



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

## **REGENERACIÓN *in vitro* DE *Stevia rebaudiana* BERTONI: MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN**

**JOSÉ RIGOBERTO PÉREZ SÁNTIZ**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

2017

La presente tesis titulada: **Regeneración *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni: medios de cultivo y condiciones de incubación**, realizada por el alumno: **José Rigoberto Pérez Sántiz** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



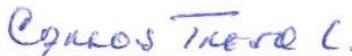
DR. NICACIO CRUZ HUERTA

ASESORA



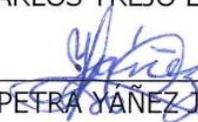
DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

ASESOR



DR. CARLOS TREJO LÓPEZ

ASESORA



M. C. PETRA YÁÑEZ JIMÉNEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2017

# REGENERACIÓN *in vitro* DE *Stevia rebaudiana* BERTONI: MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

JOSÉ RIGOBERTO PÉREZ SÁNTIZ, M. en C.  
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2017

## RESUMEN

Las hojas *Stevia rebaudiana* Bertoni contienen azúcares no calóricos conocidos como steviolglicósidos, que pueden ser de 100 hasta 300 veces más dulces que la sacarosa. Una alternativa para cubrir la demanda de planta genéticamente uniforme y con sanidad vegetal es la propagación *in vitro*; sin embargo, el éxito de este método radica en optimizar el medio de cultivo y las condiciones de incubación. El objetivo de esta investigación fue obtener la combinación óptima entre medio de cultivo y condición de incubación para la regeneración *in vitro* de stevia. Se cultivaron segmentos nodales en Murashige y Skoog al 50 y 100 % y solución Steiner al 100, 200 y 300 % de concentración y dos condiciones de incubación [ $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) +  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ]. Los explantes cultivados en MS 50 % y  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  mostraron mayor supervivencia, número y longitud de brotes, número de hojas y menor porcentaje de oxidación y vitrificación, comparados con MS 100 % y  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . La solución Steiner al 200 y 300 % combinadas con  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  resultaron en los valores más altos de supervivencia, número y longitud de brotes y número de hojas comparadas con 100 % de solución Steiner y  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . El mejor periodo para obtener segmentos nodales para la propagación *in vitro* de stevia es durante la etapa vegetativa de las plantas madre, que corresponde a los meses de abril a julio. Se concluye que las condiciones de cultivo más propicias para la regeneración *in vitro* de stevia a partir de segmentos nodales consisten en el uso del medio MS al 50 % en combinación con  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF y  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Palabras clave:** *Stevia rebaudiana*, regeneración *in vitro*, medio de cultivo MS, solución nutritiva Steiner, luz, temperatura.

**IN VITRO REGENERATION OF *Stevia rebaudiana* BERTONI: CULTURE MEDIUM  
AND INCUBATION CONDITIONS**

**JOSÉ RIGOBERTO PÉREZ SÁNTIZ, M. en C.**

**COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2017**

**ABSTRACT**

Leaves of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) contain non-caloric sugars known as steviosides, which can be 100 to 300 times sweeter than sucrose. *In vitro* propagation is an alternative to produce plant material with genetic uniformity and plant health for field establishment. However, success of this method depends on culture medium and incubation conditions. The objective of this research was to find the optimum combination of culture medium and incubation conditions for the *in vitro* regeneration of stevia. Nodal segments were cultivated under different concentrations of the Murashige and Skoog (MS, 50 and 100 %) and Steiner (100, 200 and 300 %) nutrient solutions, and two incubation conditions [ $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photosynthetic photon density flux (PPDF) and  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPDF and  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ]. Explants cultivated in MS medium at 50 % and  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPDF and  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  showed greater survival rate, shoot number per explant, shoot length, and number of leaves, and lower oxidation and vitrification rates compared to 100 % MS medium and  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPDF and  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . The 200 and 300 % Steiner nutrient solution and  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPDF and  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  promoted the greatest values for explant survival rate, shoot number, shoot length of and number of expanded leaves compared to Steiner 100% and  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPDF and  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . The best period for harvesting nodal segments from the mother plants is during the vegetative phase, which occurs from April to July. The best combination for *in vitro* regeneration of stevia using nodal segments are 50 % MS medium and  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPDF and  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Key words:** *Stevia rebaudiana*, *in vitro* regeneration, MS culture medium, Steiner nutrient solution, light, temperature.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Colegio de Postgraduados y a su personal académico y administrativo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca durante esta gran etapa de formación académica e investigación.

A la Dra. Alejandrina Robledo Paz, por su calidad humana y profesional. Por su incansable dedicación a ésta investigación. Gracias por compartir su entusiasmo, amistad, paciencia y confianza.

A los doctores: Nicacio Cruz Huerta, Carlos Trejo y a la M. C. Petra Yáñez, por el apoyo en la realización y revisión de esta investigación. Gracias por su amistad y enseñanza.

Al personal técnico, compañeros y amigos del Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas, Laboratorio de Fisiotecnia Vegetal, Laboratorio de Botánica, a mis amigos Consuelo, David, Luis Alberto, y a todas las personas que conocí en ésta gran institución. Gracias por su amistad.

## **DEDICATORIA**

A mis amados padres, hermanos y sobrinos que son la fortaleza de mi vida.

A Yesenia Yadira y familia Pérez Ovando, gracias por el apoyo incondicional.

Al pueblo mexicano, que con honestidad y con el sudor de su frente y espalda paga sus impuestos y sostiene a nuestro hermoso país. País mal administrado y saqueado.

## CONTENIDO

<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. 1. Objetivo general.....	4
1. 2. Objetivos específicos.....	4
1. 3. Hipótesis general.....	4
1. 4. Hipótesis específicas.....	5
<b>CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>6</b>
2. 1. Generalidades de <i>Stevia</i> : origen y descripción botánica.....	6
2. 2. Ruta de síntesis de steviolglicósidos (SG´s).....	8
2. 3. Importancia comercial.....	10
2. 4. Propagación y cultivo.....	11
2. 5. Micropropagación de <i>Stevia</i> .....	12
2. 6. Medios de cultivo.....	13
2. 6. 1. Macroelementos.....	14
2. 6. 2. Microelementos.....	20
2. 7. Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962).....	22
2. 8. Solución nutritiva universal Steiner (1984).....	23
<b>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3. 1. Material vegetal.....	26
3. 2. Establecimiento <i>in vitro</i> : desinfestación de explantes.....	27
3. 3. Bioensayo. Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni en medios de cultivo MS y Yasuda <i>et al.</i> .....	27
3. 4. Experimentos.....	29
3. 4. 1. Experimento 1. Efecto de concentraciones de medio MS y condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia</i> <i>rebaudiana</i> Bertoni.....	32
3. 4. 2. Experimento 2. Efecto de la solución nutritiva Steiner y condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia</i> <i>rebaudiana</i> Bertoni.....	33

3. 4. 3. Experimento 3. Efecto de la época del año, medios de cultivo, condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni .....	34
3.5. Análisis de datos .....	36
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
4. 1. Bioensayo: Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni en el medio de Murashige y Skoog y Yasuda <i>et al.</i> ....	37
4.2. Efecto de la concentración del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) y la condición de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni .....	39
4.3. Efecto de la concentración de solución nutritiva Steiner y las condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> .....	43
4.4. Efecto de la época del año, medios de cultivo y condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni .....	48
4.4.1. Asimilación de iones.....	52
4.4.2. Contenido de pigmentos fotosintéticos.....	53
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos presentes en hojas secas de Stevia (g 100 g <sup>-1</sup> peso seco). .....	10
Cuadro 2. Componentes del medio Murashige y Skoog (1962).....	24
Cuadro 3. Composición química de la solución nutritiva Steiner (1984). ....	25
Cuadro 4. Comparación de la concentración de macro y micro elementos (mg L <sup>-1</sup> ) de los medios de cultivo Murashige & Skoog (MS) y Yasuda et al. al cien por ciento de su concentración. ....	28
Cuadro 5. Vitaminas y fuentes de carbono de los medios de cultivo Murashige y Skoog y Yasuda et al. al cien por ciento de su concentración. ....	29
Cuadro 6. Composición del medio cultivo de Murashige y Skoog (1962) y Solución nutritiva Steiner y características fisicoquímicas. ....	31
Cuadro 7. Características fisicoquímicas del medio cultivo de Murashige y Skoog (MS) (1962) y Solución nutritiva Steiner al inicio de los experimentos. ....	32
Cuadro 8. Respuesta morfogénica de los explantes de <i>Stevia rebaudiana</i> establecidos en diferentes medios de cultivo. ....	37
Cuadro 9. Suma de cuadrados del análisis de varianza para el efecto de dos concentraciones de medio Murashige & Skoog y dos condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	40
Cuadro 10. Comparación de medias del efecto de la concentración del medio Murashige y Skoog y de las condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	42
Cuadro 11. Comparación de medias del efecto de la interacción entre concentración del medio Murashige y Skoog y las condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	43
Cuadro 12. Suma de cuadrados del análisis de varianza del efecto de tres concentraciones de solución nutritiva Steiner y dos condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	44
Cuadro 13. Comparación de medias del efecto de tres concentraciones de solución nutritiva Steiner y dos condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	46

Cuadro 14. Comparación de medias del efecto de las interacciones entre la concentración de la solución nutritiva Steiner y las condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	47
Cuadro 15. Suma de cuadrados del análisis de varianza del efecto de dos medios de cultivo: MS 50 % y Steiner 200 % y dos condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	48
Cuadro 16. Comparación de medias del efecto de dos medios de cultivo MS 50 % y Steiner 200 % y dos condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	49
Cuadro 17. Comparación de medias del efecto de las interacciones entre solución nutritiva MS (50 %), Steiner (200 %) y dos condiciones de incubación en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	50
Cuadro 18. Contenido de iones disponibles en los medios de cultivo a los 55 días después de establecimiento <i>in vitro</i> . ....	52
Cuadro 19. Contenido de iones asimilados por las plantas a los 55 días después de establecimiento <i>in vitro</i> . ....	53
Cuadro 20. Contenido de pigmentos fotosintéticos de brotes regenerados <i>in vitro</i> en soluciones nutritivas MS 50 % y Steiner 200 % bajo dos condiciones de incubación. Evaluación realizada a los 35 días después del establecimiento. ....	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, a) variedad Eirete y b) variedad Morita II. ....	7
Figura 2. Localización subcelular de la síntesis de steviolglicósidos. ....	9
Figura 3. Radiación solar (W/m <sup>2</sup> ) y temperatura ambiental (máxima, mínima y promedio) promedio durante el crecimiento de las plantas madre. Fuente: Estación Agro-Meteorológica, COLPOS, Montecillo. ....	30
Figura 4. Presencia de oxidación en brotes de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni cultivados en: a) MS 100 %, b) MS 50 % y c) Yasuda et al. Evaluación realizada a los 35 días después de establecimiento <i>in vitro</i> .....	38
Figura 5. Vitoplantas representativas de la combinación de factores de estudio: 1) MS 50 % + 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ DFFF+ 26 $\pm$ 2 °C, 2) MS 50 % + 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ DFFF + 28 $\pm$ 2 °C; 3) Steiner 200 % + 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ DFFF + 26 $\pm$ 2 °C y 4) Steiner 200 % + 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ DFFF + 28 $\pm$ 2 °C.....	55

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Ante los crecientes problemas de salud pública relacionados con la diabetes y los efectos negativos de los edulcorantes artificiales, los consumidores han optado por el uso de productos naturales con bajo o nulo aporte calórico para sustituir a los productos artificiales.

Las hojas de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) contienen azúcares no calóricos conocidos como steviolglicósidos (SG's) (Abdullateef y Osman, 2011), de los cuales el steviósido y los rebaudiósidos A, B y C son los más abundantes (Mildmore y Rank, 2002; Gardana *et al.*, 2010). En estado puro, los steviósidos pueden ser hasta 300 veces más dulces que la sacarosa y no presentan toxicidad ni efectos negativos en la salud humana (De Oliveira *et al.*, 2009; Jarma, 2010; Khalil *et al.*, 2014). Estas cualidades han incrementado el potencial de los steviósidos como sustitutos de la sacarosa y de edulcorantes sintéticos (Mildmore y Rank, 2002).

Los steviolglicósidos se emplean en Europa, Asia y Estados Unidos desde los años 80's (FDA, 2010), y existe una demanda creciente de follaje de stevia, por lo que algunos países están impulsando su cultivo. Se estima que el consumo mundial de steviósidos es de 50 toneladas al año (Mageji *et al.*, 2005).

La propagación convencional de esta planta es mediante esquejes enraizados, ya que las semillas presentan baja tasa de germinación (Huda *et al.*, 2007); sin embargo, la tasa de multiplicación por esta vía es baja (una planta por esqueje) (Sivaram y Mukundan, 2003). Ante este panorama, herramientas biotecnológicas como la

micropropagación, pueden ser alternativas que ayuden a cubrir la demanda que de estos compuestos se tiene.

El éxito de ésta técnica radica en optimizar el medio de cultivo (concentración de sales inorgánicas, reguladores de crecimiento, fuente de carbono, agente gelificante y pH) y las condiciones de incubación (intensidad lumínica, fotoperiodo y temperatura) (Boavida y McCormick, 2007), de tal manera que el material vegetal (explante) con el que se pretenda llevar a cabo la micropropagación, exprese su máximo potencial. Los principales síntomas que presenta un explante en un medio de cultivo o condiciones de incubación no óptimas son: tasa de supervivencia baja, tasa de regeneración limitada, clorosis, oxidación y necrosis (Foyer *et al.*, 1997; Sikach, 1998; Boavida y McCormick, 2007).

Para la propagación *in vitro* de stevia, varios autores han utilizado las sales basales del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (MS, 1962) (Huda *et al.*, 2007; Anbazhagan *et al.*, 2010; Shatnawi *et al.*, 2011; Razak *et al.*, 2014); sin embargo, se tienen referencias de que la concentración nutrimental del medio MS puede exceder los requerimientos de los explantes (González *et al.*, 2012; Martínez Villegas *et al.*, 2015).

Por otra parte, la solución universal Steiner (1984) ha sido utilizada con éxito en hidroponía y agricultura protegida de distintas especies vegetales como *Solanum lycopersicum* L. (Cruz *et al.*, 2012), *Lilium* sp. 'Marlon' (Urbina-Sánchez *et al.*, 2015), *Mangifera indica* L. (López-Ordaz *et al.*, 2011). Esta solución nutritiva se caracteriza por tener balance estequiométrico entre aniones y cationes que proporcionan los nutrientes necesarios para diferentes etapas de desarrollo.

La solución Steiner se ha empleado en la micropropagación sólo en la etapa de adaptación de vitroplantas a las condiciones de invernadero (aclimatación) (Enríquez *et al.*, 2000), por lo que su uso durante las primeras etapas de la propagación como fuente alternativa de nutrimentos, podría mejorar las características de las plantas regeneradas.

Por otro lado, las condiciones de incubación (intensidad de luz, fotoperiodo y temperatura) influyen en la morfogénesis de plantas cultivadas *in vitro* (Shin *et al.*, 2008). Existen reportes del efecto tanto positivo como negativo de la incubación en altas o bajas intensidades de luz y temperatura sobre la capacidad de regeneración *in vitro*. Por ejemplo, Barrales *et al.* (2015) encontraron mayor supervivencia, altura de planta, número de hojas y mayor porcentaje de enraizamiento de vitroplantas de *Capsicum chinense* Jacq en la menor intensidad de densidad de flujo de fotones fotosintéticos ( $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF), mientras que la mayor intensidad de luz ( $225 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF) generó menores resultados.

Por otra parte, Alvarenga *et al.* (2007) reportan que se incrementó la acumulación de peso fresco y seco, así como la longitud y número de brotes de *Sechium edule* conforme las temperaturas de incubación aumentaron (16, 18, 20, 22 y 25 °C).

Por lo anterior, en el presente trabajo se plantean los siguientes objetivos:

## **1. 1. Objetivo general**

Determinar el efecto de diferentes concentraciones de soluciones nutritivas (MS y Steiner) y condiciones de incubación (luz y temperatura) sobre la capacidad de regeneración *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

## **1. 2. Objetivos específicos**

Evaluar el efecto de dos concentraciones de medio de cultivo MS (50 y 100 %) y dos condiciones de incubación ( $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de DFFF +  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) en la capacidad de regeneración *in vitro* de stevia.

Evaluar el efecto de tres concentraciones de solución nutritiva Steiner (100, 200 y 300 %) y dos condiciones de incubación ( $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de DFFF +  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) en la capacidad de regeneración *in vitro* de stevia.

Determinar la combinación óptima entre concentración de solución nutritiva (MS y Steiner) y condiciones de incubación para la regeneración *in vitro* de stevia.

## **1. 3. Hipótesis general**

Las diferentes soluciones nutritivas y concentraciones en combinación con las condiciones de incubación modificarán la capacidad de regeneración *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

#### **1. 4. Hipótesis específicas**

Al menos una combinación entre concentración de medio MS y condición de incubación permitirá la regeneración *in vitro* de Stevia.

Al menos una combinación entre concentración de solución nutritiva Steiner y condición de incubación permitirá la regeneración *in vitro* de Stevia.

## CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2. 1. Generalidades de *Stevia*: origen y descripción botánica

*Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta herbácea perenne originaria de Amabay, región fronteriza entre Paraguay y Brasil (Jarma, 2010). Pertenece a la familia Asteracea y se han descrito al menos 407 especies distribuidas desde Sudamérica hasta Norte América. Sin embargo, *S. rebaudiana* es la única que sintetiza steviolglicósidos (Brandle y Telmer, 2007).

Durante siglos, los habitantes de la región de Amabay y tribus guaraníes de Paraguay han empleado las hojas y extractos de esta planta para endulzar alimentos y bebidas (Soejarto, 2002; Landazuri y Tigrero, 2009). En 1899 esta planta fue clasificada por el botánico Moisés Santiago Bertoni con el nombre de *Eupatorium rebaudium*, en honor a los estudios del químico Paraguayo Ovidio Rebaudi, quien en 1905 publicó el primer reporte de los compuestos presentes en esta planta (Bertoni, 1905). En 1905 se renombró como *Stevia rebaudiana* Bertoni en honor a las aportaciones de ambos investigadores (Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

El género *Stevia* presenta al menos 144 variedades con diferentes ecotipos (Segura *et al.*, 2014). Sin embargo, las variedades Morita I y Morita II son de mayor valor comercial debido al mayor rendimiento (expresado en gramos de hoja seca por planta), contenido de steviolglicósidos y alta estabilidad fenotípica (Valencia, 2000; Jarma-Orozco *et al.*, 2011).

En estado silvestre, es decir su hábitat natural, la planta puede crecer de 40 a 80 cm de altura (Jarma *et al.*, 2005), aunque Núñez (2010) menciona que en algunas regiones tropicales puede llegar a medir hasta 1.5 m de altura. Stevia posee un tallo sub-leñoso, pubescente con ramificaciones que forman múltiples brotes. La raíz es fibrosa y filiforme, que forma una cepa que no profundiza sino se distribuye cerca de la superficie (De Vargas, 1980). Algunas variedades de stevia presentan hojas ovaladas con borde acerrado, por ejemplo, las variedades Eirete y Rebaudiana. En el caso de las variedades Morita I y Morita II presentan hojas lanceoladas con borde acerrado (Figura 1).



Figura 1. Morfología de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, a) variedad Eirete y b) variedad Morita II.

En etapa vegetativa, las hojas se disponen opuestas y en etapa reproductiva llegan a ser alternadas para dar lugar a la formación de flores. Stevia es una planta alógama, es decir, se reproduce por fecundación cruzada (Jarma, 2008). Las flores presentan corola tubular, son pentalobuladas y se agrupan en panículas corimbosas (Marín, 2004). Sus frutos son aquenios de color oscuro cuando son fértiles y de color claro

cuando son infértiles (Monteiro, 1982; Lester, 1999; Madan *et al.*, 2009; Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

Yadav *et al.* (2011) mencionan que stevia es una planta de días cortos y florece en los meses de enero a marzo en el hemisferio sur y, de septiembre a diciembre en el hemisferio norte; aunque el proceso varía de acuerdo a la sensibilidad de la variedad al fotoperiodo, que puede oscilar entre 8 y 14 horas (Chalaphati *et al.*, 1997). Asimismo, algunos autores mencionan que la floración puede iniciar entre 54 y 100 días después del transplante.

La acumulación de steviósidos tiende a ser más alta en las hojas basales, es decir, las hojas más viejas contienen más edulcorante que las hojas jóvenes; sin embargo, al iniciar la floración la concentración y síntesis de estos compuestos declina. La raíz es el único órgano que no produce steviolglicósidos (Singh y Rao, 2005).

## **2. 2. Ruta de síntesis de steviolglicósidos (SG´s)**

Los steviolglicósidos son diterpenos sintetizados bajo la ruta del ácido giberélico a partir del mevalonato (Geuns, 2003; Hsieh y Goodman, 2005; Jarma *et al.*, 2010). Posteriormente, los steviolglicósidos y las rutas del ácido giberélico divergen en el kaureno, que se convierte en el “esqueleto” de los steviolglicósidos para formar los diversos edulcorantes. Yadav *et al.* (2011) mencionan que las moléculas precursoras se sintetizan en el cloroplasto, de ahí son transportadas al retículo endoplásmico, al aparato de Golgi y posteriormente a las vacuolas (Figura 2).

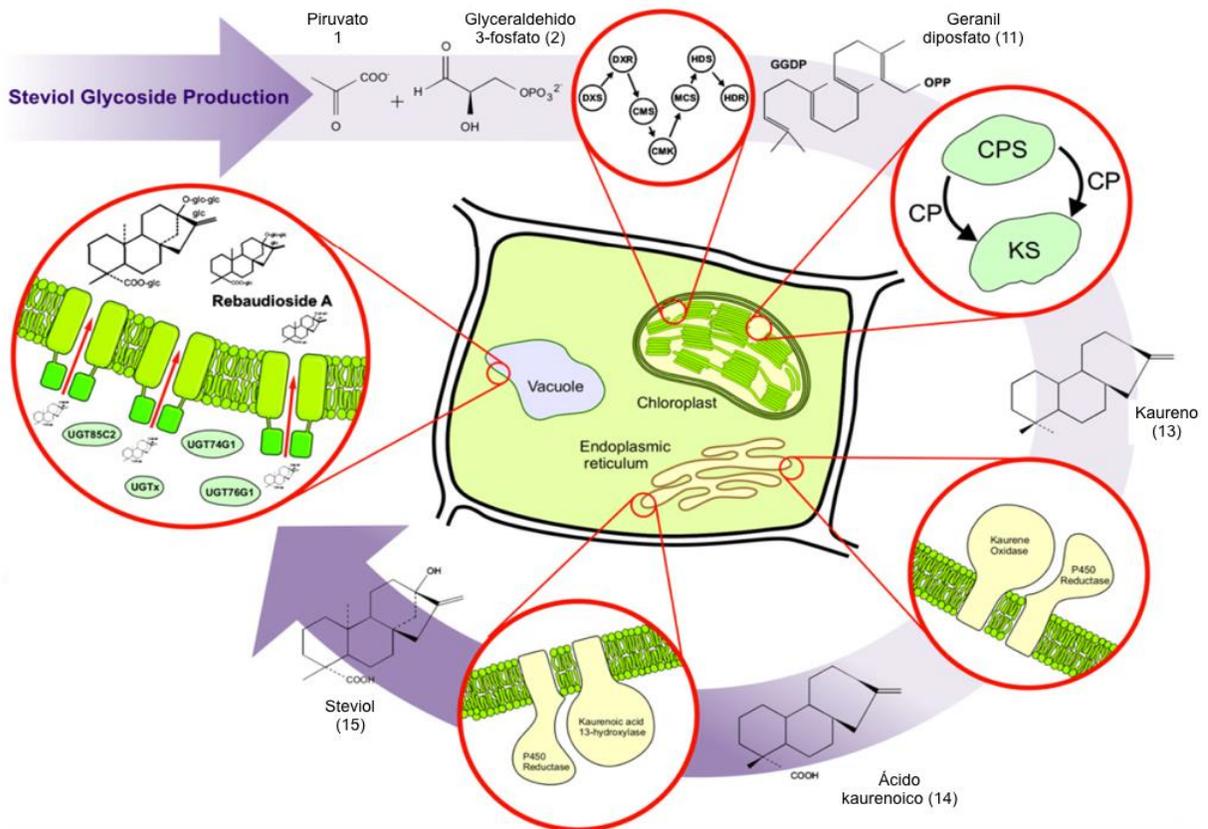


Figura 2. Localización subcelular de la síntesis de steviolglicósidos.

Genes involucrados en la síntesis de steviolglicósidos: DXS (Desoxicelulosa -fosfato cintasa), DXR (Deoxicelulosa 5-fosfato reductoisomerasa), CMS (4-difosfocitidyl-2-C-metil- D-eritol sintasa), CMK (4-difosfocitidil-2-C-metil D-eritritol kinaza), MCS (4-difosfocitidil-2-C-metil- D-eritritol 2,4- ciclodifosfato cintasa), HDS (1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4-difosfato sintasa), HDR [Hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4 difosfato reductasa], GDPS (Geranilgeranil difosfato sintasa), CDPS (Copalil difosfato sintasa), KS (kaureno sintasa), KO (Kaureno oxidasa), KAH (Ácido kaurenoico 13-hidroxilasa). Enzimas Glucosiltransferasas: UGT85C2, UGT74G1, UGT76G1 (modificado de: Brandle y Telmer, 2007).

La acumulación de steviósidos como parte del metabolismo secundario de stevia no ha sido esclarecido. Lim *et al.* (2003) proponen que puede tratarse de mecanismos de defensa contra insectos y como alternativa para controlar los niveles de ácido giberélico.

### 2. 3. Importancia comercial

*Stevia rebaudiana* es una planta de interés comercial tanto en la industria de alimentos y bebidas como en la farmacéutica debido a sus diversos componentes, entre los que destacan steviolglicósidos, antioxidantes, flavonoides, ácidos clorogénicos, vitaminas, minerales (Jeppense *et al.*, 2002). Dichos compuestos le brindan a la stevia, ventajas frente a los edulcorantes artificiales que han sido cuestionados por los efectos negativos en la salud humana (Yadav *et al.*, 2007; Carackostas *et al.*, 2008). En este contexto, existen reportes acerca del uso de stevia para el tratamiento de enfermedades vasculares como la diabetes mellitus, la hipertensión (Chan *et al.*, 1998; Jeppesen *et al.*, 2002), como agente diurético y en la prevención de caries dental (Kinghorn y Soejarto, 1991; Lemus-Moncada *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2011). Los beneficios a la salud asociados al consumo de Stevia se atribuyen a su composición nutricional (Salgado, 2013) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Compuestos presentes en hojas secas de Stevia (g 100 g<sup>-1</sup> peso seco).

Componente	Savita <i>et al.</i> (2004)	Tadhani- Subhash <i>et al.</i> (2006)	Mishra <i>et al.</i> (2010)	Goyal <i>et al.</i> (2010)	Serio (2010)	Abou- Arab <i>et al.</i> (2010)	Kaushik <i>et al.</i> (2010)
Humedad	7	ND	7	4.6	ND	5.4	7.7
Proteína	9.8	20.4	10	11.2	11.2	11.4	12
Grasa	2.5	4.3	3	1.9	5.6	3.7	2.7
Ceniza	10.5	13.1	11	6.3	ND	7.4	8.4
Carbohidratos	52	35.2	52	ND	53	61.9	ND
Fibra cruda	18.5	ND	18	15.2	15	15.5	ND

ND: No determinado. Modificado de Lemus-Moncada *et al.* (2012).

Otras características de los steviósidos que incrementan su potencial en la industria es la alta solubilidad en agua, su estabilidad a altas temperaturas (100 ° C), además de que no son fermentables (Kinghorn y Soejarto, 1985).

#### **2. 4. Propagación y cultivo**

Aunque es posible propagar stevia por la vía sexual, el porcentaje de germinación de la semilla es bajo, adicionalmente, la reproducción sexual es limitante cuando se trata de establecer cultivos comerciales debido a la variación genética y fenológica (Lester, 1999; Taware *et al.*, 2010; Lemus-Moncada *et al.*, 2012). Por esta razón, convencionalmente la stevia se propaga mediante el enraizamiento de esquejes, ya sean brotes apicales o secciones intermedias del tallo con dos o tres nudos (Hearn y Subedi, 2008). Al respecto, Gvasaliya *et al.* (1990) mencionan que se puede obtener hasta 98 % de esquejes enraizados cuando se emplean brotes jóvenes con cuatro nudos. Estos autores también recomiendan evitar usar brotes con yemas florales, debido a que el tejido difícilmente enraíza.

El contenido de steviolglicósidos (SG´s) puede variar entre 4 y 20 % del peso seco de las hojas (Kennely *et al.*, 2002). Al respecto, Ashwini *et al.* (1996) reportan que algunas variedades cultivadas en Paraguay, como Morita I y Morita II, contienen de 9 a 13 % de SG´s. Sin embargo, estas mismas variedades cultivadas en China e India pueden contener de 5-6 y 9 %, respectivamente.

El potencial endulcorante de los diferentes steviósidos tomando como referencia a la sacarosa (sacarosa=1) es de 250 a 300 para el steviósido, de 350 a 450 para el

rebaudiosido A, de 300 a 350 del rebaudiósido B, de 50 a 120 del rebaudiósido C, de 200 a 300 rebaudiósido D, de 50 a 120 rebaudiósido E y de 100 a 120 del steviolbíosido (Crammer y Ikan, 1986; Jarma *et al.*, 2011). Sin embargo, la concentración de SG's varía en función al genotipo, ambiente y manejo del cultivo (Kennely, 2002; Jarma *et al.*, 2011).

## **2. 5. Micropropagación de Stevia**

Como componente fundamental de la biotecnología, el cultivo de tejidos vegetales y en particular la micropropagación, permite la multiplicación masiva de plantas seleccionadas, con alta homogeneidad para el transplante a campo y libre de fitopatógenos. Asimismo, resulta clave para estudios de mejoramiento genético.

En cuanto a la propagación *in vitro* de stevia, existen diversos reportes de éxito donde emplean el medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog (MS, 1962) por ejemplo: Sairkar *et al.* (2009) reportan que obtuvieron 83.2 % de brotes (1.55 brotes por explante) al cultivar explantes foliares y segmentos nodales en 3.5 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencil aminopurina (BAP). Estos brotes fueron enraizados en un medio MS al 50 % de su concentración suplementado con 100 mg L<sup>-1</sup> de carbón activado. Verma *et al.* (2011) encontraron que cultivar segmentos nodales en sales basales del medio MS suplementado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0.5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina promovía la formación de brotes en 81% de éstos y 17.5 brotes a partir de cada uno de ellos. Los brotes obtenidos formaron raíces (88%) en un medio con 2.0 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB) y mostraron alta capacidad para sobrevivir (95%) en condiciones de invernadero.

Khalil *et al.* (2014) evaluaron técnicas de propagación *in vitro* de Stevia empleando explantes foliares los cuales fueron cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de BAP y ácido 2, 4- diclorofenoxiacético (2,4-D) y reportan que el 86 % de los explantes cultivados *in vitro* formaron callo y el 96 % formaron brotes.

En estudios del efecto de diferentes concentraciones y combinaciones de BAP y ácido naftalenacético (ANA), Rangappa y Aind (2013) reportan que someter yemas axilares de hojas jóvenes al efecto de la combinación de 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, el 92 % de los explantes formaron brotes con un promedio de 9.8 brotes por explante.

Por su parte, Razak *et al.* (2013) cultivaron explantes nodales de stevia en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de BAP y cinetina para inducir brotes adventicios; y posteriormente, evaluaron diferentes concentraciones de ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA) para la inducción de raíces de los brotes regenerados. Ellos reportan que el 68 % de explantes formaron brotes con un promedio de 1.55 brotes en el tratamiento resultante de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.25 mg L<sup>-1</sup> de cinetina. Asimismo, obtuvieron 30 % de rizogénesis con 1.0 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Posteriormente, las vitroplantas fueron aclimatadas en un sustrato compuesto de tierra negra, fibra de coco y humus, y obtuvieron 83 % de supervivencia.

## **2. 6. Medios de cultivo**

El medio de cultivo proporciona nutrientes básicos para que los explantes puedan regenerar plantas (Cañal *et al.*, 2001). La adaptación del explante al medio de cultivo y la influencia de los reguladores de crecimiento permite la formación de células

indiferenciadas y masa embrionaria (embriogénesis directa o indirecta) e incluso, la regeneración de órganos (organogénesis). Sin embargo, se requiere de investigación previa para determinar la mejor combinación de nutrientes, reguladores de crecimiento, fuente de carbono y agente gelificante para lograr la óptima respuesta del explante.

Los nutrientes del medio de cultivo pueden clasificarse de acuerdo a su importancia para el crecimiento de la planta, ya sea en algún proceso fisiológico, como activador de enzimas, o como constituyentes de biomoléculas y compuestos orgánicos (Alcantar *et al.*, 2013). De esta manera, los nutrientes se clasifican en macro elementos y micro elementos, de acuerdo al rol que desempeñan en la planta.

### **2. 6. 1. Macroelementos**

De acuerdo con Alcantar *et al.* (2013), los macro elementos son los principales constituyentes estructurales de las biomoléculas (carbohidratos, enzimas y proteínas, etc.) y participan en todas las funciones fisiológicas y metabólicas de la planta (fotosíntesis, respiración, transpiración, etc.).

#### **Nitrógeno (N)**

Es elemento primordial para la planta, ya que es un componente estructural de proteínas, enzimas, coenzimas, aminoácidos, vitaminas, nucleótidos, grupos amino, etc. También está presente en las porfirinas de la clorofila y en los citocromos (Fagueria, 2009). Las principales formas asimilables para la planta son amonio ( $\text{NH}^4$ ) o nitratos ( $\text{NO}^3$ ). El nitrógeno es componente de las paredes celulares, por lo tanto, su deficiencia

genera baja tasa de crecimiento, formación de hojas pequeñas y subsecuentemente, reducción del índice foliar y baja actividad fotosintética. Asimismo, influye en el volumen de los brotes, y ganancia en peso de tallos y hojas (González *et al.*, 2012).

La deficiencia de nitrógeno genera clorosis (coloración verde pálido que puede llegar a tornarse amarillenta o púrpura en tejidos y nervaduras foliares) debido a la disminución en la síntesis de citocromos y pigmentos fotosintéticos: Los primeros síntomas de la clorosis se presentan en hojas viejas, debido a que el N es un elemento móvil. Así mismo, se detiene o disminuye el crecimiento de órganos, incluso puede generar muerte celular de órganos y tejidos, principalmente en hojas y frutos (Favela *et al.*, 2006).

En el caso del cultivo de tejidos, Ávila *et al.* (2013) mencionan que la fuente nitrogenada influye sobre la respuesta morfogénica *in vitro*, no solo entre especies sino dentro de la misma especie.

### **Fósforo (P)**

Este nutrimento es componente de ácidos nucleicos, fosfoproteínas y fosfolípidos como las lecitinas (constituyentes de las membranas citoplasmáticas). Participa en los procesos metabólicos, así como en el almacenamiento y transferencia de energía como constituyentes del ATP (adenosin trifosfato), ADP (adenosin difosfato), AMP (adenosin monofosfato) y P<sub>Pi</sub> (pirofosfato) (Salisbury y Ross, 1994).

Las plantas absorben el fósforo en forma de fosfatos inorgánicos, principalmente en forma de aniones  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ . El fósforo interviene en la formación de órganos reproductores y en la calidad de frutos, ya que es un modulador de la utilización del azúcar y almidón. La deficiencia de fósforo impide la exportación de triosas fosfatadas del cloroplasto y, por consiguiente, en la síntesis de sacarosa (Mengel y Kirkby, 1987).

Las plantas deficientes de fósforo presentan enanismo, coloración verde intenso en las nervaduras de hojas y tallos, incluso coloración marrón o púrpura, debido a la formación de antocianinas (Azcón-Bieto, 2000).

### **Potasio ( $\text{K}^+$ )**

Es cofactor o activador de más de 50 enzimas del metabolismo de carbohidratos y proteínas. Participa en el equilibrio iónico y en regulación osmótica debido a que es el catión más abundante en la vacuola y citoplasma (p. ej. entre 2000 y 5000 ppm en el xilema de remolacha azucarera). Desempeña un papel clave en la apertura y cierre estomático (Azcon-Bieto, 2000).

El K es crucial para la nutrición, crecimiento, tropismo, homeostasis enzimática y osmoregulación. También incrementa la rizogénesis y mejora la absorción de agua y nutrientes. Está relacionado con la síntesis de clorofila o con la prevención de la descomposición de la misma. Un síntoma característico de la deficiencia de K es la destrucción de la clorofila y pigmentos fotosintéticos (clorosis, coloración amarillenta, etc.) (Fageria, 2009).

La deficiencia de K genera amarillamiento de los bordes de hojas basales y posteriormente desecación conforme avanza la deficiencia incluso la defoliación prematura (Favela *et al.*, 2006).

### **Azufre (S)**

Está presente en las proteínas y aminoácidos (cistina, cisteína, metionina, tiamina, nicotina y coenzima A, entre otros). Participa en reacciones de intercambio de energía: respiración, síntesis y degradación de ácidos grasos, así como en la síntesis de glucósidos de diterpenos (Jarma-Orozco *et al.*, 2010).

La planta tiende a cubrir sus requerimientos de S orgánico o mineralizado del suelo ( $\text{SO}_4$ ) a través de la raíz y simultáneamente, está capacitada para fijarlo en forma de gas ( $\text{SO}_2$ ) en las hojas, aunque este tipo de absorción ocurre únicamente en regiones industriales; en éste caso, el excedente es almacenado como sulfato y posteriormente, puede ser reducido e incorporado en moléculas orgánicas en la medida que planta lo requiera (Alcantar *et al.*, 2013).

La deficiencia de S genera clorosis en hojas jóvenes y reducción del número de hojas nuevas (Jarma-Orozco *et al.*, 2010).

### **Calcio (Ca)**

Es un nutriente básico para el óptimo crecimiento vegetal, ya que participa como componente y estabilizador de la membrana y pared celular. En tejidos meristemáticos, es esencial en la división y elongación celular, ya que se requiere de él para la formación

de la lámina media en la placa celular que se forma entre dos células hijas (White *et al.*, 2000). La concentración de Ca en la célula se distribuye de la siguiente manera: vacuola > pared celular > retículo endoplásmico > plasmalema > citoplasma. Sin embargo, en plantas jóvenes puede encontrarse mayor concentración en el protoplasma y en las membranas celulares, mientras que en plantas adultas se depositan en las vacuolas en forma de oxalacetato, principalmente en hojas adultas (Navarro y Navarro, 2003).

El Ca activa reacciones en cadena y cumple con funciones de mensajero secundario y modulador enzimático, sobre todo en el citosol cuando se asocia con las calmodulinas. También participa en el mecanismo de acción de citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, acetilcolina y el fitocromo (Salisbury y Ross, 1994).

La planta absorbe y transporta calcio como ion  $\text{Ca}^{+2}$ , principalmente vía xilema, dependiendo de su concentración y de las tasas de transpiración; asimismo, la tasa de absorción de  $\text{Ca}^{+2}$  es dependiente de los iones antagónicos en la solución, por ejemplo, es mayor cuando existen iones  $\text{NO}^{-3}$  en la solución (Dunlop, 1973). También participa en el equilibrio electrostático de la célula, debido a que la mayor concentración se encuentra en las vacuolas, donde contribuye al balance de anión- catión actuando como ion acompañante de aniones orgánicos e inorgánicos.

Los síntomas de deficiencia de  $\text{Ca}^{+2}$  son más visibles en tejidos jóvenes y zonas meristemáticas de raíz, tallo y hojas, y se caracteriza por disminución de crecimiento y necrosis de tejidos apicales (Azcon-Bieto, 2000).

Utumi *et al.* (1999) indujeron deficiencias de  $\text{Ca}^{+2}$  en plantas de stevia y observaron síntomas de necrosis apical en primordios foliares, que resultó en la muerte de las plantas; asimismo, disminuyó el contenido de steviósidos, las ramas formadas eran quebradizas y hubo reducción de longitud y grosor de raíces.

### **Magnesio (Mg)**

Además de estar presente en las clorofilas participa como cofactor o activador en reacciones enzimáticas asociadas al ATP en la transferencia de energía (fotosíntesis, glucólisis, ciclo de Krebs) (Taíz y Zeiger, 2006). Participa en la fosforilación del ácido mevalónico (AMV), unidad de cinco átomos de carbono, específica de la biosíntesis de terpenos, para formar isopentenil pirofosfato (PPI), primer compuesto isoprenoide en la síntesis de steviolglicósidos (Jarma-Orozco *et al.*, 2010).

Alcantar *et al.* (2013) mencionan que la biosíntesis de clorofila requiere de la inserción de Mg en la estructura de la porfirina para formar Mg-protoporfirina, reacción que es además catalizada por la enzima Mg-quelatasa (Walker y Weinsten, 1991).

La deficiencia de Mg se manifiesta en hojas adultas y se caracteriza por clorosis intervenal y en los bordes de la hoja (Favela *et al.*, 2006).

### **Hierro (Fe)**

Es componente de enzimas y participa en la transferencia de electrones (reacciones redox), como en los citocromos, en las cadenas de transporte electrónico debido a su capacidad de cambiar de valencia. Es cofactor en más de 130 enzimas que canalizan

reacciones bioquímicas que intervienen en la fotosíntesis, respiración, reducción de nitratos y sulfatos (Imsande, 1998).

Alcantar *et al.* (2013) mencionan que el Fe participa en la síntesis de clorofila y el funcionamiento y estructura de cloroplasto; su deficiencia en las plantas provoca clorosis férrica que conlleva a la disminución de la concentración de las clorofilas, carotenos y xantofilas, lo que afecta el transporte de electrones en los fotosistemas (Römheld y Marschner, 1981).

## **2. 6. 2. Microelementos**

### **Manganeso (Mn)**

Es constituyente y activador de algunas enzimas como las descarboxilasas y deshidrogenasas que participan en la respiración, también cataliza la liberación de oxígeno en la fotólisis del agua.

En la naturaleza, el Mn existe en diversos estados de oxidación en el suelo que son insolubles, solo es absorbido en forma de catión divalente ( $Mn^{+2}$ ) después de la reducción de estos óxidos en la superficie de la raíz (Azcon-Bieto, 2000).

Los síntomas de deficiencia de Mn es la clorosis intervenal junto con el desarrollo de pequeñas manchas necróticas, esto puede estar asociado con la desorganización de las membranas del tilacoide, del núcleo y de las mitocondrias (Azcon-Bieto, 2000).

## **Zinc (Zn)**

Es fundamental en la síntesis de auxinas, especialmente en la ruta del triptófano que conduce a la formación de ácido indolacético. Es componente esencial y activador de las enzimas: carbonato deshidratasa, alcohol deshidrogenasa, algunas piridín nucleótido deshidrogenasa, glucosa-fosfato deshidrogenasa y triosafosfato deshidrogenasa (Favela *et al.*, 2006).

La deficiencia de Zinc produce clorosis intervenal, lo que se ha relacionado con un papel estabilizador sobre la molécula de clorofila. Otras alteraciones típicas de la deficiencia de Zn son la disminución del crecimiento de hojas y acortamiento de longitud de entrenudos, especialmente en especies leñosas (Azcon-Bieto, 2000).

## **Boro (B)**

El boro debe considerarse como un elemento formativo de las estructuras vegetales. La falta o déficit de éste elemento provoca una falta de ordenación normal y el desarrollo completo de varios tejidos. Las necesidades de B varían considerablemente entre especies y es común que una concentración que para algunas plantas puede ser adecuada, para otras resulte tóxica (Alcantar *et al.*, 2013).

El B participa en el metabolismo y transporte de carbohidratos por lo que su deficiencia afecta el proceso de conducción de los productos asimilados; de tal manera que las regiones meristemáticas presentarán déficit de azúcares mientras que las hojas fotosintéticamente activas acumularán estos productos (Alcantar *et al.*, 2013).

## **Cobre (Cu)**

La principal función del Cu en los vegetales está asociada con la activación y composición de la superóxido dismutasa (SOD) y de la plastocianina (enzima involucrada en el transporte de electrones entre los fotosistemas). El papel esencial de las enzimas SOD es la desintoxicación por radicales superóxido. Asimismo, es una molécula estructural de algunas enzimas como la citocromo oxidasa (enzima terminal de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria) que contiene dos átomos de Cu y dos de Fe (Alcantar *et al.*, 2013).

## **Molibdeno (Mo)**

Participa en reacciones de tipo redox como constituyentes de sistemas enzimáticos como el nitrato reductasa (responsable de la reducción de nitratos a nitritos) y de la nitrogenasa (fundamental en la fijación biológica de N). También forma parte de la enzima xantín deshidrogenasa oxidasa, implicada en la degradación (catabolismo) de bases púricas como la adenina y guanina (Alcantar *et al.*, 2013).

Favela *et al.* (2006) reportan que la deficiencia de Mo en cítricos disminuye el vigor y causa achaparramiento de la planta.

## **2. 7. Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962)**

Existe gran variedad de formulaciones nutritivas para el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales; sin embargo, el medio propuesto por Murashige y Skoog en 1962 (MS) es el más usado. Inicialmente fue desarrollado para el cultivo de células de tabaco

y actualmente se emplea para el cultivo *in vitro* de muchas especies vegetales. Este medio se caracteriza por presentar una relación amonio:nitrato ( $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ) 1:2 (González *et al.*, 2012). Asimismo, presenta componentes orgánicos: carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, que contribuyen en la nutrición del explante (Cuadro 2).

## **2. 8. Solución nutritiva universal Steiner (1984)**

Esta solución nutritiva fue diseñada en 1961 por Abram A. Steiner y se distingue por la relación estequiométrica entre aniones y cationes: a) iones nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) en relación 65:5:35, lo que equivale a 12, 1 y 7 meq  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente; y b) cationes:  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , en proporción 35:45:20, lo que equivale a 9, 4 y 7 meq  $\text{L}^{-1}$  respectivamente. La suma total de iones es de 20 meq  $\text{L}^{-1}$  (Cuadro 3).

La aplicación continua de solución nutritiva Steiner permite la absorción de iones a muy bajas concentraciones; sin embargo, una concentración baja no cubrirá la demanda mínima de nutrientes. Mientras que, concentraciones altas incrementará el consumo y puede generar efectos tóxicos (Steiner, 1984). En este sentido, determinar concentraciones óptimas está en función del cultivo (especie y etapa fisiológica) y de las condiciones ambientales (Juárez *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Componentes del medio Murashige y Skoog (1962).

Compuesto	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Macroelementos</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	370
<b>Microelementos</b>	
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	22.3
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	27.8
Na*EDTA	37.3
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
KI	0.83
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.025
NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.25
CoCl*6H <sub>2</sub> O	0.025
<b>Vitaminas</b>	
Inositol	100
Ácido ascórbico	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina	0.1
Glicina	2.0
<b>Fuente de carbono (g L<sup>-1</sup>)</b>	
Sacarosa	30
pH	5.7 a 5.8

Cuadro 3. Composición química de la solución nutritiva Steiner (1984).

Compuesto	Peso molecular	meq L <sup>-1</sup>	g para 1 L solución
<b>Macroelementos</b>			
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O (99.9 %)	118	9	1.062
KNO <sub>3</sub> (100 %)	101	3	0.303
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (100 %)	90	3	0.270
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	123	4	0.492
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 %; D=1.7 gxmL-1) *	32.6	1	22.56 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	174.2	1	0.136
<b>Microelementos</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.81	2.8	
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	168.94	2.2	
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	287.39	0.4	
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	249.55	0.008	
NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	241.92	0.1	
Fe-EDTA (1 % Fe)	345.85	42.85	

\* Este componente puede ser sustituido con KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se recomienda que los fertilizantes tengan pureza cercana a 100 %. Fuente: Alcantar *et al.* (2013).

## CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas y en los invernaderos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el Km 36.5 de la Carretera Federal México-Texcoco, municipio de Texcoco, Estado de México a 19° 29´ latitud norte, 98° 53´ latitud oeste y altitud de 2,250 msnm. El clima de esta región es templado subhúmedo con lluvias en verano y escasa precipitación en invierno. La temperatura y precipitación anual promedio es de 15. 2 ° C y 635.5 mm respectivamente.

### 3. 1. Material vegetal

Se utilizaron plantas de *S. rebaudiana* Bertoni variedad Eirete. Las plantas se propagaron mediante el enraizamiento de esquejes con el producto comercial Radix 50<sup>®</sup>. El sustrato empleado correspondió a una mezcla de tezontle:turba (CosmoPeat<sup>®</sup>) en relación 2:1. Las plantas fueron fertilizadas con el producto MiracleGro<sup>®</sup> que contiene 15 % de nitrógeno (N), 30 % de fósforo (P) y 15 % de potasio (K).

Las plantas madre fueron saneadas con solución fungicida Benomyl<sup>®</sup> 1 g L<sup>-1</sup> una semana previa al establecimiento *in vitro*.

### **3. 2. Establecimiento *in vitro*: desinfestación de explantes**

Se seleccionaron brotes de aproximadamente 20 cm de longitud con 5 nudos en promedio con un par de hojas opuestas, y se llevaron al laboratorio donde se eliminaron láminas foliares y se lavaron con jabón líquido y agua corriente.

Posteriormente, en la campana de flujo laminar se seleccionaron segmentos nodales (explantes) de 2 a 3 cm de longitud y se desinfestaron con solución de Benomyl<sup>®</sup> 1 g L<sup>-1</sup> por 10 min, seguido de 15 min en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % de ingrediente activo y 30 min en una solución de nanopartículas de plata (40 µL L<sup>-1</sup>) (AgROVIT-CP<sup>®</sup>). Posteriormente se eliminaron las zonas oxidadas y se establecieron en el medio de cultivo.

En el caso de los explantes provenientes de plantas variedad Morita II (bioensayos no reportados), el protocolo de desinfestación se ajustó de la siguiente manera: inmersión en Benomyl<sup>®</sup> 1 g L<sup>-1</sup> por 6 min, 8 min en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % y 25 min en 40 µL L<sup>-1</sup> de solución AgROVIT<sup>®</sup>.

### **3. 3. Bioensayo. Establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni en medios de cultivo MS y Yasuda *et al.***

Para conocer la respuesta morfogénica de los explantes de stevia frente a las condiciones *in vitro*, se desinfestaron segmentos nodales y se cultivaron en 50 y 100 % de concentración de sales basales de Murashige y Skoog (MS, 1962) y en las sales de Yasuda *et. al.* (1985) al 100 %, ambas suplementadas con 1.125 mg L<sup>-1</sup> de 6-

bencilaminopurina (BAP) y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 5.2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup> (Cuadros 4 y 5).

Cuadro 4. Comparación de la concentración de macro y micro elementos (mg L<sup>-1</sup>) de los medios de cultivo Murashige & Skoog (MS) y Yasuda et al. al cien por ciento de su concentración.

Componente	MS	Yasuda <i>et al.</i>
<b>Macronutrientes</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	412
KNO <sub>3</sub>	1900	475
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	-	170
CaCl <sub>2</sub>	440	-
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	370	92
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	85
<b>Micronutrientes</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	3.1
KI	8.3	-
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	22.3	-
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	-	6.8
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8.6	4.3
NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.25	0.125
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.025	0.005
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.025	-
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	-
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8
Fe EDTA	-	373

Fuente: Murashige & Skoog 1962) Yasuda et al. (1985)

Cuadro 5. Vitaminas y fuentes de carbono de los medios de cultivo Murashige y Skoog y Yasuda et al. al cien por ciento de su concentración.

Componente	MS	Yasuda <i>et al.</i>
Vitaminas (mg L <sup>-1</sup> )		
Inositol	100	100
Ácido ascórbico	100	-
Ácido nicotínico	0.5	1
Piridoxina HCl	0.5	1
Tiamina	0.1	10
Glicina	2.0	-
Fuente de carbono (g L <sup>-1</sup> )		
Sacarosa	30	30
pH	5.8	6.3

Fuente: Murashige & Skoog 1962) Yasuda et al. (1985)

En este estudio se empleó una sola condición de incubación proporcionada por una cámara de ambiente controlado con  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF), temperatura de  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y fotoperiodo de 16 h.

Después de 35 días de incubación se evaluó la supervivencia, contaminación, oxidación, reactivación del crecimiento y número de brotes por explante.

### 3. 4. Experimentos

A partir de los resultados obtenidos en el bioensayo se plantearon tres experimentos en el que se decidió probar dos concentraciones del medio MS (50 y 100%) y tres concentraciones de solución nutritiva Steiner (100, 200 y 300 %) y la comprobación de

los mejores tratamientos de ambos experimentos. Las características fisicoquímicas y concentraciones de los medios evaluados se describen en los Cuadros 6 y 7.

Los experimentos 1 y 2 se establecieron en verano, cuando las plantas madre se encuentran en etapa vegetativa. Mientras que en el experimento 3 se emplearon plantas cultivadas en invierno con inicios de floración (etapa reproductiva) (Figura 3).

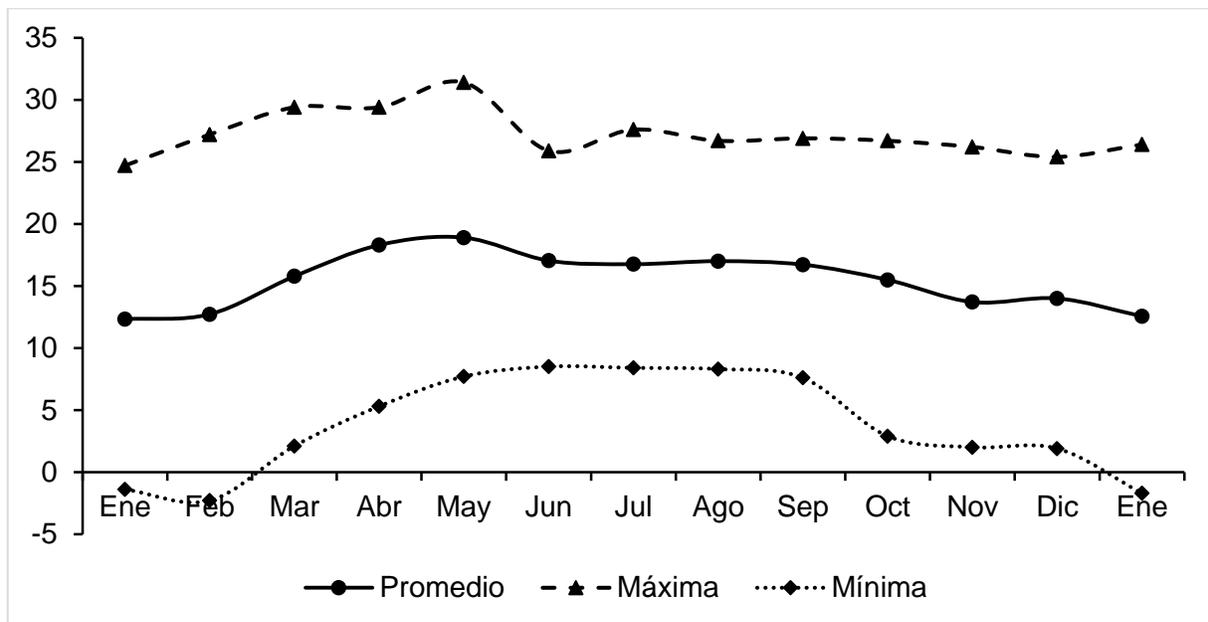


Figura 3. Temperatura mensual máxima, mínima y promedio de durante el crecimiento de las plantas madre, de enero 2016 a enero 2017. Fuente: Estación Agro-Meteorológica, COLPOS, Montecillo.

Los experimentos se sometieron a dos condiciones de incubación con el objetivo de determinar la combinación óptima para la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Cuadro 6. Composición del medio cultivo de Murashige y Skoog (1962) y Solución nutritiva Steiner y características fisicoquímicas.

Componente (mg L-1)	MS 50 %	MS 100 %	Steiner 100 %	Steiner 200 %	Steiner 300 %
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	1650	-	-	-
KNO <sub>3</sub>	950	1900	303	606	909
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	-	-	1062	2124	3186
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	220	440	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	220	370	492	984	1476
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	185	170	136	272	408
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *(100%)	-	-	270	540	810
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	3.1	2.8	5.6	8.4
KI	0.83	0.41	-	-	-
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	22.3	11.1	-	-	-
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	-	-	2.2	4.4	6.6
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8.6	4.3	0.4	0.8	1.2
NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.25	0.125	0.1	0.2	0.3
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.025	0.0125	0.008	0.016	0.024
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.025	0.0125	-	-	-
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	18.6	-	-	-
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	27.8	13.9	-	-	-
Fe-EDTA (1 % Fe)	-	-	42.85	85.7	128.55

Cuadro 7. Características fisicoquímicas del medio cultivo de Murashige y Skoog (MS) (1962) y Solución nutritiva Steiner al inicio de los experimentos.

Medio de cultivo	CE (dS)	pH	Ca <sup>++</sup> (ppm)	K <sup>+</sup> (ppm)	NO <sup>-3</sup> (ppm)
MS 50 %	2.7	5.7	95	390	1200
MS 100 %	5.5	5.7	190	800	2500
Steiner 100 %	2.0	5.6	210	260	720
Steiner 200 %	4.1	5.6	430	530	1400
Steiner 300%	6.0	5.6	580	800	2300

**3. 4. 1. Experimento 1. Efecto de concentraciones de medio MS y condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni**

Se emplearon explantes desinfectados de stevia variedad Eirete y se colocaron en frascos de vidrio con 8 mL de medio de cultivo líquido. En esta fase, los explantes se sometieron a cuatro tratamientos, resultado de la combinación factorial de dos concentraciones de sales basales de Murashige y Skoog (1962) y dos condiciones de incubación. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar con 35 repeticiones (un explante por repetición).

Las concentraciones de sales del medio MS fueron 50 y 100 % y ambas fueron suplementadas con 1.125 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP) y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. En sustitución del agente gelificante se utilizaron puentes de papel filtro para soporte del explante. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7. Las condiciones de incubación fueron en cámaras de ambiente controlado: 1) 140 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> densidad de

flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) + 28 ± 2 °C, y 2) 80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> DFFF y 26 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16 h en ambas cámaras.

Se registró la supervivencia de explantes con las siguientes características: tejido turgente, de coloración verde y con actividad morfogénica (Sandoval *et al.*, 2013). Asimismo, se registró el grado de oxidación (tejido con coloración rojiza moteado) y vitrificación (tejido hiperhidratado con apariencia transparente) de los brotes y hojas regeneradas; para ello se consideró el área afectada en escala de 0 a 100 %. También se contabilizó el número de brotes por explante, longitud de brotes (de la base del tallo al ápice) y el número total de hojas expandidas por explante.

Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey (P≤0.05). Los valores expresados en porcentaje fueron transformados con  $\sqrt{x+1}$ , ya sea para disminuir el coeficiente de variación, obtener homogeneidad de varianza o normalidad de los valores, según sea el caso. En estos análisis se utilizó el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.4.

### **3. 4. 2. Experimento 2. Efecto de la solución nutritiva Steiner y condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni**

Se desinfestaron explantes de stevia variedad Eirete y se establecieron en frascos de vidrio con 8 mL de solución nutritiva Steiner sin agar. Los explantes se sometieron a la combinación factorial de tres concentraciones de solución nutritiva Steiner: 100, 200 y 300 %; y se incubaron bajo las mismas condiciones del Experimento 1. Las soluciones

nutritivas fueron suplementadas con las vitaminas del medio Yasuda *et al.* (1985): 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 1 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl y 10 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 1.125 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP) y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. El pH se ajustó a 5.7.

En total se generaron seis tratamientos y se distribuyeron en un diseño completamente al azar con 35 repeticiones (un explante por repetición). Las variables respuesta y análisis de datos corresponden a las mencionadas en el experimento anterior.

### **3. 4. 3. Experimento 3. Efecto de la época del año, medios de cultivo, condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni**

Después de conocer los efectos de las soluciones nutritivas MS (50 y 100 %) y Steiner (100, 200 y 300 %), y las dos condiciones de incubación, se decidió comparar los mejores tratamientos durante el invierno. Para esto se desinfectaron explantes nodales y se cultivaron en medio de MS al 50 % y solución Steiner al 200 % de concentración y dos condiciones de incubación: 1) 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) + 28  $\pm$  2 °C, y 2) 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF y 26  $\pm$  2 °C, con fotoperiodo de 16 h. Para el establecimiento *in vitro* y preparación de los medios de cultivo se siguió la metodología descrita en los experimentos anteriores. Las características iniciales de los medios de cultivo utilizados se reportan en el Cuadro 6.

El experimento se estableció en el mes de enero. Los explantes nodales provenían de plantas crecidas en la época de invierno y se encontraban en floración (etapa

reproductiva). La cosecha de los segmentos nodales para cultivo *in vitro* se realizó en enero del 2017. El crecimiento y desarrollo de los nudos cosechados en las plantas madre ocurrió entre noviembre y diciembre del 2016.

La combinación de factores generó cuatro tratamientos y se distribuyeron en un diseño completamente al azar con 45 repeticiones, considerando un frasco con segmento nodal como repetición.

Se registró la supervivencia de explantes, el número de brotes por explante, longitud de brotes por explante, número total de hojas expandidas por explante, grado de oxidación y vitrificación a los 35 días después del establecimiento (dde). También se determinó el contenido de pigmentos fotosintéticos mediante espectrofotometría con el método descrito por Inskeep y Bloom (1985).

Al finalizar el experimento (55 dde), se registró nuevamente el pH, conductividad eléctrica (CE) y la concentración de iones  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{NO}^{-3}$  disponibles en las soluciones nutritivas y los iones  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{NO}^{-3}$  asimilados por las plantas. Para ello se maceraron las plantas muestreadas por tratamiento (repeticiones) para obtener un extracto global, debido a que el tamaño de una repetición (una planta) no cubría el volumen necesario (120  $\mu\text{L}$ ) para realizar la lectura y el número de repeticiones era limitado. En estas mediciones se emplearon los equipos: HORIBA LAQUAtwin<sup>®</sup> y Hanna<sup>®</sup> HI 991301 para conocer el pH, CE e iones, respectivamente.

### 3.5. Análisis de datos

Los datos de las evaluaciones no destructivas fueron sometidos a análisis de varianza (Anova) y comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los valores expresados en porcentaje fueron transformados con  $\sqrt{x+1}$  para disminuir el coeficiente de variación. En estos estudios se utilizó el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.4.

Para los datos de las evaluaciones destructivas se presentan valores promedio, debido al limitado tamaño de las vitroplantas y al número de repeticiones disponibles después de 55 días de establecimiento *in vitro*.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4. 1. Bioensayo: Establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni en el medio de Murashige y Skoog y Yasuda *et al.*

La etapa de establecimiento es fundamental en el desarrollo de protocolos de regeneración *in vitro*, ya que permite conocer la respuesta del explante frente a la disponibilidad de nutrientes de medio de cultivo y las condiciones de incubación. Asimismo, permite verificar la sanidad de material vegetal y la eficacia del proceso de desinfección. En este ensayo se aprecia que los valores de las variables respuesta son diferentes en cada uno de los tratamientos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Respuesta morfogénica de los explantes de *Stevia rebaudiana* establecidos en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento*	Supervivencia (%) <sup>+</sup>	Oxidación (%) <sup>+</sup>	Reactivación de crecimiento (%) <sup>+</sup>	No. brotes por explante <sup>++</sup>
1: MS 100 %	74	51.0	70	2.0 ± 0.5
2: MS 50 %	100	30.3	100	2.8 ± 1.1
3: Yasuda et al.	60	65.0	50	1.2 ± 0.8

\* MS: Medio de Murashige y Skoog (1962); Yasuda *et al.*: Medio de Yasuda *et al.* (1985).  
<sup>+</sup> Porcentaje calculado de 35 explantes por tratamiento. <sup>++</sup> Promedio de 35 repeticiones ± desviación estándar. Evaluación a los 35 días después de establecimiento.

Los explantes cultivados en el medio de cultivo MS al 50 % de su concentración, presentaron mayor porcentaje de supervivencia (100 %), reactivación de crecimiento (100 %) y número de brotes por explante (2.8) y oxidación (30.3 %), en comparación

con los explantes cultivados en MS al 100 %. Los valores más bajos para estas variables se observaron en los explantes que se cultivaron en el medio Yasuda *et al.* Esta solución se caracteriza por contener 1/4 de la concentración de macro y micro elementos del medio MS, lo que pudiera ser insuficiente para la morfogénesis *in vitro* de stevia.

Al respecto, González *et al.* (2012) reportan mayor número de brotes y hojas, así como mayor número y longitud de raíces en *Agave cocui* en los medios con 75, 50, incluso al 25 % de concentración, en comparación con el MS al 100 % de concentración. Por otra parte, los brotes regenerados en los diferentes tratamientos presentaron de 35 a 65 % de oxidación a partir de la quinta semana de cultivarse en el mismo medio (35 dde) (Figura 4).

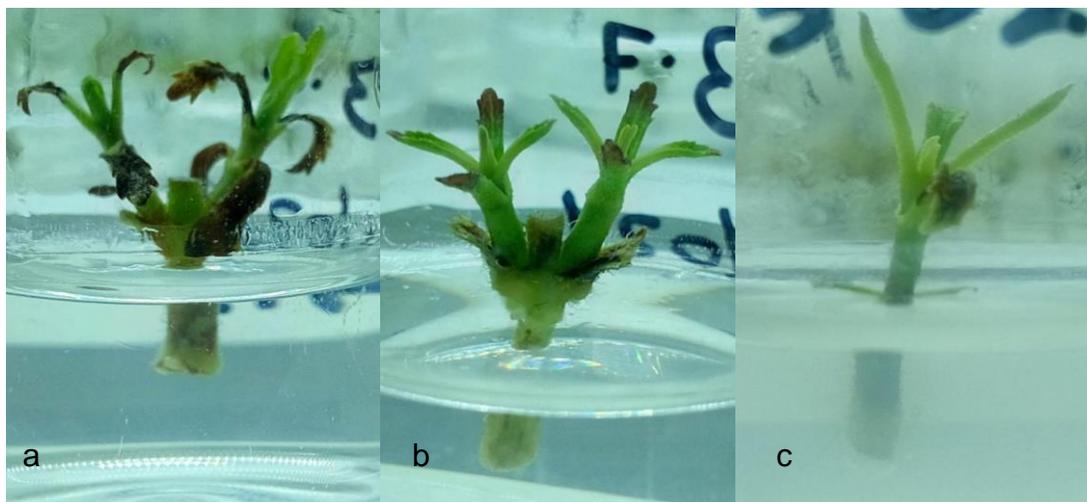


Figura 4. Presencia de oxidación en brotes de *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivados en: a) MS 100 %, b) MS 50 % y c) Yasuda *et al.* Evaluación realizada a los 35 días después de establecimiento *in vitro*.

Al respecto, Kumar *et al.* (2014) en estudios de regeneración *in vitro* de stevia, reportan que los explantes provenientes de brotes jóvenes (de una a tres semanas de formación) exudan mayor proporción de compuestos fenólicos, en comparación con explantes provenientes de brotes de cuatro a siete semanas de edad. Asimismo, reportan que el porcentaje de supervivencia es menor cuando los explantes exudan compuestos fenólicos, es decir, al usar explantes jóvenes.

La presencia de oxidación en explantes y tejidos regenerados *in vitro* está relacionado con la formación de compuestos fenólicos y puede desencadenar desordenes fisiológicos, morfológicos, genéticos y epigenéticos tales como recalcitrancia, hiperhidratación y variación somaclonal (Van Staden *et al.*, 2006).

## **Experimento 1**

### **4.2. Efecto de la concentración del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) y la condición de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni**

Después de 35 días del establecimiento *in vitro* se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en las variables morfogénicas: número de brotes por explante, longitud del brote mayor y número de hojas expandidas en cada uno de los factores evaluados; mientras que en las variables vitrificación y oxidación sólo en la interacción de factores o en factores independientes, respectivamente. Asimismo, no se observó diferencias significativas en la variable supervivencia (Cuadro 9).

Cuadro 9. Suma de cuadrados del análisis de varianza para el efecto de dos concentraciones de medio Murashige & Skoog y dos condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Factor de variación	S (%) <sup>+</sup>	NB	LB (cm)	NH	Oxid (%)	Vit (%)
Concentración	0.068 NS	3.2 *	30.1 **	22.5 **	63.1 **	10.4 NS
Incubación	0.035 NS	2.1 **	43.0 **	36.2 **	27.0 *	7.1 NS
Conc*Incub	0.012 NS	2.2 *	26.2 *	11.5 *	10.0 NS	35.2 *
CV	10.4	26.9	44.4	34.9	42.6	77.5

<sup>+</sup> S= Supervivencia; NB: Número de brotes; LB: Longitud de brote; NH: Número de hojas; Oxid: Oxidación de explantes; Vit: Vitrificación. <sup>NS</sup> No significativo, \* significativo al 5 %, \*\* significativo al 1 %, CV=coeficiente de variación. Concentraciones del medio MS: 50 y 100 %. Condiciones de incubación: 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) + 28  $\pm$  2 °C y 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26  $\pm$  2 °C.

De acuerdo con la comparación de medias del efecto de los factores, los explantes cultivados en el medio MS al 50 %, presentaron mayor número de brotes por explante y longitud de brotes, así como mayor número de hojas expandidas. Adicionalmente, los brotes presentaron menor grado de oxidación en comparación con los explantes cultivados en MS al 100 %.

Estos resultados son similares a los de González *et al.* (2012) obtenidos en *Agave cocui* Trelease, quienes obtuvieron mayor acumulación de azúcares y mayor crecimiento de raíces en medio MS al 25 y 50 % de la concentración de sales inorgánicas. Mientras que Andrade-Rodríguez *et al.* (2015) en estudios con *Euphorbia leucocephala* Lotsy reportan que MS al 50 % generó efecto similar en altura de brote, diámetro de tallo y número de hojas que el mejor de sus tratamientos con el medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium) modificado.

Por otra parte, los explantes incubados en la mayor intensidad de luz y temperatura ( $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) presentaron mejor respuesta morfogénica: ya que tenían mayor número y longitud de brotes y hojas expandidas; sin embargo, el porcentaje de oxidación fue mayor. En contraste, los explantes incubados en la menor intensidad de luz y temperatura presentaron valores menores para estas mismas variables. Un comportamiento similar lo presentan las plantas cultivadas en campo e invernadero, ya que stevia requiere de días largos y de alta intensidad solar para aumentar la longitud de entrenudos, la formación de hojas, incrementar el área foliar y posteriormente, el peso seco (Landázuri y Tigrero, 2009) (Cuadro 10).

Asimismo, Jarma *et al.* (2011) mencionan que la radicación fotosintéticamente activa (RFA) ( $21.61 \text{ MJ/m}^2$ ) en combinación con temperaturas altas ( $29 \text{ }^\circ\text{C}$ ), favorece la distribución de fotoasimilados del tallo hacia la hoja en las plantas de stevia.

La comparación de medias del efecto de las interacciones señala que los tratamientos 1 (MS 100 % +  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 3 (MS 50 % +  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y 4 (MS 50 % +  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) generaron mayor número de brotes, longitud de brote mayor y número de hojas (Cuadro 11).

Cuadro 10. Comparación de medias del efecto de la concentración del medio Murashige y Skoog y de las condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Factores y niveles	S (%)*	NB	LB (cm)	NH	Oxid (%)	Vit (%)
<b>Concentración</b>						
MS 100 %	78.0 a	3.0 b	4.1 b	13.1 b	41.5 a	6.4 a
MS 50 %	91.0 a	4.4 a	5.1 a	20.3 a	24.9 b	9.9 a
<b>Incubación<sup>+</sup></b>						
C140	88.0 a	4.3 a	5.2 a	21.3 a	38.3 a	9.5 a
C80	80.0 a	3.3 b	4.1 b	12.3 b	27.5 b	6.7 a
CV	10.4	26.9	44.4	34.9	42.6	77.5 a

\* S= Supervivencia; NB: Número de brotes; LB: Longitud de brote; NH: Número de hojas; Oxid: Oxidación de explantes; Vit: Vitrificación. <sup>+</sup> Condiciones de incubación; C140: 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 28 $\pm$ 2 °C; C80: 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26 $\pm$ 2 °C. CV=coeficiente de variación. Medias con la misma letra por columna y por factor de estudio no presentan diferencias significativas (Tukey, P  $\leq$  0.05).

En cuanto a la propagación *in vitro* de stevia, algunos autores recomiendan usar el medio MS al 100 % de su concentración y temperaturas de incubación de 25  $\pm$  2 °C (Yadav *et al.*, 2011; Razak *et al.*, 2014). Sin embargo, en este estudio, usar MS al 50 % + 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26  $\pm$  2 °C de incubación, generó efectos similares que usar MS 100 % ya sea en 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26  $\pm$  2 °C o 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF+28 $\pm$ 2°C.

Cuadro 11. Comparación de medias del efecto de la interacción entre concentración del medio Murashige y Skoog y las condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Combinación de tratamiento <sup>+</sup>	S (%) <sup>*</sup>	NB	LB (cm)	NH	Oxid (%)	Vit (%)
1. MS100 + C140	85.0 a	4.2 a	5.2 a	20.2 a	44.0 a	4.9 b
2. MS100 + C80	71.0 a	2.0 b	3.1 b	7.5 b	39.1 a	8.1 ab
3. MS 50 + C140	92.0 a	4.4 a	5.3 a	22.5 a	33.1 ab	15.5 a
4. MS 50 + C80	88.0 a	4.5 a	5.0 a	18.2 a	17.9 b	5.4 b
CV	10.4	26.9	44.4	34.9	42.6	77.5

\* S= Supervivencia; NB: Número de brotes; LB: Longitud de brote; NH: Número de hojas; Oxid: Oxidación de explantes; Vit: Vitrificación. + Combinación de tratamientos: MS100 + C140= MS 100 % +140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 28  $\pm$  2 °C, MS100 + C80= MS 100 % + 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26  $\pm$  2 °C, MS50 + C140= MS 50 % + 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 28  $\pm$  2 °C y MS50 + C80 = MS 50 % +140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26  $\pm$  2 °C. CV=coeficiente de variación. Medias con la misma letras por columna y por factor de estudio no son significativamente diferentes (Tukey, P  $\leq$  0.05).

## Experimento 2

### 4.3. Efecto de la concentración de solución nutritiva Steiner y las condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro*

Después de 35 días del establecimiento *in vitro*, las concentraciones de la solución nutritiva Steiner (100, 200 y 300 %), las condiciones de incubación (140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 28  $\pm$  2 °C y 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26  $\pm$  2 °C) y su interacción, generaron efectos significativos (P $\leq$ 0.05) en todas las variables respuesta (Cuadro 12).

Cuadro 12. Suma de cuadrados del análisis de varianza del efecto de tres concentraciones de solución nutritiva Steiner y dos condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Fuente de variación	S (%) <sup>+</sup>	NB	LB (cm)	NH	Oxid (%)	Vit (%)
Concentración	0.3**	4.4 **	31.6 **	24.8 **	76.3 **	125.2 **
Incubación	1.9**	33.8 **	675.3 **	430.8 **	132.1 **	49.4 **
Conc*Incub	0.5**	3.5 **	62.9 **	58.1** *	218.0 **	25.8 *
CV	11.9	26.5	59.4	39.4	34.1	52.7

<sup>+</sup> S= Supervivencia; NB: Número de brotes; LB: Longitud de brote; NH: Número de hojas; Oxid: Oxidación de explantes; Vit: Vitrificación. <sup>NS</sup> No significativo, \* significativo al 5 %, \*\* significativo al 1 %, CV=coeficiente de variación. Concentraciones de solución nutritiva Steiner: 100, 200 y 300 %. Condiciones de incubación: 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) + 28  $\pm$  2 °C y 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26  $\pm$  2 °C.

Las soluciones nutritivas Steiner al 100 y 200 % generaron mayor porcentaje de supervivencia que la solución al 300 % de su concentración. El número de brotes fue mayor en Steiner 200 y 300 % que la solución al 100 %. Para las variables longitud de brotes y número de hojas la solución Steiner al 200 % fue significativamente más alto que Steiner al 100 y 300 %. Asimismo, la solución Steiner 200 % presentó valores más bajos de oxidación en comparación con Steiner al 100 y 300 %; sin embargo, los brotes generados presentan mayor porcentaje de vitrificación.

Al respecto, Steiner (1984) menciona que la absorción nutrimental de la solución está determinada por la fase de crecimiento, por el tipo de planta y de las condiciones ambientales del cultivo (temperatura, radiación, humedad relativa, etc.). En este contexto, los requerimientos nutrimentales del explante para el cultivo *in vitro* pueden ser muy diferentes y aún son poco dilucidadas.

Existen reportes de correlación positiva entre aumento del crecimiento vegetal y el incremento de concentraciones de la solución nutritiva Steiner. Por ejemplo, Enríquez del Valle *et al.* (2005) fertilizaron plantas de *Dendranthema grandiflora* en la etapa de aclimatación con diferentes concentraciones de solución Steiner (25, 50, 75, 100 y 125 %) y obtuvieron mayor altura, mayor diámetro de tallo, número de hojas, área foliar y biomasa conforme aumentó la concentración.

Por otro parte, la mayor intensidad de luz y temperatura ( $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2$  °C) generó mayor supervivencia de explantes de stevia; así como mayor cantidad y longitud de brotes por explante, mayor número de hojas y menor porcentaje oxidación, en comparación con menor intensidad de luz y temperatura. En contraste, algunos autores mencionan que incrementar la temperatura de incubación (30/26 °C día y noche) afectó negativamente el desarrollo morfogénico de *Solanum tuberosum* en comparación con el intervalo de temperatura óptima (27/25 °C día y noche) (Orozco *et al.*, 2000) (Cuadro 13).

En el análisis de comparación de medias del efecto de los tratamientos, se aprecia que la combinación Steiner 200 % +  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2$  °C (tratamiento 3) sólo fue superior a Steiner 100 % +  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2$  °C (tratamiento 2) en cuanto a la supervivencia de los explantes. En tanto que para el número de brotes por explante, longitud de brote y número de hojas, Steiner 200 % +  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2$  °C fue estadísticamente similar a Steiner 300 % +  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2$  °C, es decir, las concentraciones altas de solución Steiner en combinación con intensidad de luz y temperatura de incubación alta favorecen la morfogénesis de brotes

Cuadro 13. Comparación de medias del efecto de tres concentraciones de solución nutritiva Steiner y dos condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Factores y niveles	S (%)*	NB	LB (cm)	NH	Oxid (%)	Vit (%)
<b>Concentración</b>						
Steiner 100 %	71.0 ab	2.2 b	1.9 b	9.7 b	43.6 ab	12.1 b
Steiner 200 %	79.0 a	3.5 a	2.5 a	14.7 a	36.8 b	18.7 a
Steiner 300 %	58.0 b	2.8 ab	1.8 b	10.0 b	55.3 a	6.2 c
<b>Incubación</b>						
C140	92.0 a	4.3 a	3.9 a	22.4 a	35.5 b	15.2 a
C80	47.0 b	1.5 b	0.7 b	3.8 b	55.4 a	8.8 b
CV	11.9	26.5	59.4	39.4	34.1	52.7

\*S= Supervivencia; NB: Número de brotes; LB: Longitud de brote; NH: Número de hojas; Oxid: Oxidación de explantes; Vit: Vitricificación. CV=coeficiente de variación. Medias con la misma letra por columna y por factor de estudio no presentan diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). Condiciones de incubación: C140:  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y C80:  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF+  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

y hojas en stevia (tratamientos 3 y 5). Asimismo, el porcentaje de vitricificación de los brotes cultivados en Steiner 200 % +  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF+  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  (tratamiento 3) y Steiner 200 % +  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF+  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  (tratamiento 4) sólo fue estadísticamente diferente de aquellos cultivados en Steiner 100 % +  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF+  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  (tratamiento 2) y Steiner 300 % +  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF+  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  (tratamiento 6).

Algunos protocolos de propagación *in vitro* de stevia han utilizado menor intensidad lumínica y temperatura durante la incubación ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) que la usada en este trabajo (Shatwani *et al.*, 2011; Razak *et al.*, 2014). Sin embargo, los resultados de la presente investigación muestran que incrementar la intensidad de luz

y la temperatura favoreció la morfogénesis *in vitro* de stevia en ambos experimentos. Lo anterior concuerda con los reportes de Vaz *et al.* (2004) quienes mencionan que incrementar la temperatura de incubación a 27 °C (temperatura convencional 22 a 24 °C) en *Psychmorchis pusilla* (orquídea epífita), promovió mayor germinación *in vitro*, así como mayor tamaño de las plantas, número de hojas y peso fresco (Cuadro 14).

Cuadro 14. Comparación de medias del efecto de las interacciones entre la concentración de la solución nutritiva Steiner y las condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Combinación de tratamiento	S (%)*	NB	LB (cm)	NH	Oxid (%)	Vit (%)
1. S100 + C140	89.0 ab	3.0 b	2.9 b	14.6 b	48.9 b	16.4 ab
2. S100 + C80	54.0 c	1.5 c	0.9 c	5.7 c	38.6 bc	8.4 bc
3. S200 + C140	91.0 ab	5.4 a	4.7 a	28.5 a	28.9 c	18.8 a
4. S200 + C80	67.0 bc	1.9 bc	0.9 c	5.3 c	45.7 bc	18.6 a
5. S300 + C140	97.0 a	4.9 a	4.1 a	25.4 a	30.4 bc	11.0 ab
6. S300 + C80	22.0 d	1.1 c	0.2 d	1.1 d	88.4 a	2.6 c
CV	11.9	26.5	59.4	39.4	34.1	52.7

\*S= Supervivencia; NB: Número de brotes; LB: Longitud de brote; NH: Número de hojas; Oxid: Oxidación de explantes; Vit: Vitrificación. Medias con la misma letra por columna no presentan diferencias significativas Tukey ( $P \leq 0.05$ ), CV=coeficiente de variación. Combinación de tratamientos: S100=Steiner 100 %, S200=Steiner 200 % y S300: Steiner 300 %; C80:  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2^\circ$  y C140:  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2^\circ$ .

Aunque la solución nutritiva Steiner en combinación con  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2^\circ$  permitió obtener valores más altos para supervivencia, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas, que el medio MS al 50 % +  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2^\circ$ , los brotes regenerados también mostraron mayor grado de oxidación y

vitrificación, características que pueden repercutir negativamente en el comportamiento de las plantas bajo condiciones *ex vitro*. Por lo anterior, consideramos que la combinación entre MS al 50 % + 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26  $\pm$  2 °C proporciona las mejores condiciones de cultivo para la regeneración *in vitro* de stevia.

### Experimento 3

#### 4.4. Efecto de la época del año, medios de cultivo y condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Fue posible encontrar diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en cada una de las variables evaluadas (excepto vitrificación), por efecto del medio. El factor incubación sólo generó efectos significativos en las variables oxidación y vitrificación; mientras que la combinación de factores sólo influyó en la supervivencia de explantes (Cuadro 15).

Cuadro 15. Suma de cuadrados del análisis de varianza del efecto de dos medios de cultivo: MS 50 % y Steiner 200 % y dos condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Factor de estudio	S (%)+	NB	LB (cm)	NH	Oxid (%)	Vit (%)
Medio	1.208*	3.65*	12.78*	41.60*	327.05*	2.58 <sup>NS</sup>
Incubación	0.015 <sup>NS</sup>	0.23 <sup>NS</sup>	0.04 <sup>NS</sup>	1.06 <sup>NS</sup>	96.74*	83.57*
Medio*Incubación	0.183*	0.06 <sup>NS</sup>	0.28 <sup>NS</sup>	0.12 <sup>NS</sup>	0.02 <sup>NS</sup>	3.82 <sup>NS</sup>
CV	16.0	30.3	32.0	45.8	52.6	60.0

+ S= Supervivencia; NB: Número de brotes; LB: Longitud de brote; NH: Número de hojas; Oxid: Oxidación de explantes; Vit: Vitrificación. <sup>NS</sup> No significativo, \*\* significativo ( $P \leq 0.05$ ), CV=coeficiente de variación. Prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

En el análisis de comparación de medias del efecto de los factores se aprecia que las plantas regeneradas en MS al 50 % presentaron mayor supervivencia, número de brotes por explante, longitud de brotes por explante y número de hojas expandidas, así como menor porcentaje de oxidación, con respecto a las plantas cultivadas en Steiner al 200 %. Las condiciones de incubación sólo generaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en las variables de oxidación y vitrificación, donde la mayor intensidad de luz y temperatura promovieron los valores más altos (47 y 23 %) (Cuadro 16).

Cuadro 16. Comparación de medias del efecto de dos medios de cultivo MS 50 % y Steiner 200 % y dos condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Factores y niveles	S (%) <sup>+</sup>	NB	LB (cm)	NH	Oxid (%)	Vit (%)
<b>Medio</b>						
MS 50 %	58.0 a	2.4 a	2.0 a	8.8 a	22.8 b	16.1 a
Steiner 200 %	19.8 b	1.4 b	0.5 b	3.8 a	56.0 a	18.1 a
<b>Incubación<sup>++</sup></b>						
C80	40.3 a	1.8 a	1.2 a	5.7 a	29.1 b	11.2 b
C140	36.1 a	2.0 a	1.1 a	6.5 a	47.2 a	23.2 a
CV	16.0	30.3	32.0	45.8	52.6	60.0

<sup>+</sup> S= Supervivencia; NB: Número de brotes; LB: Longitud de brote; NH: Número de hojas; Oxid: Oxidación de explantes; Vit: Vitrificación. <sup>++</sup> C80:  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2$  °C; C140:  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2$  °C. Medias con la misma letra por columna y por factor de estudio no presentan diferencias significativas Tukey ( $P \leq 0.05$ ), CV=coeficiente de variación.

La comparación de medias del efecto de los tratamientos (combinación de factores) señala que el tratamiento 1, con MS 50 % +  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2$  °C sólo fue diferente al MS 50 % +  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2$  °C en el grado de oxidación y

vitrificación de brotes (menor en tratamiento 1). Sin embargo, ambos tratamientos indujeron la mayor longitud de brotes y número de hojas, y menores valores de oxidación y vitrificación, en comparación con los brotes cultivados en solución Steiner 200 % + 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26 $\pm$ 2 °C (Cuadro 17).

Cuadro 17. Comparación de medias del efecto de las interacciones entre solución nutritiva MS (50 %), Steiner (200 %) y dos condiciones de incubación en la morfogénesis *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Combinación de tratamientos	S (%) <sup>+</sup>	NB	LB (cm)	NH	Oxid (%)	Vit (%)
1. MS50 + C80	52.3 ab	2.3 a	2.2 a	8.5 a	16.2 c	10.0 b
2. MS50 + C140	63.6 a	2.5 a	1.8 a	9.1 a	30.6 b	23.5 a
3. S200 + C80	28.8 b	1.3 b	0.4 b	3.3 b	45.7 ab	13.7 ab
4. S200 + C140	11.1 c	1.6 ab	0.5 b	4.2 b	67.3 a	23.0 a
CV	16.0	30.3	32.0	45.8	52.6	60.0

<sup>+</sup> S= Supervivencia; NB: Número de brotes; LB: Longitud de brote; NH: Número de hojas; Oxid: Oxidación de explantes; Vit: Vitrificación. Letras iguales dentro de cada columna y factor de estudio no presentan diferencias significativas, Tukey (P  $\leq$  0.05), CV=coeficiente de variación. Combinación de tratamientos: MS 50 = Murashige y Skoog 50 %, S200= solución Steiner 200 %; C80= 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26  $\pm$  2 °C y C140= 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 28  $\pm$  2 °.

Las diferencias en los resultados de este experimento respecto a los experimentos 1 y 2 pueden deberse al estado nutricional de los explantes al momento de la cosecha de los explantes. Asimismo, puede deberse a las características de las plantas madre (estado fonológico, sanidad y edad de la planta), ya que este experimento se estableció en enero y las plantas madre crecieron a finales de otoño e inicios de invierno, cuando

la temperatura ambiental máxima, mínima fueron más bajas (13.5 y 13.3 °C, respectivamente), en comparación con los meses de abril a julio (25.6 y 17.8, respectivamente), época de verano cuando se cosechó y establecieron los experimentos 1 y 2 (Figura 3).

Las características fisiológicas de la planta madre están sujetas a la influencia de las condiciones ambientales y de la época del año (intensidad luminosa, temperatura, humedad relativa, etc.) (El-Farash *et al.*, 1993; Berthouly y Michaux-Ferreire, 1996). Al respecto, Pírela y Mogollón (1996) reportaron que la variación de temperatura, humedad y precipitación provocaron fluctuaciones en el desarrollo vegetativo de árboles de guayaba, que posteriormente influyeron en baja tasa de supervivencia, alto grado de oxidación y limitada respuesta morfogénica de los explantes cultivados *in vitro*. Asimismo, Bertram *et al.* (2002) reportan que la baja intensidad luminosa en la que cultivaron plantas madre de tomate influyó en la baja respuesta morfogénica de explantes.

Por otra parte, Midmore y Rank (2002) señalan que el crecimiento vegetativo de stevia declina cuando la temperatura de cultivo es menor a 20 ° C. Asimismo, temperaturas constantes menores a 20 ° C inducen la floración de stevia. Los resultados obtenidos en este experimento indican que la mejor época del año para obtener explantes que permitan la micropropagación de stevia es previa a la floración.

#### 4.4.1. Asimilación de iones

Después de 55 días de cultivo se apreció una disminución de la conductividad eléctrica (CE) y potencial de hidrógeno (pH), así como la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{NO}^{-3}$  de las soluciones nutritivas, respecto a los valores iniciales (Cuadro 18).

Cuadro 18. Contenido de iones disponibles en los medios de cultivo a los 55 días después de establecimiento *in vitro*.

Tratamiento*	CE (mS)	pH	$\text{Ca}^{+2}$ (ppm)	$\text{K}^{+}$ (ppm)	$\text{NO}^{-3}$ (ppm)
1. MS50 + 80	1.64±0.2	4.9±0.5	79±3	280±56	539±69
2. MS50 + 140	1.46±0.5	4.88±1.0	72±13	268±107	470±212
3. S200 + 80	3.29±0.4	5.61±0.7	363±50	487±68	803±82
4. S200 + 140	3.34±0.7	5.23±0.3	330±56	530±32	700± 61

\* Valores promedio de tres (Trat. 4) y cuatro repeticiones (Trats 1, 2 y 3) ± desviación estándar. Combinación de tratamientos: MS50: medio de Murashige y Skoog 50 %; S200: solución Steiner al 200%; +80:  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; +140:  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La baja asimilación de iones  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{NO}^{-3}$  puede relacionarse con la baja respuesta morfogénica de los explantes, ya sea por efecto de la composición de las soluciones nutritivas (concentración y fuente de nutrimento) o por la capacidad de regeneración del explante. Asimismo, podría pensarse que el explante (segmento nodal) proporcionó los nutrientes a suficientes (al menos por un tiempo) para la formación de los nuevos brotes, posiblemente hasta la etapa fisiológica donde el brote es capaz de absorber y transportan los nutrientes del medio de cultivo.

Cuadro 19. Contenido de iones asimilados por las plantas a los 55 días después de establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Ca <sup>2+</sup> (ppm)	K <sup>+</sup> (ppm)	NO <sup>-3</sup> (ppm)
1. MS50 + C80	74	895	805
2. MS50 + C140	68	970	870
3. S200 + C80	260	950	485
4. S200 + C140	230	460	700

\* Medición única obtenida del extracto de tres (Trats. 2, 3 y 4) o cuatro explantes (Trat. 1). Combinación de tratamientos: MS50: medio de cultivo Murashige y Skoog 50 %; S200: solución Steiner al 200%; C80: 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26  $\pm$  2 °C; C140: 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 28  $\pm$  2 °C.

Marin *et al.* (2010) mencionan que las plantas de *Lilium* sp. cultivadas en diferentes concentraciones y potenciales osmóticos de solución Steiner, presentaron una demanda moderada de N (92 a 211 mg L<sup>-1</sup>), y de K<sup>+</sup> (119 a 211 mg L<sup>-1</sup>), y muy baja demanda de Ca<sup>2+</sup> (34 a 126 mg L<sup>-1</sup>); además señalan que esta baja demanda puede ser el resultado de una removilización de nutrimentos almacenados en el bulbo.

#### 4.4.2. Contenido de pigmentos fotosintéticos

En cuanto al contenido de pigmentos fotosintéticos se observó que las plantas regeneradas bajo la combinación de MS 50 % + 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26  $\pm$  2 °C (tratamiento 1) presentaron mayor contenido de clorofila a, b, clorofilas totales y carotenoides, en comparación con las plantas cultivadas en MS 50% + 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 28  $\pm$  2 °C o con los tratamientos que incluían la solución Steiner 200% (Cuadro 20).

Cuadro 20. Contenido de pigmentos fotosintéticos de brotes regenerados *in vitro* en soluciones nutritivas MS 50 % y Steiner 200 % bajo dos condiciones de incubación. Evaluación realizada a los 35 días después del establecimiento.

Tratamiento	Clorofila a (mg g <sup>-1</sup> PF)	Clorofila b (mg g <sup>-1</sup> PF)	Cloroflas totales (mg g <sup>-1</sup> PF)	Carotenoides (mg g <sup>-1</sup> PF)
1. MS50 + C80	742±61	270±31	1011±92	20±1.4
2. MS50 + C140	482±53	93±13	286±34	7±0.7
3. S200 + C80	361±3	117±1.3	338±1	6±0.2
4. S200 + C140	80±15	67±0.9	148±24	4±0.3

Valores promedio de 3 repeticiones por tratamiento ± desviación estándar. PF: Peso fresco. Peso fresco muestra individual= 50 mg, volumen disolvente dimetil formamida: 6 mL. ± Desviación estándar. Combinación de tratamientos: MS50: medio de cultivo Murashige y Skoog 50 %; S200: solución Steiner al 200%; C80: 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26 ± 2 °C; C140: 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 28 ± 2 °C.

Estos resultados pueden ser efecto de los desórdenes fisiológicos de las plantas regeneradas en 50 % + 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 28 ± 2 °C o en solución Steiner en ambas condiciones de incubación, debido a que los brotes de estos tratamientos (2, 3, y 4) presentaron mayor grado de oxidación y de vitrificación en comparación con los de aquellos cultivados en MS 50 % + 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF + 26 ± 2 °C (tratamiento 1). Al respecto, Barrales *et al.* (2015) encontraron mayor contenido de clorofilas (clorofila a, b y ab) en vitroplantas de *Capsicum chinense* Jacq regeneradas con una intensidad lumínica de 28  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF que en las regeneradas en una intensidad mayor (225  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF).

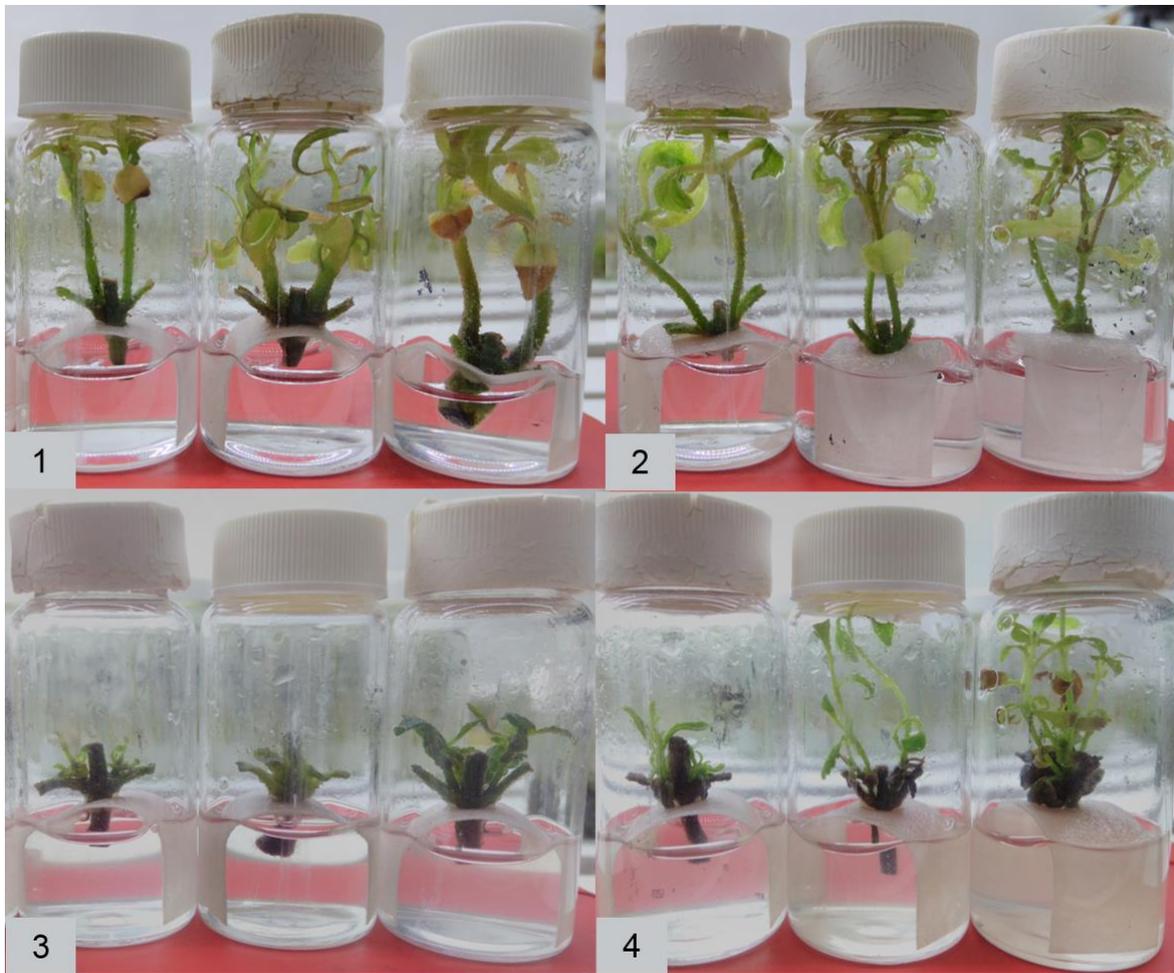


Figura 5. Vitoplasmas representativas de la combinación de factores de estudio: 1) MS 50 % +  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , 2) MS 50 % +  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 3) Steiner 200 % +  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y 4) Steiner 200 % +  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  DFFF +  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

El uso del medio MS al 50 % y la menor intensidad de luz y temperatura ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de densidad de flujo de fotones fotosintéticos +  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) generaron similar número de brotes, longitud de brotes y número de hojas que los tratamientos con MS 100 % en ambas condiciones de incubación, con la ventaja de que estas vitroplantas presentaron menor grado de oxidación y vitrificación que el resto de tratamientos.

Las tres concentraciones de solución Steiner permitieron la regeneración de brotes de stevia, y la mejor combinación resultó en Steiner al 200 % y  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de densidad de flujo de fotones fotosintéticos +  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Sin embargo, las vitroplantas presentan mayor grado de oxidación y vitrificación que las cultivadas en MS al 50 %.

La mejor época para obtener segmentos nodales para la propagación *in vitro* de stevia es durante la etapa vegetativa de las plantas madre, que corresponde a los meses de abril a julio.

Las condiciones de cultivo *in vitro* más propicias para la micropropagación de stevia a partir de segmentos nodales, consisten en el uso del medio MS al 50 % en combinación con  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de densidad de flujo de fotones fotosintéticos y  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullateef, R. A. and M. Osman. 2011. Influence of genetic variation on morphological diversity in accessions of *Stevia rebaudiana* Bertoni. International Journal of Biology 3:66-72.
- Alvarenga V., S., A. Abdelnour E. y V. Villalobos A. 2007. Conservación *in vitro* de chayote (*Sechium edule*). Agronomía Mesoamericana 18:65-73.
- Anbazhagan M., M. Kalpana, R. Rajendran, V. Natarajan and D. Dhanavel. 2010. *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal Food Agriculture 22:216-222.
- Ashwini, K. S. 1996. Production of múltiple shoots and somatic embryogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni through *in vitro* propagation. M. Sc. thesis, UAS, Bangalore, India.
- Ávila, A. de L., S. Pereyra y J. Arguello. 1998. Nitrogen concentration and proportion of NH<sub>4</sub> affect potato cultivar response in solid and liquid media. HortScience 33:336-338.
- Azcón-Bieto, J. and M. Talón. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal, 2ª Edición McGraw-Hill, Interamericana de España, Barceona, España p651.
- Barrales-López, A., A. Robledo-Paz., C. Trejo, E. Espitia-Rangel and J. L. Rodríguez-De La O. (2015) Improved *in vitro* rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* JACQ plantlets. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 51:274-283.

- Berthouly, M. and M. Michaux-Ferreire. 1996. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell & Organ Culture* 44:169-176
- Bertoni, M. 1905. Le Kaà He-è Sa nature et sea proprietes. *Anales Científicos Paraguayos* 5: 1-14.
- Bertram, L., B. Lercari, S. Mugnai and M. Salucci. 2002. Effect of light conditions during tomato fruit ripening on bioprotective compounds accumulation (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *International Information System for the Agricultural Science and Technology* 2:467-468.
- Boavidia, L. C. and S. McCormick. 2007. Temperature as determinate factor for increased and reproducible *in vitro* pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 52: 570-582.
- Brandle, J. E and P. G. Telmer. 2007. Steviolglycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68: 1855-1863.
- Carackostas, M. C., L. L. Curry, A. C. Boileau and D. J. Brusick. 2008. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chemistry* 46:1-10.
- Chalapathi, M. K. 1997. Natural non-calorie sweetener stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Future cross for India. *Crop Research* 14: 347-350.
- Chan, P., D. Y. Xu, J. C. Liu, Y. J. Chen, B. Tomlinson, W. P. Huang and J. T. Cheng. 1998. The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences* 63:1679-1684.

- Crammer, B. and R. Ikan. 1986. Sweet glycosides from the stevia plant. *Chemistry Britain* 22: 915-916.
- Cruz C., E., M. Sandoval V., V. H. Volke H., A. Can C. y J. Sánchez E. (2012) Efecto de mezclas de sustratos y concentración de la solución nutritiva en el crecimiento y rendimiento de tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:1361-1373
- De Oliveira, M. V., R. Forni-Martin, M. Magalhães and N. Alves. 2009. Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 27: 22-19.
- De Vargas, R. 1980. Informe técnico sobre estancia en Japón para observar la producción, comercialización de stevia. *Colombia Ciencia y Cultura* 29:1240-1248.
- El-Farash, E. M., H. I. Abdalla, A. S. Taghian and M. H. Ahmand. 1993. Genotype, explant age and explant type as affecting callus and shoot regeneration in tomato. *Assiut Journal of Agricultural Science* 24:3-14.
- Enríquez del Valle, J.E. G. Carrillo C., P. Sánchez G., M. N. Rodríguez M. y M. C. Mendoza C. 2000. Fertilización para la óptima adaptación y vigor de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) obtenidos *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 23: 59-67.
- Enríquez del Valle J. R., B. Velásquez T., A. R. Vallejo F. y V. A. Velasco V. 2005. Nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas *in vitro* durante su aclimatación en invernadero. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28:377-383.
- Estación Agro-Meteorológica, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo: <http://www.cm.colpos.mx/meteoro/index.htm> (Julio, 2017).

- Fageria, N. K. 2009. The use of nutrients in cross plants. CRC Press. Boca Ratón, Florida.
- Favela C., E., P. Rangel P., A. Benavides M. 2006. Manual para la preparación de soluciones nutritivas. Departamento de Horticultura. Universidad Autónoma Antonio Narro. Torreón Coahuila, México p145.
- Foyer, C. H., H. López-Delgado, J. F. Dat and I. M. Scott. 1997. Hydrogen peroxyde and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 100:241-254.
- Gardana, C., M. Scaglianti and P. Simonetti. 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217:1463-1470.
- Geuns, J. M. 2003. Stevioside. *Phytochemistry* 64:913-921.
- González, M., N. Mogollón, G. Alvarado, A. Giménez y T. Capote. 2012. Efecto del medio de cultivo *in vitro* y la fuente nitrogenada sobre el crecimiento del cucuy (*Agave cocui* Trelease). *Bioagro* 24:39-44.
- Gvasaliya, V. P., N. V. Kovalenko and M. C. Garguliya. 1990. Studies on the possibility of growing honey grass in Abkhazia conditions. *Subtropicheskie Kul Tury*5:149-156.
- Hearn, L. K. and P. P. Subedi. 2008. Determination levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis* 22:165-168.

- Huda N., A. Ahmed, C. Mandal, K. A. Alam, S. H. Reza and A. Wadud. 2007. *In vitro* morphogenic responses of different explants of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). International Journal of Agricultural Research 2: 1006-1013.
- Hsieh, M. H. and H. M. Goodman. 2006. Functional evidence for the involvement of Arabidopsis IspF Homolog in the nonmevalonate pathways of plastid isoprenoid biosynthesis. Planta 223:779-784.
- Jarma, A. 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): Nueva alternativa agroindustrial del Caribe Colombiano. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 2:109-120.
- Jarma, D. 2010. Adaptación de dos clones de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) a tres ambientes del Caribe Colombiano. Tesis de Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Colombia. 92p.
- Jarma O., A., H. Araméndiz T. y A. Cleves L. 2011. Estabilidad fenotípica y densidades de planta de genotipos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) en la región Caribe de Colombia. Acta Agronómica 60:165-175.
- Jeppensen, P. B., S. Gregersen, K. K. Alstrup and K. Hermansen. 2002. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo*: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. Phytomedicine 9:9-14.
- Kahlil, S. A., R. Zamir and N. Ahmad. 2014. Effect of different propagation techniques and Gamma irradiation on major steviol glycoside's content in *Stevia rebaudiana*. Journal of Animal & Plant Science 24: 1743-1751.

- Kennely, E. J. 2002. Sweet and non-tweet constituents of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. In: *Stevia, the genus Stevia: medical and plant industries profiles*. Vol. 19. Taylor and Francis, London, UK pp: 68-85.
- Kinghorn A. D. and D. D. Soejarto. 1985. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. *Economic and Medicinal Plant Research*.
- Kumar M., S. Alam, S. M. Quatadah, H. Debe and M. Nitin. 2014. *In vitro* morphogenesis of *Stevia rebaudiana*. A naturally occurring sweet plant. *International Journal of Advances Research* 3:971-978.
- Landázury, P. A. y J. O. Tigrero. 2009. *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Boletín Técnico, Edición Especial Escuela Politécnica del Ejército (ESPE) 1:1-7.
- Lemus-Moncada, R., A. Vega-Gálvez, L. Zura-Bravo, K. Ah-Hen. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of high-potency natural sweetener: a comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects 132: 1121-1132.
- Lester, T. 1999. *Stevia rebaudiana* (sweet honey leaf). The Australian New Crops Newsletter 1.
- Lim E. K., G. S. Higgins, Y. Li and D. J. Bowles. 2003. Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose: glucosyltransferase is maintained in planta. *Biochemical Journal* 373:987-992.
- López-Ordaz, A. G. A. Baca-Castillo y Y. L. Fernández-Pavía. 2011. Soluciones nutritivas para inducir cambios de concentración de N, P, K en plantas de mango. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2:867-883.
- Magaji N. W., J. K. Kumar, V. Singh, V. K. Kaul and P. S. Ahuja. 2005. Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calories sweetener. *Current Science* 88:801-804.

- Marin, M., L. A. Valdez-Aguilar, A. M. Castillo-González, J. Pineda-Pineda, J. J. Galván-Luna. 2010. Modeling growth and ion concentration of liliium in response to nitrogen: calcium mixture solutions. *Journal of Plant Nutrition* 34:12-26.
- Martínez- Villegas, Y. M., M. Andrade-Rodríguez, M. T. Colinas-León, O. G. Villegas-Torres, A. Castillo-Gutiérrez e I. Alia-Tejacal. 2015. Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista Fitotecnia Mexicana* 38:369-374.
- Mengel, K y E. A. Kirkby. 1987. *Principles of Plant Nutrition*. Ed. International Potash Institute. Switzerland p655.
- Midmore, D. J. and A. H. Rank. 2002. A new rural industry- *Stevia*- to replace imported chemical. *Rural Industries Research & Development Corporation* 2: 22-32.
- Monteiro, R. 1982. Estudos cromossômicos em *Stevia rebaudiana*. Série Multiaristae no Brasil. *Revista Brasileira Botany* 5:5-15.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum* 15: 473-495.
- Navarro, B. S. y G. G. Navarro. 2003. *Química Agrícola*. 2ª Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Núñez, E. 2010. *Stevia rebaudiana* Bertoni, un sustituto del azúcar. Tesis Maestría en Producción Vegetal.
- Orozco R., C. López, V. González y A. Carballo. 2000. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedades Atlantic y 1625 Frito Lay, crecidas *in vitro*. *Uniciencia* 17:31-34.

Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food and Drug Administration.

2010. Scientific opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. EFSA Journal 8: 1537.

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/grasnotices> (21 de julio de 2016).

Pirella, M and N. Mogollón. 1996. *In vitro* propagation of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Mara-7 from stem shoots of cv. Mara-7. Acta Horticulturae 452:47-52.

Rangappa K. and D. S. Aind. 2013. High frequency multiplication of shoots using axillary bus for production of elite line son *Stevia rebaudiana*. Advances in Bioscience and Biotechnology 4:781-784.

Razak, U. N. A. A., C. B. Ong T. S. Yu and L. K. Lau (2014) *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. Brazilian Archives of Biology and Technology 57:23-28.

Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1994. Fisiología Vegetal, Grupo Editorial Iberoamérica. México p71-94.

Saikar, P., M. K. Chandravanski, N. P. Shukla and N. N. 2009. Mass production of an economically important medicinal plant *Stevia rebaudiana* using *in vitro* techniques. Journal Medicinal Plant Research 3:266.270.

Sandoval C., G., L. Iracheta D., C. I. Cruz C., M. L. Adriano A., P. López G. y A. Sandoval E. 2013. Efecto de biofertilizantes sobre la tolerancia de banano a la desinfección e inducción de organogénesis. Revista Chapingo Serie Horticultura 19:183-196.

Suárez, I. E. y J. A. Salgado. 2008. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae Eopatorieae) a través de organogénesis. Temas Agrarios 13:40-48.

- Segura, C. M., M. E. Barbosa, B. A. Matus, A. D. Cabrera, O. M. Murgía, O.Y. Moguel y A. D. Betancur. 2014. Comparison of chemical and functional properties of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) varieties cultivated in Mexican Southeast. *American Journal of Plant Sciences* 5:286-293.
- Sikach, V. O. 1998. Effect of nutrient media on physiological peculiarities of *Stevia rebaudiana* Bertoni plants cultivated *in vitro*. *Fiziologiya Bikhimiya Kul'turnykh Rastenii* 30: 294-299.
- Singh, S. D. and G. P. Rao. 2005. *Stevia*: The herbal sugar of the 21st century. *Sugar Technology* 7: 17-24.
- Sivaram, L. and U. Mukundan. 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 39: 520-523.
- Shatnawi, M. A., R. A. Shibil, S. M. Abu-Romman, M. S. Al-Mazra'awi, Z. I. Al Ajlouni, W. A. Shatnawi and W. H. Odeth. 2011. Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 9: 213-220.
- Shin, K. S., H. N. Murthy, J. W. Heo, E. J. Hahn and K. Y. Paek. 2008. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 30:339-343.
- Soejarto, D. D. 2002. Ethnobotany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana* pp. 40-67 In: *Stevia: The genus Stevia*. Kinghorn A. D, 2002.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution pp. 633-650. In: *Proceedings of sixth International Congress on Soilless Culture*. Sassari, Italy.

- Taware, A. S., S. N. Harke, D. S. Mukundan, A. M. Chvan, S. D. Taware. 2010. Effect of different extracts of callus and plantlets of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) on seed germination of some agricultural crops. *African Journal of Biotechnology* 9:6675-6683.
- Urbina-Sánchez, E., E. J. Morales-Rosales, O. Franco-Mora, J. C. Reyes-Alemán y J. Mejía-Carranza. 2015. Presión osmótica de la solución nutritiva en la producción y calidad de liliom (*Lilium* sp.) 'Marlón'. *Acta Agrícola y Pecuaria* 1:64-69.
- Vaez, A. P. A., R. de Cássia, L. Figueiredo-Ribeiro and G. B. Kerbauy. 2004. Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *Psychomorphis pusilla*, an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 411-415.
- Utumi, M. M., P. H. Monnerat, P. R. G. Pereira, P. C. R. Fontes and V. D. Godinho. 1999. Macronutrient deficiencies in Stevia: visual symptoms and effects on growth, chemical composition, and stevioside production. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 34:1039-1043.
- Valencia, R. 2000. El libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Editorial Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador.
- Van Staden, J., Fenell, C, Taylor, N. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 55-62.
- Yadav, A. K., S. Sing, D. Dhyan and P. S. Ahuja. 2011. A review on the improvement of stevia [(*Stevia rebaudiana* Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science* 91:1-27.

Yasuda, T., Y. Fujii and T. Yamguchi. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiology* 3:595-597.