Seguido del mismo medio con un nivel de 4 μM de Kin; por consiguiente, se escogieron estos dos tratamientos para continuar la evaluación en la etapa de multiplicación.
- Tomando en cuenta los efectos individuales de las principales variables, la consistencia del medio no influyó en el tamaño de brotes. Los explantes crecen de igual manera en medio sólido o líquido
- Los mayores tamaños promedios de brotes se presentaron con los medios que contenían Kin. Además se observó que el tamaño promedio de brotes iba aumentando al incrementar el nivel de 0 a 2, 4 y 6 μM de Kin. Sin embargo a un nivel de 8 μM el tamaño promedio de los brotes comienza a disminuir.
- Ninguna de las variables estudiadas tuvo un efecto significativo en la brotación.

6.4 Etapa de multiplicación

- El tratamiento que presentó el mayor número promedio de brotes por explante durante la multiplicación del cultivo, coincide con el mejor medio de la etapa de establecimiento, es decir un medio líquido con 50% macroelementos MS y 6 μ M de Kin
- Utilizando el medio líquido con 50% macroelementos MS y 6 μ M de Kin, se logró una tasa de multiplicación de 4 en el primer subcultivo y de 6 a 8 en los siguientes subcultivos.

6.5 Etapa de enraizamiento

- El medio utilizado consistente en 100% MS de su formulación original + 0.1mg/L AIB + 35 g/L sacarosa + 2.5 mg/L Phytigel y pH ajustado a 5.8 (Cuadro 4), indujo proliferación de callo y lenta formación de raíces, por lo que se recomienda realizar pruebas con tipos y niveles de auxinas , que promuevan un mejor enraizamiento y mas rápido.

6.6 Etapa de aclimatación

- La utilización de Promix® para aclimatar las vitroplantas no resultó favorable, ya que el exceso de humedad pudre las raíces y no son capaces de proliferar. Aunque los primeros días tuvo el mayor porcentaje de sobrevivencia.
- Sólo hubo un 10% de prendimiento en el substrato que consistió en una mezcla de aserrín, tierra y arena en proporción es de 3:2:1 respectivamente, con dos riegos al día durante 5 minutos.

7. RECOMENDACIONES

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.
2. Escoger material vegetal joven de 2 a 3 mm de grosor, evitando materiales en plena floración o que estén lignificados.
3. Realizar mas evaluaciones sobre esterilización superficial de los explantes para disminuir el porcentaje de contaminación durante el establecimiento, ya que la contaminación por bacterias es bastante alta en este periodo.
4. Utilizar un medio sólido para disminuir la utilización de mano de obra en las etapas de establecimiento y multiplicación.
5. Realizar un análisis de costo entre la utilización de un medio sólido o líquido, ya que la consistencia del medio no presentó ninguna diferencia en la brotación ni en el tamaño promedio de brotes.
6. Utilizar 50% de macroelementos del medio basal Murashige y Skoog mas 6 μ M de Kinetina en el medio de establecimiento.
7. Para la etapa de multiplicación se puede utilizar el mismo medio de establecimiento, ya que se obtiene el mayor número de brotes y un buen crecimiento de brotes.
8. Realizar pruebas de enraizamiento utilizando diferentes nivel y tipos de auxinas para la formación de vitroplantas con raíces mas endurecidas para ser aclimatadas en invernadero.
9. Para la aclimatación de las vitroplantas se podría probar lo siguiente:
 - Mezclar el Promix® con 50% de arena para ayudar a drenar el exceso de humedad.
 - Plantar las vitroplantas en el substrato anterior y colocarlos bajo un microtúnel dentro del invernadero con riego nebulizado, esto es para tener un ambiente bastante húmedo, pero evitando que el agua le caiga directamente a las plantas.
 - Sembrar las mudas en macetitas de plástico con el substrato anteriormente indicado, regarlo bien y cubrir las plantas con una bolsa plástica translúcida y sellarlo completamente para evitar la deshidratación. Mantener las plantas bajo invernadero hasta que estén en condiciones de sobrevivir en el campo.

8. BIBLIOGRAFIA

- Bespalhok, J. C.; Hashimoto, J. M.; Vieira, L. G. S.f. Induction of somatic embryogenesis leaf explants of *Stevia rebaudiana* (en línea). Londrina, Brazil. Consultado 03 abril 2001. Disponible <http://www.lni.unipi.it/stevia/stevia/inducton.htm>
- Cénoz, P.; Lambert, H. M.; López, A.; Burgos, A. M. 1997. Sistemas de propagación por esqueje en *Stevia rebaudiana* B. (en línea). Corrientes, Argentina. Consultado 20 julio 2001. Disponible en http://www.ediho.es/horticom/tem_aut/cd/latinoamerica/aromared/329.htm
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura; Fundamentos y Aplicaciones. Ed. Roca, W. M.; Mroginski, L.A. Cali, Colombia, Editorial XYZ. 969 p.
- Ferreira, C. M. y Handro, W. 1987. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* through Leaf Explants from Adult Plants. Institute of Biosciences. University of São Paulo (Bra.) Mayo, 1987: 157 – 160.
- 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.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería; Subsecretaría de Estado de Agricultura, Paraguay. 1994. Producción de Ka'a he'e. Ed. por Luis Alberto Alvarez, Roberto Casaccia y Gerardo López Z. 2 ed. Paraguay, Ministerio de Agricultura y Ganadería. 48 p.
- Molinas, S. 1989. Fortuna Stevia del Paraguay S.R.L.: Promoción, cultivo, industrialización y comercialización de la *Stevia rebaudiana* Bertoni (Ka'a he'e). Asunción, Paraguay. 24 p.
- Montoya, H y Marina, L. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Colombia, Editorial Lealon. 77 p.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *In vitro* de las plantas superiores. Trad. Por Luis Ayerbe Mateo – Sagasta. 3 ed. Madrid, España, Mundi - Prensa. 325 p.
- SAS Institute Inc. 1997. SAS/STAT® Software: Changes and Enhancements through Release 6.12, Cary, N.C: SAS Institute Inc. 1167 p.
- Tamura, Y; Nakamura, S.; fukui, H.; Tabata, M. 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by Stem – tips culture. Plant cell reports (Japon) 3: 183 – 185 p.

9. ANEXOS

Anexo 1. Composición de la solución hidropónica utilizada para la fertilización de la plantación madre de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.

Solución Nutritiva	Cantidad de nutrientes por litro (g)
Solución A (macroelementos)	
Fosfato monoamónico (12-52-0)	34
Nitrato de Calcio	208
Nitrato de Potasio	110
Solución B (microelementos)	
Sulfato de Magnesio	123
Sulfato de Cobre	0.12
Sulfato de Manganeso	0.62
Sulfato de Zinc	0.3
Acido Bórico	1.55
Molibdato de Amonio	0.005
Quelato de Hierro	12.5

Anexo 2. Ramas de brotación joven de *Stevia rebaudiana* utilizados para la obtención de explantes para el establecimiento *in vitro* del cultivo, Zamorano, Honduras, 2001.



Anexo 3. Contaminación por hongo observada durante el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.



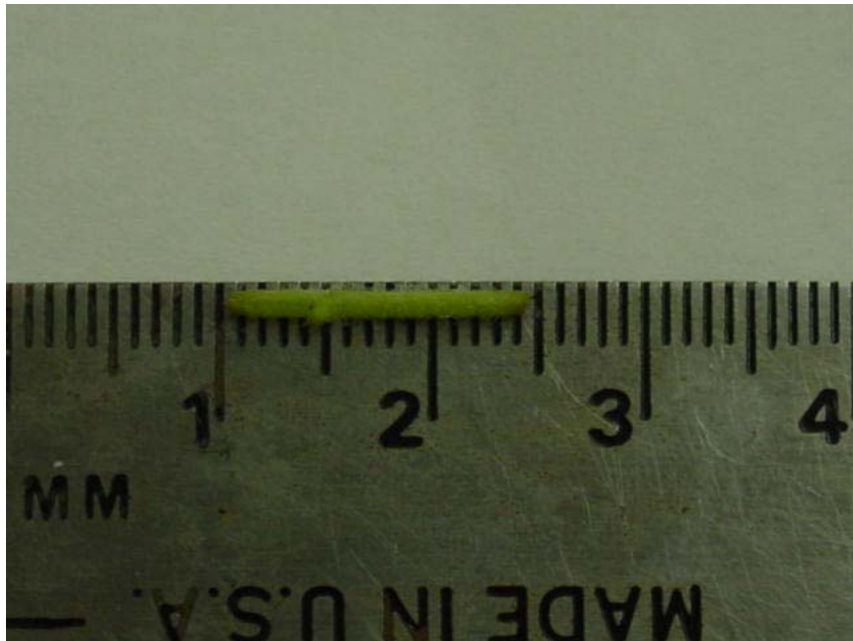
Anexo 4. Contaminación por bacteria observada durante el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.



Anexo 5. Brotes observados a simple vista durante el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.



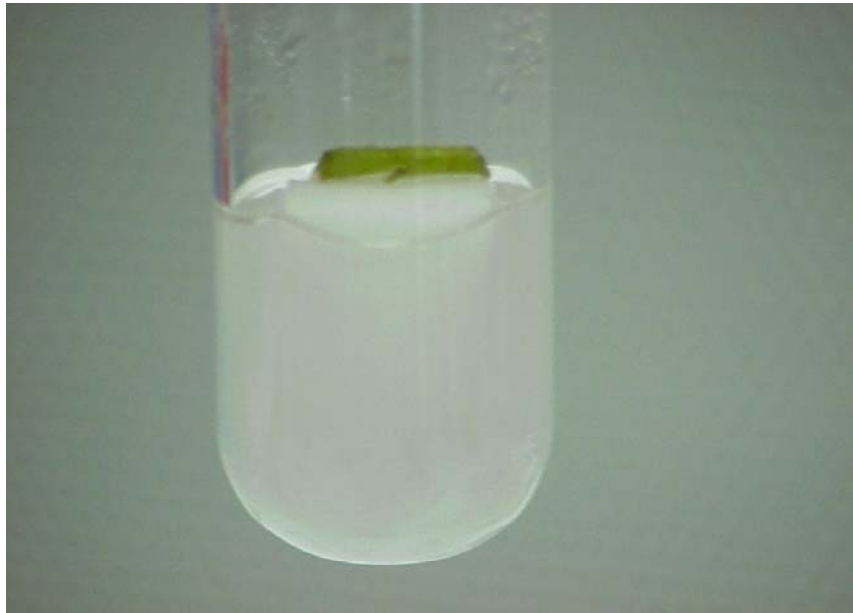
Anexo 6. Explante utilizado para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001



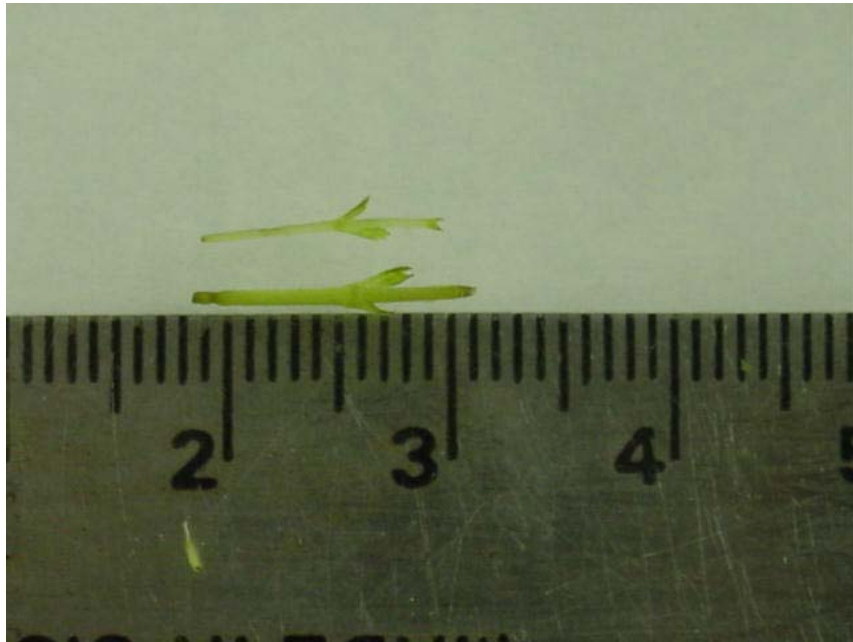
Anexo 7. Explante sembrado en medio de cultivo sólido durante el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.



Anexo 8. Explante sembrado en medio de cultivo líquido durante el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.



Anexo 9. Tamaño inicial de los explantes transferidos al medio de multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.



Anexo 10. Efecto de la concentración de macroelementos MS, consistencia del medio, tipo y nivel de citocinina en el tamaño promedio de brotes por explante (TPBE) de *Stevia rebaudiana* a los 15 días después de la siembra *in vitro*. Zamorano, Honduras, 2001.

Fuentes de Variación	GL	Suma de Cuadrados	CME	Valor F	*P > F
Bloque	2	1.170	0.585	1.120	0.327
Concentración de macroelementos (Cma)	1	5.940	5.940	11.420	0.001
Consistencia del medio (Cme)	1	0.299	0.299	0.580	0.449
Tipo de citocinina (TC)	1	3.120	3.100	6.000	0.015
Nivel de citocinina (NC)	4	6.930	2.310	4.440	0.005
Cma * Cme	1	3.740	3.740	7.200	0.008
Cma * TC	1	15.050	15.050	28.910	0.000
Cma * NC	3	1.300	0.450	0.860	0.462
Cme * TC	1	0.630	0.630	1.220	0.271
Cme * NC	4	5.220	1.740	3.340	0.020
TC * NC	4	0.480	0.160	0.310	0.820
Error	194	105.170	0.520		
Total	217	149.049			
R ²	0.381		* P<0.05		
C.V.	57,786		TPBE (cm): 1.25		

Anexo 11 Efecto de la concentración de macroelementos MS, consistencia del medio, tipo y nivel de citocinina en el tamaño promedio de brotes por explante (TPBE) de *Stevia rebaudiana* a los 8 días después de la siembra *in vitro*. Zamorano, Honduras, 2001.

Fuentes de Variación	GL	Suma de Cuadrados	CME	Valor F	*P > F
Bloque	2	3.212	1.606	7.060	0.001
Concentración de macroelementos (Cma)	1	0.521	0.521	2.290	0.132
Consistencia del medio (Cme)	1	0.350	0.350	1.540	0.217
Tipo de citocinina (TC)	1	0.570	0.568	2.490	0.116
Nivel de citocinina (NC)	4	2.200	0.733	3.220	0.024
Cma * Cme	1	0.180	0.179	0.790	0.376
Cma * TC	1	1.595	1.595	7.010	0.009
Cma * NC	3	6.078	2.026	8.900	0.000
Cme * TC	1	1.488	1.488	6.540	0.011
Cme * NC	4	6.084	2.028	8.910	0.000
TC * NC	4	0.952	0.317	1.390	0.216
Error	194	44.150	0.230		
Total	217	67.380			
R ²	0.37		* P<0.05		
C.V.	55.91		TPBE (cm): 0.85		

Anexo 12: Efecto del nivel de kinetina en el número promedio de brotes por explante (NPBE) de *Stevia rebaudiana* durante la etapa de multiplicación *in vitro*, Zamorano, Honduras, 2001.

Fuentes de Variación	GL	Suma de Cuadrados	CME	Valor F	* P > F
Nivel de kinetina	5	14.51	2.90	4.85	0.0011
Tamaño inicial	1	1.53	1.53	2.55	0.1167
Error	50	29.95	0.59		
Total	56	45.99			
R ²	0.35				*P<0.05
C.V	49.01				NBPE: 1.58

Anexo 13. Raíces *in vitro* formadas durante la Etapa de enraizamiento de *Stevia rebaudiana*, Zamorano, Honduras, 2001.

