



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

**CULTIVO *IN VITRO* DE
Stevia rebaudiana BERTONI**

LIBERIA VAZQUEZ BAXCAJAY

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

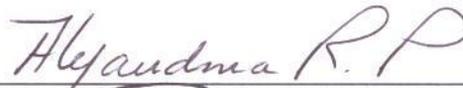
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO
JUNIO DEL 2012

La presente tesis titulada: **CULTIVO IN VITRO DE *Stevia rebaudiana* BERTONI** realizada por la alumna: **LIBERIA VAZQUEZ BAXCAJAY** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

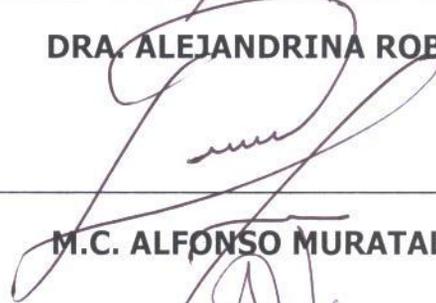
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

ASESOR



M.C. ALFONSO MURATALLA LÚA

ASESOR



DR. F. VÍCTOR CONDE MARTÍNEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2012

Agradecimientos

- Al Consejo de Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Por el apoyo económico, sin el cual no hubiera sido posible obtener el grado de Maestra en Ciencias.
- Al Colegio de Posgraduados Por las facilidades para mi estancia en esta institución.
- A mis Profesores Por los conocimientos y experiencias transmitidas en estos años de estudio.
- Dr. Arellano Ostoia Gregorio
Dr. Ramón Marcos Soto Hernández
Dra. Silva Rojas Hilda Victoria
Dr. Ayala Garay Oscar Javier
- A la Dra. Alejandrina Robledo Paz Le agradezco justo ahora y por siempre su tiempo, paciencia, comprensión, entusiasmo experiencia y amistad dedicada a mi formación profesional y personal, además de la realización exitosa en este trabajo.
- Al Dr. F. Víctor Conde Martínez Por la asesoría, sugerencias y aportaciones realizadas en el presente trabajo.
- Al M.C. Alfonso Muratalla Lúa Muchas gracias por su profesionalismo, calidad humana, sinceridad y por su gran disposición en la revisión en esta tesis.
- A la Señora Sílvia Antero Por su amistad y cariño durante mi estancia en la maestría y por su apoyo en el laboratorio de Biotecnología de Semillas.
- A mis Amigos y Compañeros del laboratorio

iii Muchas gracias!!!

Dedicatoria

A Dios
Por permitirme disfrutar la vida.

Porque gracias a él tengo la vida, la razón y el entusiasmo de salir adelante. Todo lo que hago es ofrecido a su infinita misericordia. Por permitirme estar en esta vida, por escuchar mis oraciones y darme el valor y la fortaleza que necesite para seguir adelante hasta alcanzar mis metas. Por darme una segunda oportunidad para valorar cada instante de la vida con sencillez, humildad y honestidad.

!!!Bendice mi vida, mi trabajo mi cruz y la de todos los que me rodean!!!

A la Santísima Virgen María;

Por su protección amorosa e intersección ante el Todopoderoso.

!!!Acompáñame siempre!!!

A mis padres :
Jerónimo Vázquez toquilla y Hortensia Inés
Baxcay Cerroblanco

Por su apoyo incondicional para buscar mis metas y desarrollo personal y profesional. Con su educación me inculcaron a ser Mujer de bien y salir adelante en base al trabajo y esfuerzo. Son mi base y modelo a seguir.

!!!Simplemente gracias!!!

A mis hermanos, hermanas, sobrinos y
sobrinas

Bulmaro, Sulpicio, Pablo, Rogelio, Irene, Edith, Carolina, Cristal, Diana Paola,
Héctor y Akari Jarumi.

A Víctor salinas Rutz
A todos mis compañeros y amigos
A Sonia Vázquez

Por ser especial para mí.
Por la riqueza de su amistad.

Resumen

Stevia es un género de plantas fanerógamas perteneciente a la familia de las asteráceas, tiene 407 especies; una de sus especies es *Stevia rebaudiana* Bertoni, nombrada así por Moisés de Santiago Bertoni. Para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* se aplicaron cinco tratamientos de desinfección y se obtuvo al usar Cloro® (1.8 % cloro activo), Ridomil y Fungimycin previo a la siembra *in vitro* y al agregar al medio Cefotaxima (500 mgL^{-1}) se obtuvo un porcentaje de contaminación de 50 % permitiendo una supervivencia de 47 %. En la inducción de callo se mostro que al combinar 1.5 mgL^{-1} 2,4-D/AIA la capacidad de formación de callo del explante de hoja es de 25 %. El tratamiento de cinetina (1.3 gL^{-1}) en el proceso micropropagación de *Stevia* mostro ser el mejor. En el proceso de aclimatación se obtuvo que a los 45 y 60 días la sobrevivencia fue de 83.64 y 81.82 %, observando que entre 45 a 60 días el incremento en altura fue de 0.3 cm, mientras que los 15 días de aclimatación fueron críticos obteniendo una altura promedio de 0.1 cm.

In vitro, micropropagacion, aclimatacion, *Stevia*

ABSTRACT

Stevia is a genus of flowering plants belonging to the family Asteraceae, has 407 species, is one of its species *Stevia rebaudiana* Bertoni, named Moises Santiago Bertoni. For the *in vitro* establishment of *Stevia rebaudiana* five treatments were applied, and disinfestation was obtained using Chlorine ® (1.8 % active chlorine), Ridomil and Fungimycin before planting *in vitro* and adding to the medium Cefotaxime (500 mgL⁻¹) was obtained a contamination percentage of 50 %, allowing a survival of 47 %. In callus induction was shown that by combining 1.5 mgL⁻¹ 2,4-D/AIA training capacity of leaf explant callus is 25 %. Treatment of kinetin (1.3 gL⁻¹) in the micropropagation process showed *Stevia* being the best. In the process of acclimatization was obtained that at 45 and 60 days survival was 83.64 and 81.82 %, noting that between 45 to 60 days the increase in height was 0.3 cm. whereas the 15 critical days of acclimatization were getting an average height of 0.1 cm.

In vitro, micropropagation, acclimatization, *Stevia*

Índice

AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 2	3
OBJETIVOS.....	3
2.1. <i>Objetivo general</i>	<i>3</i>
2.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>3</i>
CAPITULO 3	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1. <i>Descripción botánica de Stevia rebaudiana Bertoni.....</i>	<i>4</i>
3.2. <i>Importancia económica</i>	<i>5</i>
3.3. <i>Características químicas de los Steviósidos</i>	<i>6</i>
3.4. <i>Ruta de síntesis de steviósidos</i>	<i>7</i>

3.5.	<i>Síntesis de glucósidos de diterpeno</i>	7
3.6.	<i>Algunas consideraciones médicas</i>	9
3.7.	<i>Aspectos agronómicos</i>	10
	3.7.1. <i>Variedades</i>	10
	3.7.2. <i>Condiciones ideales de cultivo</i>	13
3.8.	<i>Métodos de propagación de Stevia</i>	15
	3.8.1. <i>Propagación sexual</i>	15
	3.8.2. <i>Propagación asexual</i>	16
3.9.	<i>Micropropagación en la producción de plantas</i>	16
	3.9.1. <i>Micropropagación por yemas axilares</i>	16
3.10.	<i>Fases de la micropropagación</i>	17
3.11.	<i>Medio de cultivo y sus componentes</i>	20
	3.11.1 <i>Carbohidratos</i>	20
	3.11.2 <i>Sales minerales</i>	21
	3.11.3 <i>Vitaminas</i>	21
3.12.	<i>Reguladores de crecimiento</i>	21
	3.12.1. <i>Auxinas</i>	22
	3.12.2. <i>Citocininas</i>	22
	3.12.3. <i>Agentes gelificante</i>	23
3.13.	<i>Cultivo in vitro de estevia</i>	23
	3.13.1. <i>Micropropagación</i>	24
	3.13.2. <i>Producción de callos y células en suspensión</i>	26

CAPÍTULO 4 29

MATERIALES Y MÉTODOS	29	
4.1. <i>Características del material vegetal</i>	29	
4.2. <i>Desinfestación del material vegetal</i>	29	
4.3. <i>Medios de cultivo</i>	31	
	4.3.1. <i>Inducción de callo</i>	31
	4.3.2. <i>Regeneración de brotes adventicios</i>	31
4.4. <i>Inducción y mantenimiento de callo</i>	32	
4.5. <i>Formación y desarrollo de brotes adventicios</i>	32	

4.6.	<i>Enraizamiento de brotes</i>	32
4.7.	<i>Aclimatación a condiciones de invernadero</i>	32
4.8.	<i>Diseño experimental</i>	33
4.9.	<i>Determinación cualitativa de Steviol, Steviósido y Rebaudiosido</i> <i>A por Cromatografía en capa fina.</i>	33
4.9.1.	<i>Material vegetal</i>	33
4.9.2.	<i>Obtención de extractos</i>	34
CAPÍTULO 5	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1.	<i>Establecimiento in vitro</i>	35
5.2.	<i>Inducción a Callo</i>	39
5.3.	<i>Regeneración in vitro de plantas de Stevia rebaudiana B.</i>	42
5.3.1	<i>Inducción de brotes adventicios</i>	42
5.4.	<i>Enraizamiento</i>	45
5.5.	<i>Aclimatación y establecimiento en el invernadero</i>	48
5.10.	<i>Análisis cualitativo de los steviósidos diterpenicos</i>	53
Capitulo 6	59
CONCLUSIONES	59
CAPITULO 7	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Índice de tablas

Cuadro 4.2.1. Tratamiento de desinfestación de hojas de Stevia para su establecimiento in vitro.	30
Cuadro 4.2.1. Desinfestación de segmentos nodales de Stevia.	31
Cuadro 5.1.1. Contaminación y sobrevivencia de los explantes de hoja de Stevia desinfestados mediante distintos tratamientos.	36
Cuadro 5.1.2. Porcentaje de contaminación y sobrevivencia de segmentos nodales de Stevia.	38
Cuadro 5.2.1. Porcentaje de formación de callo en explantes de hoja de <i>Stevia r.</i>	40
Cuadro 5.3.1. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de brotes adventicios de <i>Stevia rebaudiana B.</i>	43
Cuadro 5.5.1. Estadística descriptiva en la etapa de aclimatación de microplantas de Stevia.....	49
Cuadro 5.10.1. Caracterización de los estándares (marca SIGMA).	57
Cuadro 5.10.2. Comparación de Rf de cada muestra.....	57

Índice de figuras

Figura 3.1: Enzimas que intervienen en el alargamiento de la cadena terpénica en la ruta de síntesis del steviol: 1. GPP-sintasa; 2. FPP-sintasa; 3. GGPP-sintasa; 4. CPP-sintasa; 5. Kaureno sintetasa.	8
Figura 5.1. Respuesta a la formación de callo en (a) 2,4D/BA (1/1mg L ⁻¹), (b) 2,4D/AIA (1/1mg L ⁻¹) y (c) 2,4D/AIA (1.5/1.5mg L ⁻¹).	39
Figura 5.2. Formación de brotes adventicios en segmentos nodales de Stevia rebaudiana cultivados con cinetina (1.3 mg L ⁻¹).	43
Figura 5.3. Efecto de las citocininas y auxinas en la inducción de brotes de estevia, a) AIA/K: (0.5/8.0 mg L ⁻¹), b) K (1.3 mg L ⁻¹) y c) AIA/K (1/2 mg L ⁻¹).	44
Figura 5.4. Formación de raíces en brotes adventicios de S. rebaudiana. .	47
Figura 5.5. Aclimatación de plantas de S. rebaudiana regeneradas in vitro.	48
Figura 5.7. Aclimatación y establecimiento de las microplantas de S. rebaudiana en el invernadero.	51
Figura.5.8. Crecimiento promedio diario de las microplantas de S. rebaudiana en condiciones de invernadero.	52
Figura 5.9. Microplantas de S. rebaudiana creciendo en el invernadero bajo malla sombra a los 50 días del trasplante.	52

Capítulo 1

Introducción

La industria de los edulcorantes, naturales y artificiales mueve cientos de millones de dólares ya sea como aditivos en alimentos o como suplementos dietéticos, en este orden, la especie estevia, como familiarmente la llamamos (*Stevia rebaudiana*), constituye una prometedora alternativa, en el rango de edulcorantes naturales, más aun cuando los endulzantes sintéticos están seriamente cuestionados por los efectos de su consumo a corto y largo plazo (Marín, 2004).

Stevia rebaudiana Bertonni produce una serie de glucósidos diterpenoides o steviósidos, los cuales tienen un poder endulzante considerablemente mayor que la glucosa. Dichos compuestos no son tóxicos, ni mutagénicos y son bajos en calorías (Soejarto y Kinghorn, 1982; Matsui et al., 1996).

En los EEUU, la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA) aprobó en 2008, el uso de los glucósidos diterpenoides como edulcorantes naturales no calóricos en alimentos y bebidas (Jiménez *et al.*, 2010), dando el cultivo una enorme expectativa, no solamente en lo que se refiere al mercado de los edulcorantes, sino también en la agricultura, ganadería, farmacéutica y cosmética.

Debido a las propiedades endulzantes de la estevia, su demanda ha ido en aumento, lo que ha ocasionado que los países busquen nuevas alternativas de producción.

Estevia se propaga principalmente por medio de semillas, que resultan de la polinización cruzada; esta forma de reproducción implica recombinación genética y por lo tanto alta heterogeneidad en las semillas resultantes que se reflejan tanto en su crecimiento como en la producción de steviósidos (Ferreira y Handro, 1988). Se ha recurrido a la reproducción asexual mediante estacas para tratar de obtener materiales homogéneos, lo que no ha sido muy satisfactorio con respecto a la

uniformidad del material obtenido, por lo que se ha tenido que buscar otras opciones propagativas.

Una alternativa es el cultivo de tejidos (micropropagación) que permite obtener plantas en forma masiva con características seleccionadas y uniformes en cuanto a su crecimiento y la producción de steviósidos. Asimismo, mediante el cultivo de tejidos es posible producir steviósidos cultivando células en un medio nutritivo (cultivo de células en suspensión) para posteriormente, extraerlos y purificarlos sin requerir de la planta completa.

Por lo antes expuesto los objetivos del siguiente trabajo son:

Capítulo 2

Objetivos

2.1. Objetivo general

Establecer el cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni para la formación de callo y su aclimatación en el invernadero.

2.2. Objetivos específicos

- Inducir la formación de callo a partir de tejidos de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.
- Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* para su micropropagación.
- Determinar la presencia de steviósidos en planta madre, microplantas aclimatadas en el invernadero, plantas *in vitro* y callo mediante cromatografía en capa fina.

Capítulo 3

Revisión de Literatura

3.1. Descripción botánica de *Stevia rebaudiana*

Bertoni

Stevia o estevia es un género de plantas fanerógamas perteneciente a la familia de las asteráceas, tiene 407 especies; una de sus especies es *Stevia rebaudiana* Bertoni, nombrada así por Moisés de Santiago Bertoni, conocida comúnmente como El Ka'á He'é (en guaraní, hierba dulce) "dulce hoja", o simplemente, "Estevia". La planta es herbácea y perenne, con hojas simples, inflorescencia capitular y frutos denominados "aquenios" crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y Paraguay (Marín, 2004).

Estevia es una planta, con tallo anual ramificado formando múltiples brotes, subleñosa, puede alcanzar hasta 80 cm de altura. La raíz es fibrosa, filiforme y perenne, formando abundante cepa que apenas ramifica y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie; es el único órgano de la planta que no contiene steviósidos (De Vargas, 1980), en plantas se propagan asexualmente por pedazos de tallos en arena gruesa, las hojas son pequeñas, lanceoladas, muy dulces, festoneadas, opuestas en verticilos alternados, sésiles. Las flores se hallan dispuestas en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas, de lóbulos blancos.

El fruto es un aquenio delgado y plumoso; el tallo puede morir todos los años ya sea por cuestiones de ciclo reproductivo, temperatura (heladas) u otras razones ambientales, quedando un tallo subterráneo con un sistema de raíz que luego forma cepas, emergiendo nuevos brotes en la base del tallo anterior. La hoja es el órgano con mayor contenido de steviósidos y la raíz es el único órgano que no contiene steviósidos.

La polinización es auxiliada por insectos, uno de los cuales es la abeja melífera, dándose una fuerte polinización cruzada, por lo tanto, sus semillas poseen gran variedad genética. Esto es, si se procediera a hacer un cultivo comercial con plantas obtenidas a partir de semillas, se obtendría un cultivo muy variable y genotípicamente no conveniente (Jarma, 2005).

3.2. Importancia económica

El rápido desarrollo de la industria de los edulcorantes y la búsqueda de alternativas menos riesgosas que los edulcorantes artificiales; ha permitido que el cultivo de *S. rebaudiana* prospere en países como Brasil, China, Japón, Corea, Tailandia e Israel. China actualmente cultiva el 90 % de la producción global de esta planta.

El consumo internacional se concentra en la Unión Europea, EE.UU., China, Australia y especialmente Japón, a pesar de tener fábricas para la extracción de los steviósidos, es insuficiente para satisfacer su mercado interno (se estima que el consumo anual de steviósidos en Japón es de 50 toneladas al año con un valor aproximado de \$240 millones de dólares americanos). Brasil, cuenta con la mayor planta de tratamiento de hoja seca para extracción del steviosido. Actualmente, se producen 3000 toneladas de cristal de steviosidos en el mundo el cual se consume en su totalidad. Rusia y varios países Latinoamericanos han incorporado este nuevo edulcorante a su dieta (Eafit, 2004).

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

altamente conservadora y un humano nunca llegaría a consumir más de lo permisible en un día (Castillo, 2011 y Xili et al., 1992).

En el mercado, la estevia se puede conseguir en diferentes presentaciones de productos, como una simple infusión de hojas secas, como líquido denso de color oscuro el resultado de hervir las hojas en agua, otro tipo de líquido obtenido a través del macerado de las hojas en agua destilada o en una mezcla de licor alcohólico y agua (consumido de manera popular en algunas regiones del Paraguay). También se encuentra el steviosido en polvo, en líquido, en cristales solubles, pasando por extractos, lociones cosméticas y como aditivo en diversidad de alimentos, y cada una de estas tiene diferentes propiedades o aplicaciones en diferentes industrias (Marín, 2004).

3.3. Características químicas de los Steviósidos

El químico paraguayo Ovidio Rebaudi realizó los primeros estudios en 1905 sobre la composición química de la planta e identificó sus compuestos dulces. Los steviósidos se caracterizan por ser edulcorantes naturales no nitrogenados compuestos solamente de Carbono, Hidrógeno y Oxígeno, siendo su fórmula química $C_{38}H_{60}O_{18}$, a diferencia de la sacarosa cuya composición química es $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Ministerio de Agricultura y Ganadería de Paraguay, 1994; Machacuay, 2007).

Los compuestos edulcorantes son diterpenoides formados por nueve glucósidos bajos en calorías, cuyo contenido promedio en las hojas son los siguientes; Steviosido (10 %); Rebaudiosidos A, C, D, E, F (3 a 4 %); Dulcósidos A, B; Isosteviol, Steviol-glicósido (en proporciones menores al 1 %). Actualmente, se denomina steviósidos totales al conjunto de todos estos componentes (Molinas, 1989). Entre estos componentes, el Rebaudiosido A, es el que presenta mayor grado de dulzor siendo aproximadamente 400 veces más dulce que la sacarosa.

Estas sustancias químicas en conjunto representan aproximadamente 5–10 % del peso de las hojas secas (Soejarto et al., 1982; Hanson y De Oliveira, 1993).

Los steviósidos poseen estabilidad térmica a valores de pH entre 2 y 8 a una temperatura entre 5 y 90°C sin presentar alteraciones en las moléculas del steviol, lo que indica que presenta estabilidad durante la cocción y el almacenamiento (Pezzuto et al., 1985). Esta propiedad hace más apta a la estevia para ser utilizada en productos horneados, debido a que muchos de los otros edulcorantes se descomponen con el calor.

3.4. Ruta de síntesis de steviósidos

Los componentes edulcorantes en su mayoría concentrados en las hojas son glucósidos de diterpeno sintetizados, al menos en los estados iniciales de la ruta del ácido giberélico a partir del mevalonato (Hsieh y Goodman, 2005, Guevara et ál., 2005, Kasahara et al., 2002), con la diferencia de que en la Stevia el kaureno (precursor de dichas hormonas) es convertido a steviol (ent-13-hydroxykaur-16-en-19-oico) en el retículo endoplásmico.

3.5. Síntesis de glucósidos de diterpeno

Estos diterpenos se sintetizan a partir de unidades de acetato del acetyl coenzima A en la ruta del ácido mevalónico (MVA) (Guevara et al., 2005). Este último ingresa al cloroplasto y se convierte en pirofosfato de isopentenilo (IPP) una molécula de cinco carbonos denominada regularmente como el isopreno activo, ya que comienza el alargamiento de la cadena terpénica, para luego formarse en pirofosfato de geranylgeranilo (un compuesto de 20 carbonos, que sirve como donador de todos los átomos de carbono de las giberelinas), más tarde se convierte en pirofosfato de copalillo (con dos sistemas de anillos) y por último en kaureno, un compuesto que tienen 4 sistemas de anillos (Figura 3.1).

El kaureno es el compuesto donde divergen los glucósidos de steviol y las giberelinas; en estevia, el kaureno es convertido a steviol (espinas dorsal de los glucósidos de diterpeno) en el retículo endoplásmico; dicho steviol puede ser glucosilado o rhamnosilado en el aparato de Golgi, para formar los principales edulcorantes como el steviosido (triglicosilado steviol) y Rebaudiosido A y C (tetraglicosilado steviol) Dulcósido A, los cuales van finalmente a las vacuolas (Brandle y Telmer, 2007).

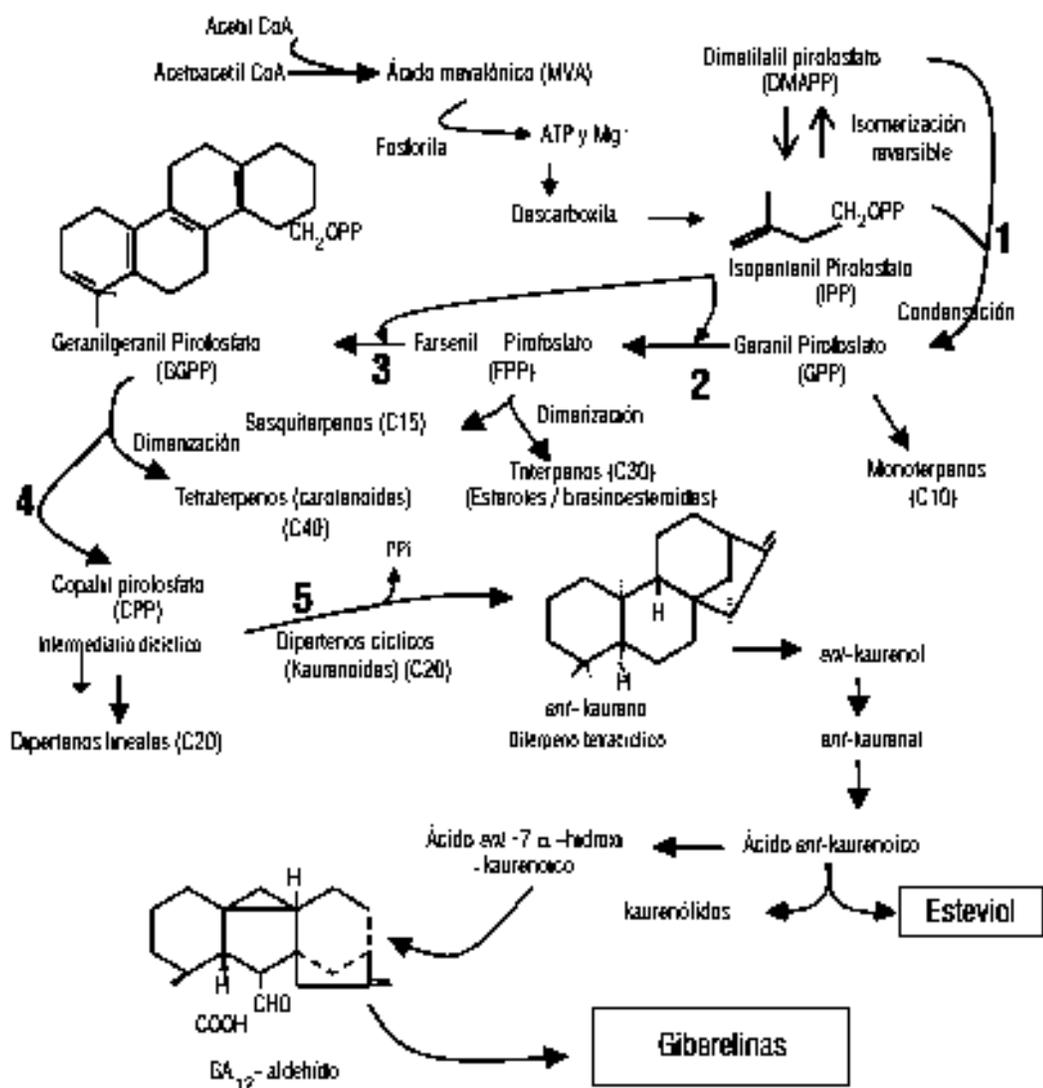


Figura 3.1: Enzimas que intervienen en el alargamiento de la cadena terpénica en la ruta de síntesis del steviol: 1. GPP-sintasa; 2. FPP-sintasa; 3. GGPP-sintasa; 4. CPP-sintasa; 5. Kaureno sintetasa.

Las enzimas que catalizan el alargamiento de la cadena terpénica son las prenil trans-ferasas, de las cuales se han aislado, hasta ahora, la geranil pirofosfato sintasa, enzima identificada en plastos que requieren Mg⁺ o Mn⁺ como cofactores (Suga y Endo, 1991; Kim et al., 1996); la farnesil pirofosfato sintasa, que requiere Mg⁺ como cofactor, se localiza en el citoplasma y cataliza la formación de farnesil pirofosfato (FPP) en dos etapas; por último, la geranil geranil pirofosfato sintasa, que requiere Mn⁺ para su máxima actividad, se localiza en plastos y forma el geranil geranil pirofosfato (GGPP) en tres etapas.

Brandle *et al.*, (2002) clonaron y secuenciaron el gen de estevia que codifica la enzima copalil pirofosfato sintasa, responsable de la conversión de GGPP a CPP, y afirman que la hidroxilación del ácido ent-kaurenóico en la posición C13 es el punto de divergencia para la síntesis del steviol y las giberelinas. Esta hidroxilación requiere de NADPH y oxígeno molecular proveniente del estroma, y es catalizada por la enzima ácido ent-kaurenóico 13-hidroxilasa (Jarma et al., 2010).

Richman *et al.*, (1999), concluyeron que los profundos cambios en la regulación de la expresión de la sintasa de copalilfosfato y sintasa kaurenóica en las hojas de estevia han permitido la síntesis y la acumulación de altas concentraciones de edulcorantes. El hecho de que los niveles de expresión son más altos en tejidos maduros, en comparación con los tejidos jóvenes de rápido crecimiento plantea la posibilidad de la separación temporal y espacial, la prevención de una superposición de steviol y la biosíntesis de GA. Algunos investigadores afirman que los steviósidos ayudan a rechazar ciertos insectos y otros especulan que es un mecanismo detallado para controlar los niveles de ácido giberélico (Brandle, 2000).

3.6. Algunas consideraciones médicas

Algunos estudios, han demostrado cualidades de la estevia para su utilización en personas con problemas de diabetes, al mostrar que las curvas de tolerancia a la sobrecarga de glucosa postprandial (prueba en la cual se analiza el nivel de glucosa 2

horas después de la ingestión de alimentos) en pacientes diabéticos obesos fue mejor en aquellos que habían sido tratados previamente con 130-140 mg de extracto de estevia, que en aquellos que habían recibido 280-300 mg del hipoglucemiante de síntesis glibenclamida. El porcentaje de descenso fue en promedio del 35 % respecto a los niveles basales al cabo de 6-8 horas. El efecto hipoglucemiante como el incremento en la tolerancia a la glucosa también se evidenció en las personas euglucémicas, durante y después de la toma de un extracto acuoso elaborado con 5 g de hojas de estevia (Curi et al., 1986).

Estudios hechos por el Departamento de Endocrinología y Metabolismo del Aarhus University Hospital de Dinamarca, revelaron que steviósido actúa estimulando en forma directa las células beta del páncreas, generando así una secreción considerable de insulina, reduciendo los niveles de glucosa en sangre hasta un 35 %. El resultado de estas pruebas médicas indican que la estevia podría tener un papel potencial antihiper glucémico en personas con diabetes tipo 2 (no insulina dependientes) (Jeppesen et al., 2000).

La estevia es un endulzante que se ha utilizado en Japón desde hace más de 20 años. Estudios hechos por la división de medicina Cardiovascular del hospital Taipei (Taiwán), permitieron observar el efecto hipotensor del steviosido luego de tres meses de tratar un grupo de pacientes con este compuesto.

3.7. Aspectos agronómicos

3.7.1. Variedades

El género *Stevia*, perteneciente a la tribu *Eupatorieae*, familia *Asteraceae*, se extiende desde el suroeste de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, a través de México, América Central, los Andes y las Tierras Altas Brasileñas, en ecosistemas localizados entre 1000 y 2000 m sobre el nivel del mar. Se estima que el número de especies dentro del género es de 300, de las cuales más de 80 se

encuentran en Norte América, y de éstas, 70 especies son nativas de México (Grashoff, 1972).

En Ecuador se han encontrado *S. anisostemma* y *S. bertholdii*, en Chimborazo e Imbabura la *S. crenata*, en Loja la *S. bertholdii*, en Pichincha *S. anisostemma*, *S. crenata* y *S. dianthoidea* y en Tungurahua la especie *S. tunguraguensis* (Valencia et al., 2000). Existen otras especies como: *Stevia eupatoria*, *S. obata*, *S. plummerae*, *S. salicifolia*, *S. serrata* (Brandle et al., 2000, Ramesh et al., 2006).

En el Estado de Hidalgo, las condiciones climáticas y fisiográficas tan diversas de la Sierra de Pachuca, propician la existencia de un considerable número de hábitats, favoreciendo el establecimiento de distintas comunidades vegetales, entre las cuales se encuentran 21 especies de *Stevia*: *S. eupatoria*, *S. hirsuta* DC. var *hirsuta*, *S. iltisiana*, *S. jorul lensis*, *S. latifolia*, *S. lucida*, *S. micrantha*, *S. aff. monardifolia*, *S. monardifolia*, *S. nepetifolia*, *S. ovata*, *S. ovata* var. *ovata*, *S. pilosa*, *S. porphyrea*, *S. purpusii*, *S. rhombifolia* var. *typica*, *S. saücifolia*, *S. salicifolia* var. *salicifolia*, *S. serrata*, *S. tephra* y *S. tomentosa* (Manitto, 1981). De las 21 especies encontradas en el Estado de Hidalgo, únicamente se han descrito en estudios fitoquímicos 10 de ellas (Hernández, 1998; Álvarez, 2005).

Debido a que el género *Stevia* es uno de los más grandes y reconocidos de la tribu *Eupatorieae*, este taxón, morfológicamente tiene una amplia diversidad en su composición química. De los estudios fitoquímicos realizados en aproximadamente 70 especies, se han encontrado metabolitos tales como aceites esenciales y otros constituyentes volátiles como borneol, cineol, pulegona, geraniol, acetato de linalol, chamazuleno, ahumuleno, cariofileno, etc. Derivados de la acetofenona, benzofurano y cromeno. Como ejemplos de estos compuestos se encuentran: p-hidroxiacetofenona, un derivado del benzofurano y el derivado del cromeno (Alvarez, 2005).

Representantes de los tetracíclicos característicos de este tipo de diterpenos, son los derivados del ent-kaureno, los cuales son glucósidos dulces que se emplean como sustitutos del azúcar debido a su alto poder edulcorante y bajo contenido calórico y *Stevia rebaudiana* Bertoni es la única especie con principios edulcorantes en las hojas (Grashoff, 1972).

La *Stevia pilosa* Lag., se utiliza como planta ornamental en el tradicional día de muertos en el Estado de Hidalgo, tal vez por su llamativa flor morada, de esta planta se encontró en un estudio químico sobre la parte aérea, de donde se aisló una sesquiterpenlactona conocida como leukodina. A partir del extracto hexánico de las raíces de *S. tomentosa*, se aislaron y caracterizaron los sesquiterpenos, así como los triterpenos: acetato de dammaranilo, 3 γ -friedelanol, γ -sitosterol y estigmasterol (Alvarez, 2005).

A pesar de la amplia capacidad de adaptación de *S. rebaudiana*, se ha reportado que la cantidad glucósidos que constituyen la hoja, especialmente el steviósido y el Rebaudiósido A, los dos principales glucósidos; dependen en gran medida del genotipo, las condiciones ambientales (Gardana et al., 2010), la nutrición (Nepovim et al., 1998, Geuns, 2003, Das et al., 2007) y el riego (Fronz y Folegatti, 2003) entre otros. Este último puede llegar a aumentar los rendimientos de hoja seca por hectárea de 2000 a 3000 kg y el contenido de glucósidos a 15 a 20 % (Barathi, 2002). La *Stevia* Rebaudiana tiene una adaptabilidad asombrosa a diversas condiciones de clima, no obstante, el clima puede ser una limitante para la producción de cristales de steviósido (Grashoff, 1972).

Las variables ambientales, principalmente la luz, tienen un efecto directo y positivo sobre la síntesis del isopentenil pirofosfato IPP, la cual interviene en la ruta de síntesis de las giberelinas y de los glucósidos de steviol (Guenther et al., 1994). De esta forma altos niveles de luz (intensidad) favorecen esta ruta y por consiguiente la producción de glucósidos totales (Jarma, 2010). Por ello, es posible encontrar diferencias marcadas en la concentración de steviósidos y Rebaudiósidos en las

plantas crecidas en las distintas zonas geográficas, siendo la "*Stevia peruana*", la de mejor calidad y la mayor rentabilidad con hasta 4 cosechas anuales.

3.7.2. Condiciones ideales de cultivo

La región de Paraguay, crece naturalmente la estevia en clima subtropical, semihúmeda, con precipitaciones de 1400 a 1800 mm, que se distribuyen regularmente durante todo el año y según Sakaguchi (1982), la temperatura más apropiada para *Stevia* es de 15 a 30 °C con un límite inferior de -3 °C. La planta se desarrolla mejor donde la intensidad de la luz es alta, riesgos mínimos de heladas y sin períodos de largas sequías, en zonas con más de 800 mm, puede alcanzarse un rendimiento de 2000 kg ha⁻¹. Las heladas de baja intensidad y duración corta son toleradas, aunque disminuyen el rendimiento hasta un 25 % (Machacuay, 2007).

Según Brandle (2002), la floración en estevia es fotoperíodo-dependiente es mayor al reducirse la duración del día; sin embargo las respuestas de la floración y del contenido de steviósidos a la longitud del día parecen ser variables; algunos genotipos son de día corto en forma obligada, aunque a su vez, algunas líneas parecen ser insensibles al fotoperíodo. Sumida (1980) indicó que genotipos de floración temprana, producto del efecto de días cortos, tienen un contenido de steviósido superior, pero menor rendimiento de biomasa.

En ese mismo sentido, Brandle y Rosa (1992), reportaron que la alta relación hoja/tallo fue una función del genotipo cuando las plantas se sometieron a días largos. Por su parte, Ramesh et al., (2006) afirmaron que el crecimiento vegetativo, área foliar, peso seco de hojas y rendimiento de glucósidos variaron de acuerdo a la duración del día, y que estos parámetros fueron mayores en días largos que en días cortos, principalmente la concentración de steviósidos aumentó en un 50 %. Así mismo, se ha reportado que el crecimiento vegetativo de estevia se reduce cuando las temperaturas están por debajo de 20 °C y cuando la longitud del día es menor a 12 horas (Metivier y Viana, 1979). Los mismos autores reportaron que al aumentar la

longitud del día a 16 horas y la intensidad de la misma, se incrementaron el crecimiento vegetativo así como los niveles de steviósidos.

En una evaluación de comportamiento de dos variedades de *Stevia rebaudiana*, se sometieron las plantas a 100 %, 62 %, 57 % y 20 % de radiación incidente y se encontró que los rendimientos de masa seca de la especie, responden positiva y proporcionalmente al aumento de la radiación (Rengifo et al., 2003). La estevia es una especie que requiere días largos y alta intensidad solar (Landázuri y Tigreiro, 2009). Los fotoperiodos largos aumentan la longitud de los entrenudos, área foliar, peso seco y aceleran la aparición de hojas. La materia seca se reduce a la mitad con fotoperiodos de días cortos, en tanto los azúcares, proteínas y steviósidos aumentan tanto en valores absolutos como relativos en días largos (Sagacuchi, 1982).

Durante el invierno la parte aérea de la planta se seca, rebrotando desde la base en primavera. La planta resiste la humedad pero no la sequía, y esto puede explicarse por la morfología de su sistema radicular; se desarrolla mejor donde la estación de crecimiento es larga, cuando la intensidad de luz es alta, con temperaturas tibias, riesgos mínimos de heladas después la brotación y sin períodos largos de sequía. La temperatura óptima para la germinación de la semilla es de 20 °C.

Respecto a los suelos, son óptimos aquellos con pH 6.5–7, de baja o nula salinidad, con buen contenido de materia orgánica, de textura franco arenosa a franco y con buena permeabilidad y drenaje (Vergara et al., 2003). Exige una muy buena preparación del terreno, debido a que su sistema radicular es moderadamente superficial. La planta se mantiene varios años en el mismo sitio y además es buena competidora con malezas. Asimismo, existen estudios enfocados al reconocimiento de enfermedades limitantes en el cultivo y causales de bajos rendimientos, las cuales son causadas por: *Sclerotium*, *Fusarium*, *Choanephora*, *Curvularia* y *Corynespora* (Jarma, 2008).

3.8. Métodos de propagación de Stevia

3.8.1. Propagación sexual

La flor de la estevia es hermafrodita, pequeña y blanquecina, en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas (Shock, 1982). La polinización es entomófila (Polinización cuyos agentes son los insectos), autoincompatible (tiene barreras genéticas y fisiológicas que impiden la germinación del propio polen o el desarrollo del tubo polínico), protandria (fenómeno reproductivo de las plantas en las cuales ocurre la maduración de los gametos masculinos antes que los gametos femeninos); de tipo esporofítico o con polinización cruzada entre dos variedades o biotipos de distinta época de floración (Monteiro, 1982).

El fruto es un aquenio que es diseminado por el viento, se clasifica en: claro estéril, oscuro fértil y oscuro estéril (Gattoni, 1945). Una planta de Stevia tarda más de un mes en producir todas sus flores. En Paraguay florece en Octubre, Diciembre y Marzo pero se clasifica como una planta de día corto, situando el fotoperiodo crítico en 12-13 horas según el ecotipo.

La recolección de la semilla es lenta y muy difícil, debido a que la floración no es uniforme, lo que afecta a la maduración de la semilla; además, el porcentaje de germinación es bajo entre el 10 y 38 % (Felippe et al., 1971, De Vargas 1980 y Jordán, 1983).

La reproducción sexual de Stevia, presenta ciertas desventajas que pueden afectar de forma negativa la eficiencia del cultivo, así como causar alta heterogeneidad de las poblaciones resultantes, baja eficiencia de germinación debido al alto porcentaje de semillas estériles y la ineficiencia en la recolección de la semilla por la desuniformidad en la floración y la maduración de la misma. Además, la variabilidad genética y fenotípica de la *Stevia*, también podría afectar el contenido de glicósidos diterpenicos (Tamura et al., 1984; Molinas, 1989; Ferreira y Handro, 1988).

3.8.2. Propagación asexual

Debido a las desventajas que presenta la propagación sexual, se ha propiciado el uso de la reproducción asexual, que implica el empleo de partes vegetativas de la planta original (Hartmann y Kester, 1998). La propagación asexual puede llevarse a cabo por hijuelos, estacas, esquejes, injertos y por cultivo de tejidos (Jordán, 1983). Para la siembra de cultivos comerciales, la cual no está exenta de problemas debido a las bajas tasas de multiplicación por estacas, lo que ha obligado a la utilización de técnicas de cultivo de tejidos para hacer más eficiente el proceso de multiplicación ya que entre otras cosas permite la multiplicación masiva de plantas con características uniformes (micropropagación) (Taiariol, 1995; Cassacia y Alvarez, 2006; Suárez et al., 2008).

3.9. Micropropagación en la producción de plantas

Una de las aplicaciones del cultivo de tejidos es la micropropagación, que consiste en regenerar plantas a partir del cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos. La micropropagación se ha aplicado con éxito en especies hortícolas, ornamentales y especies leñosas (Orozco, 2006 y Levitus, 2010).

Entre las ventajas que la micropropagación ofrece están, el incremento acelerado del número de plantas derivadas de un genotipo seleccionado, la reducción del tiempo de multiplicación, la posibilidad de obtener grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeados, mayor control sobre la sanidad del material que se propaga, facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones (Orozco, 2006, Levitus, 2010).

3.9.1. Micropropagación por yemas axilares

La micropropagación de una especie puede ser posible a partir de células meristemáticas preexistente como los meristemos apicales o yemas laterales que se

encuentran en las axilas de las hojas, a partir de estructuras con función meristemática obtenidas a partir de células especializadas. La micropropagación mediante yemas axilares consiste en cultivar en un medio nutritivo un segmento nodal que lleva una yema a partir de la cual se desarrolla un vástago, mientras que la micropropagación de *novo* implica que las células especializadas sufran un proceso de desdiferenciación, inducción y rediferenciación previo a la formación de las plantas (morfogénesis) (Pierik, 1990).

La producción de plantas por medio de la proliferación de brotes axilares, ha demostrado ser un método confiable y aplicable en un gran número de especies (George, 1993). El cultivo de yemas axilares es una manera sencilla de obtener nuevos brotes, los cuales pueden enraizarse y producir plantas.

3.10. Fases de la micropropagación

La propagación *in vitro* consta de cinco etapas: etapa 0 o inicial, etapa I establecimiento, etapa II (multiplicación de brotes), etapa III o enraizamiento y la etapa IV de aclimatación o transferencia al ambiente (Krikorian, 1991).

Etapa inicial (Selección de la planta madre)

George (1993) expone que la planta donante debe ser típica de la variedad o de la especie y estar *in vitro* y responder apropiadamente. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de (célula, órgano o tejido) a establecer en condiciones *in vitro*.

Los materiales (explantes) que han mostrado tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, como yemas axilares o adventicias, embriones, semillas o plántulas, y tejidos meristemáticos como el cambium de las plantas leñosas.

Etapa 1 (Establecimiento del cultivo aséptico)

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

La desinfestación requiere el empleo de sustancias químicas, que son tóxicas para los microorganismos pero relativamente inocuas para el material vegetal, tales como Hipoclorito de Sodio y de Calcio, además se emplean algunos alcoholes (Etílico, Metílico o Isopropílico) en diferentes concentraciones, la efectividad de estas sustancias es esencialmente una respuesta tiempo-concentración, en el cual la efectividad para desinfectar aumenta con ambos factores, pero también aumenta la capacidad para dañar el tejido, en consecuencia se debe de buscar un equilibrio de acuerdo al explante de que se trate (Hartmann y Kester, 1987). Otra sustancia química es el Cloruro de Mercurio (HgCl_2) empleando en bajas dosis y por corto tiempo; sin embargo, su uso es poco recomendable debido a su alta toxicidad (Dodds y Roberts, 1985).

Etapa 2 (Multiplicación)

Esta etapa generalmente comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. La primera implica el empleo de reguladores de crecimiento, para favorecer la desdiferenciación celular. La segunda fase, requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación (Dodds y Roberts, 1985).

Etapa 3 (Enraizamiento)

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

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

Etapa 4 (Aclimatación)

Incluye la transferencia de las plántulas del medio aséptico de cultivo al ambiente de un invernadero. Al principio de esta etapa las plántulas pueden estar enraizadas o no. En cualquiera de los casos, para que puedan sobrevivir deben de pasar por la etapa de aclimatación, en la que deben de volverse autótrofas, desarrollar las raíces, brotes funcionales y aumentar su resistencia a la desecación y al ataque de organismos patógenos. Para ello, es importante considerar ciertas condiciones como el mantenimiento elevado de humedad relativa para evitar la deshidratación, y la protección contra diversos organismos patógenos, por considerar algunas (Hartmann y Kester, 1987). Sin embargo, el estrés asociado a la evapotranspiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, es conveniente contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento adecuadas para brindar temperatura y humedad relativa moderadas, que permitan lograr la adaptación de las

plantas en forma progresiva. Bajo condiciones *ex vitro*, se utilizan diferentes sustratos, mezclas de tierra y arena y/o abonos, los cuales es conveniente que estén debidamente esterilizados.

3.11. Medio de cultivo y sus componentes

El medio de cultivo tiene dos funciones principales, la primera es proporcionar los nutrientes básicos para el crecimiento continuando de los explantes aislados y los propágulos subsiguientes y la segunda, es dirigir el crecimiento y desarrollo mediante el control hormonal (Hartmann y Kester, 1987). Para Hurtado y Merino (1987), el éxito del cultivo de tejidos vegetales depende del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc.

Los requerimientos nutritivos para el crecimiento *in vitro* óptimo varía con la especie, con el explante que se esté cultivando y la respuesta que se desea obtener. Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones para los medios de cultivo. La fórmula propuesta por Murashige y Skoog en 1962, ha sido aceptada en forma general ya que ha permitido la supervivencia y crecimiento de la mayoría de los tejidos empleados (Martínez, 1997).

3.11.1 Carbohidratos

Las células en cultivo *in vitro* generalmente no son fotosintéticamente activas por lo que requieren una fuente de carbono. Comúnmente se utiliza sacarosa o glucosa del 2 al 5 % (peso/volumen). Niveles menores se emplean en cultivo de protoplastos y mayores en cultivo de embriones y anteras. Los azúcares pueden sufrir caramelización si son esterilizados por tiempo excesivo, pueden ser degradados y formar compuestos de color café, y el alto peso molecular que inhiben el crecimiento celular (Dimassi y Bosabalidis, 1997).

3.11.2 Sales minerales

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

3.11.3 Vitaminas

Las vitaminas tienen funciones catalíticas en reacciones enzimáticas y son necesarias en el metabolismo, son comúnmente las más empleadas y corresponden al grupo B, por ejemplo: Tiamina (B1), Riboflamina (B2), Piridoxina (B6), Acido Pantotético (B12) y Ácido Fólico (Gamborg et al., 1976).

3.12. Reguladores de crecimiento

Las hormonas vegetales son compuestos que son sintetizados por las plantas en concentraciones micromolares o menores, las cuales provocan respuestas fisiológicas específicas ya sea en forma local, o bien son traslocadas a otras regiones de la planta para modificar su crecimiento y desarrollo. Las hormonas median la comunicación intercelular en las plantas, para ello las células poseen receptores, que son proteínas específicas. El complejo hormona-receptor es la forma activa de una hormona.

Los reguladores de crecimiento son compuestos químicos capaces de intervenir en el metabolismo vegetal, actuando en pequeñas concentraciones, activando o reprimiendo algún proceso, pueden ser naturales o sintéticos. Barba (1988), los define como compuestos orgánicos que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican los procesos fisiológicos en las plantas. Se reconoce que la mayor parte de la actividad fisiológica de las plantas está influenciada por los reguladores de crecimiento (Devlin, 1983) los cuales son sustancias mensajeras activas, la mayoría de las veces en muy pequeñas cantidades.

Existen diversos grupos de reguladores de crecimiento entre los que se encuentran: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, oligosacáridos, turgorinas, triacotanol, jasmonatos, poliaminas, ácido salicílico y brassino esteroides (Salisbury y Ross, 1992, Pierik (1987), George, 1993). Las auxinas y citocininas, son los más importantes reguladores de crecimiento utilizados en la micropropagación de plantas.

3.12.1. Auxinas

El nombre de auxina proviene del griego *auxein*, que significa crecer, se sabe que las auxinas están universalmente presentes en las plantas superiores. De forma natural, las auxinas se producen en los ápices del tallo. El movimiento de las auxinas desde su lugar de síntesis es principalmente basipétalo (hacia la raíz). Son muchos de los efectos que provocan las auxinas, entre los que se encuentran el alargamiento y la división celular, la formación de brotes, raíces, callo, embriones somáticos, abscisión, dominancia apical, etc.

Se ha comprobado que las auxinas actúan de modo diverso en el crecimiento por elongación celular, incrementando el contenido citoplasmático y la permeabilidad al agua, aumentan la síntesis de pared celular reduciendo la presión, lo que produce un aumento en la plasticidad de pared ocasionando su extensión y con ello el crecimiento (Barba,1988). Las auxinas más ampliamente utilizadas en el cultivo *in vitro* son el ácido indolacético (AIA) e indolbutírico (AIB) de origen natural, además del ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) que es de origen sintético (Devlin, 1983).

3.12.2. Citocininas

El nombre genérico de las citocininas se emplea para aquellas sustancias que estimulan principalmente la división celular, casi todas las citocininas conocidas tanto naturales como sintéticas, son derivadas de la adenina. Existen evidencias de que las citocininas se concentran en tejidos con crecimiento activo. El transporte principal de

la citocininas es vía xilema y fundamentalmente acropétalo (de las raíces a las partes aéreas).

Entre los principales efectos de las citocininas se encuentran promover la división celular, inhibir el crecimiento de las raíces y la elongación del tallo, estimular el alargamiento de las hojas, retrasar la senescencia e inhibir la dominancia apical (Barba, 1988). Las citocininas más ampliamente utilizadas son la 6-benciladenina o bencilaminopurina (BA), 6-furfurilaminopurina o cinetina (KIN), 2-isopenteniladenina (2iP) y zeatina (ZEA)

3.12.3. Agentes gelificante

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

3.13. Cultivo *in vitro* de *stevia*

La regeneración de plantas de cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* puede obtenerse por embriogénesis somática o por organogénesis. La vía organogénesis desde hojas (Ferreira y Handro, 1987; Ferreira y Handro, 1988; Yang y Chang, 1979), brotes axilares (Bespalhok et al., 1992), tallo (Tamura et al. 1998), cultivos en suspensión (Ferreira y Handro, 1988) y anteras (Flachsland et al., 1966). La se han realizado además embriogénesis somática a partir de hojas (Bespalhok et al, 1993; Wada et al, 1981) y tallos (Miyagawa et al., 1984).

Tamura et al. (1998) realizo trabajos de propagación clonal de *Stevia rebaudiana* a partir de planta madre. Bespalhok y Hattori, (1997) obtuvieron formación de callos embriogénicos y realizaron cortes histológico. Sivaram y Mukundan (2002)

reportaron estudios de cultivo *in vitro* de *S. rebaudiana* a partir de explantes de flores. Ferreira y Handro (1988) describen un método para el mantenimiento y regeneración de plantas de producción de cultivos en suspensión de células de *S. rebaudiana*.

3.13.1. Micropropagación

Se han desarrollado protocolos de regeneración de plantas *in vitro* de estevia a partir de distintos explantes como segmentos nodales, meristemos y hojas.

Arpita et al., (2011), realizaron micropropagación en medio de Murashige y Skoog (MS) suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹), agar (7 g L⁻¹) y cinetina (2 mg L⁻¹) obteniendo más de 11 brotes múltiples de un explante en 35 días de cultivo. Para la inducción de raíces y elongación, usaron medio MS más indol-3-acético y 6-bencilaminopurina el cual mostró un efecto adverso, promoviendo el crecimiento de callos indeseables en la zona radicular. Posteriormente microplantas se aclimataron con éxito en una mezcla equilibrada de arena, tierra y abono de granja (1:1:1 v/v).

Anbazhagan et al., (2010), establecieron ápices y segmento nodales la producción *in vitro* de estevia obteniendo en la combinación de BA/IAA (1.0/0.5 mg L⁻¹) el mayor número de brotes de (16.20 ± 0.37) en explantes de ápices seguido de segmento nodales (14.00 ± 0.31) mientras que al usar solo BAP (2mg L⁻¹) obtuvieron número de brotes de (9.20 ± 0.37) en ápices seguido de segmento nodales (8.20 ± 0.40); sin embargo al usar BA (1mg L⁻¹) se obtuvieron número de brotes (3.60 ± 0.40) en ápices y de segmento nodales (4.00 ± 0.31). En el proceso de rizogénesis se obtuvo un porcentaje de (93 %) en IAA (1.0 mg L⁻¹) obteniendo número de raíces (11,80 ± 0,80) mientras que al usar IBA (1mg L⁻¹) se obtuvo el porcentaje (86 %) en formación de raíces con un numero de raíces de (10,40 ± 0,74). El número de raíces disminuyó con a modo que las concentraciones tipos de auxina aumentaba. De tipo similar se encontraron resultados por trabajos anteriores en las mismas especies (Sivaram y Mukundan, 2003; Ahmed et al, 2007; Mitra y Pal, 2007). En el proceso de aclimatación se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de 82 % después de 4

semanas en sustrato que contiene arena, tierra y humus de lombriz en la proporción 1:1:1.

Hossain *et al.*, (2008), establecieron que ápices y segmentos nodales de *Stevia* responden de manera diferente a los efectos de las hormonas ya que fueron significativamente diferentes en términos de número de brotes. Ya que los ápices en MS con BAP (1mg L^{-1}) mostro el mayor número de brotes (3.10) mientras que los segmento nodales se obtuvo el mayor número de brotes (2.50) en Kin (3mgL^{-1}). En este mismo estudio se realizó enraizamiento de microplantas en medio MS (100 y 50 %) y se obtuvo que en MS (100 %) a los 7.5 días inicio la formación de raíces mientras que en MS (50 %) la formación de raíces comenzó después de 10.5 días con un numero de raíces de 6.0 mientras que en Ms (100 %) se obtuvo número de raíces (8.6) por microplantas. Mientras que al usar MS (100 %) suplementado con NAA (1.5 mg L^{-1}) se obtuvo el mayor número de raíces por plántula (13.80) y al usar MS (100 %) suplementado con AIB (1.0 mg L^{-1}) se obtuvo el número de raíces por plántula (10.80).

Espinal de Rueda *et al.*, (2006), obtuvieron el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* el mayor tamaño de brotes (2.50 cm) en medio líquido MS con 50 % de macroelementos y $6\text{ }\mu\text{M}$ de kinetina (Kin). En la etapa de multiplicación este tratamiento fue sometido a tres cantidades de kinetina (2, 4 ó $6\text{ }\mu\text{M}$) para inducir más brotes y el mejor resultado se obtuvo en el medio con $6\text{ }\mu\text{M}$ de kinetina obteniendo número de brotes (2.50). Las pruebas para el enraizamiento *in vitro* de las microplantas se realizaron en un medio basal de MS con tres tipos de auxina: ácido Indolacético (AIA), ácido Indolbutírico (AIB) o ácido Naftalenacético (ANA) y cinco concentraciones para cada tipo de auxina; la mayor cantidad y la mejor calidad de raíces se obtuvo utilizando ANA (0.5 mg L^{-1}) a los 15 días después de su inducción en un porcentaje de 73 %, también se obtuvo que al aumentar ANA (2 mg L^{-1}) aumentando la formación de callo e inhibiendo la formación de raíces. Las plantas más altas y el mayor número de plantas aclimatadas se obtuvieron usando

microtúneles en bolsa plásticas con sustrato compuesto por Pro-Mix 'BX':arena (1:1) con un porcentaje de sobrevivencia de 82.7 % para bolsas plásticas.

Suárez y Salgado (2008), observaron que la presencia de auxina en el medio de cultivo es necesaria y suficiente para inducir la formación de callos en los explantes de estevia. Estos autores trabajaron con secciones de entrenudos tomados de plantas de *Stevia rebaudiana* establecidas en condiciones *in vitro* inducidos a formar callos en presencia de diferentes concentraciones de Bencilaminopurina (BAP) combinadas con varias cantidades de ácido Naftalenacético (ANA) evaluándose su efecto sobre el porcentaje de inducción de callo, friabilidad y formación de órganos. Obtuvieron que al menos el 80 % de los explantes cultivados desarrollaron callos en presencia de ANA y ANA + BAP. El mayor porcentaje de friabilidad se obtuvo en el tratamiento con combinaciones ANA (0.5 mg L⁻¹) y BAP (4.0 mg L⁻¹), mientras que los valores más bajos en esta variable ocurrieron cuando el medio estaba desprovisto de BAP. Los bajos porcentajes de friabilidad en presencia de ANA solamente indica la necesidad de la interacción de ambas hormonas en el medio para obtener callos friables.

La formación de brotes caulinares bien diferenciados y desarrollados con morfologías normales cuando los explantes fueron cultivados en presencia de ANA (1.0 mgL⁻¹) BAP (4.0 mg L⁻¹). Los brotes mostraron una coloración inicial amarillo-blanquecino producto de la oscuridad aunque rápidamente se tornaron de color verde ante la presencia de luz. De forma alterna, se observó el desarrollo de estructuras radicales notándose un mayor número de estas cuando los explantes fueron cultivados en medios suplementados solo con ANA. En conclusión recomiendan un suplemento combinado de ANA (1.0 mg L⁻¹) y BAP (4.0 mg L⁻¹) para obtener plantas de *Stevia rebaudiana* a través de organogénesis.

3.13.2. Producción de callos y células en suspensión

Ceiba *et al.*, (2006), obtuvieron que la mejor respuesta en propagación *in vitro* de estevia en explantes de brotes cultivados con 6 µM de kinetina en medio líquido con 50 % de macroelementos MS, seguido del tratamiento en que se utilizaron 4 µM

de kinetina en medio líquido con 50 % de macronutrientes MS. El menor tamaño de los brotes se observó al utilizar la mayor dosis de Bencilaminopurina, en medio sólido con 50 % de macronutrientes MS.

Tisserat (1985), demostró que la formación de callos está íntimamente ligada a la adición de auxinas al medio de cultivo, este efecto podría verse potencializado por la adición de citocininas. Suárez y Salgado (2008), puntualizaron que el mayor porcentaje de friabilidad de los callos inducidos a partir de secciones de entre nudos de estevia se obtuvo en el tratamiento con 0.5 mg L^{-1} de ANA + 4.0 mg L^{-1} de BAP, mientras que los valores más bajos ocurrieron cuando el medio estaba desprovisto de BAP. Los bajos porcentajes de friabilidad en presencia de ANA indica la necesidad de la interacción de ambas hormonas en el medio.

Oriza *et al.* (2005), cultivaron explantes de estevia en un medio con de BAP (2.0 mg L^{-1}) de ANA (2.0 mg L^{-1}) y obtuvieron una formación de callo en los explantes foliares, iniciándose la respuesta en el haz de la hoja en la región más cercana al pecíolo, para posteriormente formarse a lo largo de todo el explante. Los cultivos incubados bajo un fotoperíodo formaron callo en menor tiempo y la producción de callo se duplicó con respecto a los explantes incubados en oscuridad continua. Asimismo, observaron que la adición de ácido cítrico y ácido ascórbico en el medio de cultivo evitó la oxidación del explante y del callo, pero retrasó la respuesta.

Bespalhok y Hattori (1997) obtuvieron que La formación de callo embriogénico a partir de flores de estevia después de 10 días de la inoculación. El callo embriogénico fue caracteriza por un color de verde brillante a claro amarillo, de estructura compacta y la presencia de globulares somáticos embriones en su superficie. La formación de callos embriogénicos (42 %) de 2,4-D (18.10 mM) adicionado con cinetina (2.32 mM). También se obtuvo una formación de callos embriogénicos (40 %) en 2,4-D ($9.05 \text{ }\mu\text{M}$) en el medio sin cinetina. Por el contrario al aumentar la concentración de kinetina (9.29 mM) redujo el porcentaje (35 %) de formación de callo embriogénico. Además realizaron cortes histológicos y mostraron la formación de tejido embriogénico y embriones somáticos. El callo embriogénico se

caracterizó por células pequeñas con núcleos oscuros teñidos y nucleolos. Los embriones somático se observaron en la periferia del el callo embriogénico en diferentes etapas de desarrollo. Estos autores sugieren que la ontogenia de la estevia somática embriones comienza cuando una sola célula embriogénica se divide para formar un patrón de proembrión filamentosas. Una red fibrilar se podía ver en los superficies de embriogénicas células individuales y proembriones, Vasser *et al.* (1995) sugiere que esta red extracelular podrían jugar un papel en la adhesión y reconocimiento, ayudando a coordinar el desarrollo temprano las etapas de proembriones. La naturaleza de esta red fibrilar aún no está aclarada.

Una sustancia mucilaginosa se observó el llenado espacios entre los embriones somáticos y embriogénicas callo, cuando se tiñen con azul de Toluidina que tiene un color rojo-púrpura (metacromasia), lo que indica una la naturaleza glicoprotéica. La sustancia mucilaginosa también informó en callo embriogénico friable en maíz (Franz Y Schel, 1991), donde los autores sugirieron que podrían estar implicados en la nutrición de los embriones somáticos, para facilitar el transporte de nutrientes y metabolitos por difusión.

Capítulo 4

Materiales y Métodos

La presente investigación se realizó en los Laboratorios de Biotecnología de semillas y Bioquímica (Botánica) además en los invernaderos del Campus Montecillo del Colegio de Postgrados, ubicado en el Km 36.5 de la Carretera Federal México- Texcoco, Montecillo, Estado de México. El clima de la región es templado (Co)(w)b(y')(g) subhúmedo con lluvias en verano, época seca en invierno y temperatura media anual de 15.2 °C, siendo Mayo el mes más caluroso y Enero el más frío. La precipitación media anual es de 635.5 milímetros.

4.1. Características del material vegetal

Se utilizaron plantas de *Stevia rebaudiana* B., de la llamada variedad Criolla, introducida de Paraguay, por el Ing. Agr. Alfonso Muratalla Lúa en el año 2008, con el auxilio económico del Sindicato Independiente de Académicos del Colegio de Postgraduados (SIACOP) y propagadas por estacas en el Huerto Agroecoturístico Nezahualcoyotl ubicado en S. J. Tezontla, Texcoco. Dichas plantas tenían aproximadamente 3 meses de edad, con una altura promedio de 20 cm, de apariencia sana y sin heridas.

4.2. Desinfestación del material vegetal

Se utilizaron hojas 3 a 5 cm de longitud y segmentos nodales, los cuales se sometieron a un proceso de desinfestación, que consistió en lavarlos tres veces con agua corriente, para posteriormente mantenerlos sumergidas en solución durante 18 minutos para tejidos de hojas y 25 minutos para segmentos nodales, con fungicida y bactericida al 0.5 % (Ridomil: Metalaxil-M (R)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino]-ácido propiónicometiléster (0.5 %), Clorotalonil: Tetracloroisoftalonitrilo (72 %) ingredientes inertes: Dispersante, conservador, antiespumante, anticongelante,

espesante, amortiguador y solvente (23 %), y bactericida (Fungimycin 100: Estreptomina 18.75 %, Oxitetraciclina 2.0 %).

En la desinfestación de hojas de estevia se realizaron en 5 tratamientos (Cuadro 4.2.1.) y para la desinfestación de segmentos nodales se probaron 4 tratamientos (cuadro 4.2.2).

Cuadro 4.2.1. Tratamiento de desinfestación de hojas de *Stevia* para su establecimiento *in vitro*.

RAT	Antes de la siembra			Aplicado en Medio de Cultivo		
	Fun gimycin 0.7 g L ⁻¹ 5 min	R idomil 0 .7 g L ⁻¹ 5 min	loro 1.8 % 8 min	R idomil 0 .5 g L ⁻¹ 1 0 Dias	Fun gimycin 0.5 g L ⁻¹ 10 Dias	Cef otaxima 0.5 g L ⁻¹ 10 Dias
1						
2						*
3	*	*				*
4	*	*		*	*	
5	*	*		*	*	*

Al término de este tiempo, se retiró la solución fungicida-bactericida y se agregó Hipoclorito de Sodio comercial (cloralex[®] 1.8 % de cloro activo) con 0.5 % de jabón líquido durante 5 minutos, enseguida los tejidos se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada dentro de una cámara de flujo laminar.

Cuadro 4.2.2. Desinfestación de segmentos nodales de *Stevia*.

RAT	Antes de la siembra			Medio de cultivo		
		Fu	F		F	Fu
	ngimycin	idomil	loro	idomil	ngimycin	fotaxima
	0.7	0	8 %	0	0.5	0.5
	gL ⁻¹	.7 gL ⁻¹		.5 gL ⁻¹	gL ⁻¹	gL ⁻¹
	5	5	5 Min	1	10	10
	Min	Min		0 Dias	Dias	Dias
	*	*				*
	*	*		*	*	*

4.3. Medios de cultivo

4.3.1. *Inducción de callo*

El medio de cultivo empleado en la etapa de inducción de callo fue el de Murashige y Skoog (MS, 1962) al cual se le agregaron 30 g L⁻¹ de sacarosa, diferentes concentraciones de ácido Indolacético (1 y 1.5 mg L⁻¹) y 2, 4-D (1 y 1.5 mg L⁻¹) y Bencilaminopurina (1 mg L⁻¹); asimismo, se le adicionó 0.7 g L⁻¹ de Fungimycin 100, 0.7 g L⁻¹ de Ridomil y 500 mg L⁻¹ de Cefotaxima sódica, la cual se agregó después de la esterilización (una vez que estaba a 30 °C aproximadamente). El pH del medio se ajustó a 5.8 y se le agregó 2.3 g L⁻¹ de Phytigel. El medio de cultivo se esterilizó en una autoclave a 121°C durante 20 min y después se vació en cajas Petri y se sellaron con Parafilm.

4.3.2. *Regeneración de brotes adventicios*

Este medio consistió en sales del medio MS, más diferentes concentraciones de ácido Indolacético (0.3, 0.5, 0.8 y 1 mg L⁻¹), en combinación con Bencilaminopurina (2 y 4 mg L⁻¹) y cinetina (6-furfurilaminopurina) (1.3, 2 y 8 mgL⁻¹). Además, el medio fue complementado con 0.7 g L⁻¹ de Fungimycin 100, 0.7 g L⁻¹ de Ridomil y 500 mg L⁻¹ de Cefotaxima. El pH del medio se ajustó a 5.8 y se le agregó 2.3 g L⁻¹ de Phytigel.

4.4. Inducción y mantenimiento de callo

Segmentos de 1 cm² obtenidos de las hojas previamente desinfectadas se colocaron en cajas Petri que contenían 30 ml del medio para la inducción de callo previamente descrito. Las cajas con nueve segmentos cada una, se incubaron en oscuridad completa durante 28 días, a una temperatura de 25 ± 2 °C realizando el cambio de los explantes a medio fresco cada cuatro semanas.

4.5. Formación y desarrollo de brotes adventicios

Los segmentos nodales desinfectados se sembraron en frascos de 250 mL de capacidad con 30 ml de medio para la regeneración de brotes adventicios. Los frascos se incubaron en una cámara de ambiente controlado a 25 + 2 °C con 16 horas de fotoperiodo y una intensidad lumínica de 25 μmolseg⁻¹cm⁻². Para propiciar el desarrollo de los nuevos brotes formados éstos se transfirieron individualmente a un medio MS con 20 g L⁻¹ de sacarosa,

4.6. Enraizamiento de brotes

Los brotes adventicios regenerados que alcanzaron una longitud de 5 cm se cultivaron en un medio MS suplementado con sacarosa 20 g L⁻¹ y 1 mg L⁻¹ de ácido Indolbutírico (AIB), en el cual permanecieron por siete días. Transcurrido este tiempo los brotes se cambiaron a un medio MS libre de AIB.

4.7. Aclimatación a condiciones de invernadero

Las microplantas regeneradas se extrajeron del frasco y sus raíces se lavaron con agua corriente para eliminar los residuos del agar; después se sumergieron en una solución fungicida (Ridomil 1 g L⁻¹) durante 5 min. Posteriormente, se colocaron en vasos de unicel de 250 ml de capacidad conteniendo Peat Moss (Farfard Growing mix 1) humedecido a capacidad de campo. Los vasos se cubrieron con bolsas de polietileno y se establecieron en el invernadero; después de 10 días se les retiraron

las bolsas, y se colocaron bajo una malla sombra de 90 % durante 8 días. Las plantas se regaron cada tercer día con agua corriente y se les aplicó fertilizante (Miracle-Gro® All Purpose) en una dosis de 1 g L⁻¹ cada 15 días. Se evaluó la sobrevivencia y altura de las plantas durante 60 días.

4.8. Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar, en el experimento de inducción de callo se establecieron cada caja Petri 9 explantes de hojas y cada repetición consistió en una caja Petri, en total se establecieron 25 cajas Petri en medio sólido.

Para la inducción de brotes adventicios se establecieron 25 repeticiones, considerando como una repetición un frasco con un segmento nodal.

Se realizó un análisis de la varianza con el programa SAS V6.4, así como una comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.9. Determinación cualitativa de Steviol, Steviósido y Rebaudiosido A por Cromatografía en capa fina.

4.9.1. Material vegetal

Se utilizaron tejidos de cuatro diferentes fuentes: a) planta madre de 3 meses de edad de la variedad Criolla, b) planta cultivada *in vitro* en un medio MS con 1.3 mg L⁻¹, c), microplantas aclimatadas en el invernadero y d) callos obtenidos a partir de segmentos de hoja cultivados en medio sólido con 2,4-D (1 mg L⁻¹) y BA (1mg L⁻¹).

4.9.2. Obtención de extractos

Se utilizaron 100 mg de cada muestra vegetal proveniente de planta madre, microplanta aclimatada, planta cultivada *in vitro* y callo, se liofilizaron por un tiempo de 72 horas hasta obtener el tejido vegetal seco; enseguida las muestras se trituraron por separado en un mortero, se le añadió 10 ml de Metanol y se pasaron a un vaso de precipitado de (25 ml) en agitación por 2-4 horas en plancha magnética para una mejor separación de los compuestos. Se centrifugaron por 5 minutos a 1400 rpm a una temperatura de 4 °C, el sobrenadante obtenido de cada muestra se concentró hasta un 1 ml en una estufa a 90°C por aproximadamente 2 horas. Las muestras concentradas fueron filtradas con un sistema Milipore de 0.45 μm .

Estas muestras se utilizaron para la separación e identificación de los compuestos de steviosido en cromatografía de capa fina (TLC). Se aplicó un volumen de 100 μL de extracto de cada muestra, las cuales fueron aplicadas en placas diferentes de TLC de Sílica Gel 60 F₂₅₄ (5 x 20 cm, Merck, Germany) y se corrieron dentro de una cámara de separación, por un tiempo de 4 a 5 horas en presencia de soluciones mixtas: Cloroformo-Metanol (35:15) (v/v), Cloroformo-Metanol-Agua (20:20:5) (v/v) y Cloroformo-Isopropanol-ácido Acético-Agua (25:25:5:5) (v/v), esto se realizó para conocer y obtener la mejor separación de steviósidos.

Para el revelado del steviosido se utilizaron las soluciones de Timol y Anisaldehído por aspersion, finalmente los steviósidos se revelaron a una temperatura de 110 °C, por un tiempo de 10 minutos. Las muestras separadas y reveladas fueron comparadas de manera paralela con patrones de steviósidos de referencia: steviol, Steviosido y Rebaudiosido A (marca: SIGMA-ALDRICH USA).

Para la preparación de solución Timol se pesó 500 mg de Timol sólido y se disolvió en 5 mL de H₂SO₄ y se le agregó 95 mL de Etanol. Para la solución de Anisaldehído se pesó 1 g y se le agregó 1 mL de H₂SO₄ y 18 mL de Etanol.

Capítulo 5

Resultados y Discusión

5.1. Establecimiento *in vitro*

El establecimiento es una etapa fundamental para el inicio del cultivo *in vitro* de cualquier material vegetal. Teixeira (2004) y Villegas (2006), mencionaron que los requerimientos de cada selección, cultivar o variedad son específicos, por lo cual es necesario determinar las condiciones ideales para cada genotipo. Especialmente, se debe determinar el proceso de desinfestación que depende de varios factores, entre los que se encuentran las condiciones en la que se mantienen las plantas madre (en campo o invernadero), su edad, (a mayor edad, mayor probabilidad de contaminación *in vitro*), ya que el tiempo de exposición a los contaminantes ambientales aumenta (Villegas, 1990).

Asimismo, el tipo de explante y su tamaño guardan una estrecha correlación con el grado de contaminación; así, a mayor tamaño mayor contaminación (Villegas, 2006). Utilizando ápices se reduce la contaminación en comparación con las secciones nodales, la época del año también influye en el nivel de contaminación de los explantes. Al respecto se ha observado en explantes de *Prunus* que en verano y otoño la contaminación *in vitro* es mayor que en el resto de año (Skirvin et al. 1981; Rodríguez et al. 2003).

Para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* se aplicaron cinco tratamientos para la desinfestación de las hojas y nudos, para ello se utilizó una solución de fungicida y bactericida (Fungimycin, Ridomil y Cefotaxima) durante la desinfestación del material vegetal, además de incluirlos en el medio de cultivo.

Al usar en el proceso de desinfestación Cloro (1.8 %), Ridomil y Fungimycin previo a la siembra *in vitro* además de agregarlos en el medio junto con Cefotaxima (500 mg L⁻¹) establecidos en el T5, se obtuvo un porcentaje de contaminación de 50

% y permitió la supervivencia de 47 % de ellos. Dichos resultados (T5) mostraron menor porcentaje de contaminación y por lo tanto mayor porcentaje de sobrevivencia que los obtenidos en los otros tratamientos probados (Cuadro 5.1.1).

Cuadro 5.1.1. Porcentaje de contaminación y sobrevivencia de los explantes de hoja de estevia desinfectados mediante distintos tratamientos.

TRATAMIENTO	CONTAMINACION	SOBREVIVENCIA
T1	100 %	0 %
T2	99.45 %	0.55 %
T3	89.43 %	10.57 %
T4	74.67 %	25.33 %
T5	52.45 %	47.55 %

En el tratamiento T1, únicamente se aplicó cloro antes de la siembra y se obtuvo 100 % de contaminación, para el T2 se aplicó cloro, además de incluir Cefotaxima (500 mg L^{-1}) en el medio y el resultado fue un porcentaje de contaminación muy alto (99.45 %). En el Tratamiento 3, se incluyó antibiótico (Cefotaxima 500 mg L^{-1}) en el medio de cultivo con la finalidad de que existiera contacto prolongado entre el antibiótico y el explante (10 días) y el porcentaje de contaminación fue de 89.43 %. Con este tratamiento (T3) fue posible observar que durante los primeros días después de la siembra los explantes no mostraban evidencias de contaminación pero después de 30 días, éstos se tornaban de color café oscuro o negro. Para el T4, el porcentaje de contaminación fue de 74.67 % y el porcentaje de sobrevivencia fue 25.33 % el cual fue superado por el T5.

Probablemente, los altos índices de contaminación se debieron a la alta concentración de azúcares que la planta produce de manera natural, que permite de esta manera la proliferación de las bacterias y hongos. La contaminación de los explantes con hongos o bacterias limita la capacidad morfogénica sana de los mismos. Se han desarrollado métodos enfocados a la erradicación de los virus y las bacterias, estos procedimientos van desde la eliminación de tejidos sospechosos hasta el empleo de antibióticos solos o combinados tal como la Estreptomina,

Gentamicina, Eritromicina y Kanamicina utilizadas en cultivo *in vitro* de zanahorias y orquídeas (Blanco et al., 2003).

El principal problema en el establecimiento *in vitro* de los explantes de estevia provenientes de hojas fue la alta incidencia de hongos y bacterias. Al incluir antibiótico en el medio de cultivo la presencia de dichos microorganismos, disminuyó, pero también causó compactación de los explantes y los callos que se formaron sobre ellos, así como una rápida oxidación de los mismos después de los 30 días. Respuesta similar se observó por Ramos (2007), en tejidos de Cempoalxóchitl tratados con antibióticos durante 15 días. El lavado previo de los explantes con agua corriente y detergentes, ayudo a una mejor desinfección.

La inmersión de los explantes en soluciones antibióticas y/o antimicóticas (Gentamicina, sulfato de estreptomina, ampicilina, tetraciclina, Carbenicilina, sulfato de Gentamicina, Pentacloronitrobenceno, Rifampicina, Anfotericina B, Benomil, Carbendazim) puede ser de utilidad, pero debe ser utilizada en casos excepcionales, ya que estos productos pueden alterar la composición de los medios de cultivo o ser metabolizados por los explantes (Levitus et al. 2010).

Al respecto, Malinga et al. (1980), encontraron que el Cloranfenicol (10 mg L^{-1}) inhibe el crecimiento de los callos y la iniciación de los tallos en cultivos de *Nicotiana* spp. En esta misma especie la estreptomina (0.5 mg L^{-1}) interfirió en el crecimiento de los callos (Umiel y Goldner, 1976) y en *Lycopersicon esculentum* y *Saccharum officinarum*, la Kanamicina disminuyó la producción de biomasa e inhibió la regeneración y desarrollo de los ápices. Por otro lado, se observó que el tejido de *Nicotiana spp* es tolerante a 50 y 100 mg L^{-1} de Espectinomicina, debido a que los callos sobrevivieron a esta concentración, pero al aumentar la concentración a 200 y 500 mg L^{-1} hubo necrosis del callo (Juárez, 1989)

Por lo tanto, el desinfectante más efectivo debe ser aquel que cumpla el requisito de ser suficientemente fuerte para eliminar los agentes contaminantes, sin dañar al tejido u órgano (CIAT 1991). Los segmentos nodales de estevia pueden

considerarse como explantes difíciles de desinfectar, debido a la pubescencia de los tallos que favorecen el alojamiento de microorganismos y pequeños insectos.

Para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales se probaron 4 tratamientos en la desinfección de segmentos nodales para establecer la micropropagación de *Stevia rebaudiana*.

Se obtuvo que en el tratamiento 4, el porcentaje de contaminación de los explantes fue bajo (1.77 %) por lo que el porcentaje de sobrevivencia fue de 98.23 %. Estos resultados observados fue al utilizar una solución a base de Ridomil (0.7 g L⁻¹), Fungimycin (0.7 g L⁻¹) y cloro (18 %), además de incluir Cefotaxima (0.5 g L⁻¹) en el medio de cultivo (Cuadro 5.1.2).

Sin embargo en el tratamiento T1, el porcentaje de contaminación de los explantes fue de 100 % principalmente por hongos al utilizar solamente cloro antes de la siembra.

Cuadro 5.1.2. Porcentaje de contaminación y sobrevivencia de segmentos nodales de estevia.

Tratamiento	Contaminación	Sobrevivencia
1	100 %	0 %
2	89.22 %	10.78 %
3	69.45 %	30.55 %
4	1.77 %	98.23 %

El análisis estadístico de los resultados de contaminación de los segmentos nodales cultivados *in vitro*, mostró que la mayor contaminación por hongos y por bacterias se presentó cuando sólo se aplicó cloro (1.8 % por 25 minutos). Por otro lado, al tratar los explantes con el Ridomil y Fungimycin antes de la siembra e incluir Cefotaxima (0.5 mg L⁻¹) en el medio, el porcentaje de contaminación disminuyó para los tratamientos T2 y T3; sin embargo, al tratar los segmentos nodales con fungicida y bactericida antes de la siembra además de aplicar al medio de cultivo Ridomil,

Fungimycin y Cefotaxima resultó ser el mejor tratamiento, ya que se redujo la contaminación hasta 1.77 % y con 98.23 % de sobrevivencia.

5.2. Inducción a Callo

Un callo es una masa de células más o menos organizada (Chawla, 2002) cuya formación depende del tipo de regulador del crecimiento y la concentración que se incluya en el medio, así como del genotipo y del contenido endógeno de hormonas del explante. Para inducir la formación de callo en los explantes de hojas de estevia se probaron tres tratamientos que consistieron en la combinación de auxina/citocininas y auxina/auxina.

Para la inducción de callo se probaron 3 tratamientos para determinar la capacidad de formación de callo en explantes de hojas: T1 (2,4D/BA ($1/1\text{mg L}^{-1}$)), T2 (2,4D/AIA ($1/1\text{mg L}^{-1}$)) y T3 (2,4D/AIA ($1.5/1.5\text{ mg L}^{-1}$)).

Las tres combinaciones de reguladores de crecimiento probadas promovieron la formación de callos, dichos callos fueron compactos y de color verde con zonas blancas; sin embargo, la cantidad del callo formado dependió del tipo y concentración de auxinas y citocininas utilizadas (Figura 5.1).

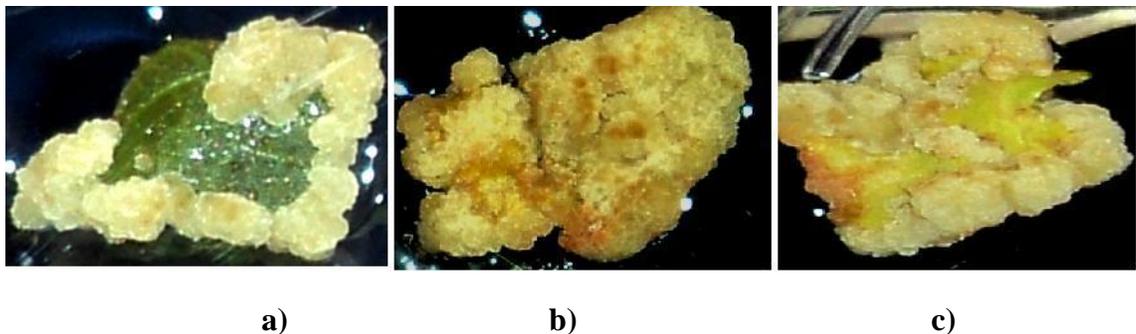


Figura 5.1. Respuesta a la formación de callo en (a) 2,4D/BA ($1/1\text{mg L}^{-1}$), (b) 2,4D/AIA ($1/1\text{mg L}^{-1}$) y (c) 2,4D/AIA ($1.5/1.5\text{mg L}^{-1}$).

Quince días después de la siembra, los explantes tratados con AIA, 2,4-D y BA mostraron la formación de callos con diferentes características. Al inicio del cultivo *in*

in vitro las orillas de los explantes presentaron ondulaciones, más tarde comenzó a formarse un callo incipiente, el cual fue evidente 15 días después. Después de 25 días de su establecimiento, los callos se mostraron de color beige, pero cinco días más tarde los callos se tornaron café obscura (oxidación) en los bordes. Cabe señalar que algunos de los explantes formaron callo sólo en 25 % de su superficie, mientras que otros se cubrieron de callo en su totalidad. La mayor parte de los explantes de hoja crecieron en un medio (1 mg L^{-1}) de 2,4-D y AIA fueron cubiertos por callo en el 50 % de su superficie, y los explantes que se cultivaron en 1.5 mg L^{-1} de 2,4-D y AIA y formaron callo en 25 % de su superficie, siendo este último el que mejor respuesta indujo comparado con los otros tratamientos probados (Cuadro 5.2.1).

Cuadro 5.2.1. Capacidad de formación de callo en explantes de hoja de *estevia*

Concentraciones de los reguladores	Porcentaje de Formación de callo en explantes de hojas	Medias
T1: 1/1 (mgL^{-1}) 2,4D/BA	25 %	3.50 ab
	50 %	1.81 ab
	75 %	1.93 ab
	100 %	1.62 ab
T2: 1/1 (mgL^{-1}) 2,4D/AIA	25 %	4.46 a
	50 %	0.68 b
	75 %	1.93 ab
	100 %	1.75 ab
T3: 1.5/1.5 (mgL^{-1}) 2,4D/AIA	25 %	1.00 b
	50 %	4.68 a
	75 %	1.00 b
	100 %	2.06 ab

* Valores con la misma letra dentro de las columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

La capacidad de formación de callo fue claramente notable al combinar dos auxinas (2,4-D) y (AIA), respuesta que se observó a los 20 días de establecer el cultivo; en contraste la combinación de una auxina (2,4-D) con una citocinina (BA)

resultó poco favorable para inducción de callo, sin embargo Villanueva et al. (2005), obtuvieron mejores resultados al combinar (2,4-D/BAP).

Los resultados obtenidos por Villanueva et al. (2005) Contrastaron con estos resultados ya que una combinación de auxina y citocinina (2,4-D/BAP) (20/50 μM) en explantes de hojas de Stevia, alcanzo un 100 % de formación de callo, altamente fiables, siendo útiles para el establecimiento de la suspensión celular, con peso promedio de 1.53 g transcurridos los 84 días y una supervivencia de 73.33 % a los 12 días.

Cabe señalar que después de 30 días de iniciar la inducción, los callos se tornaron de color café oscuro a negro y posteriormente murieron. El oscureciendo de los callos pudo deberse a la presencia de compuestos fenólicos oxidados que se asocia a los tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés, provocado por el daño mecánico producido durante el aislamiento del explante de la planta madre y las condiciones de cultivo *in vitro* (Mejia y Vittorelli, 1988). Los compuestos fenólicos liberados al medio, pueden inhibir el crecimiento e incluso matar al explante. Natali et al. (1990) afirman que el uso de BA y cinetina en el medio de cultivo causó el ennegrecimiento de los tejidos de hoja de *Aloe vera* por la oxidación de los compuestos fenólicos presentes. Los procesos de oxidación son causados principalmente por efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre, la composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (George 1993, Tabiyeh et al. 2006, Van Staden et al. 2006, Abdelwahd et al. 2008).

Villanueva et al., (2005), por su parte reporto que BAP en las dosis de 20 y 50 μM indujeron callo en 93.33 % de los explantes de hojas de Stevia. Estos callos fueron de gran tamaño, color amarillo, consistencia dura y mostraron procesos necróticos, confirmando los resultados obtenidos por Yamazaki et al. (1991).

Para minimizar el daño de estos compuestos se incluyen en el medio de cultivo agentes adsorbentes de fenoles que modifican del potencial Redox con

agentes reductores, tales como el carbón activado, la Polivinilpirrolidona, antioxidantes, ácido ascórbico, Mercaptoetanol y Ditioneitol, ya que inactivan las fenoloxidasas evitando la oxidación en explantes (Yamazaki *et al.* 1991).

En algunos medios se incorporan ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico y es frecuente el empleo de L-glutamina y de caseína hidrolizada. Aún hoy se siguen utilizando ciertos componentes de composición química no bien definida como el agua de coco (5 a 15 %), jugo de tomate y puré de banana. También en ocasiones es necesaria la incorporación de agentes antioxidantes (L-cisteína, ácido ascórbico, Polivinilpirrolidona) para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes. Este ennegrecimiento puede causar la muerte de los mismos. El carbón activado (0.1 a 5 %) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos (Levitus *et al.* 2010).

5.3. Regeneración *in vitro* de plantas de *Stevia rebaudiana* B.

5.3.1 Inducción de brotes adventicios

La morfogénesis puede definirse como el inicio de la forma y función de organismos vivos (Segura, 1993). Generalmente, se utilizan citocininas para estimular el crecimiento y desarrollo del material vegetal, ya que estas promueven la división celular, siendo la benciladenina y la cinetina las más comunes (Pierik, 1990).

Con la finalidad de inducir la proliferación de brotes adventicios a partir de yemas axilares presentes en los segmentos nodales, estos se cultivaron en distintas combinaciones de citocininas y auxinas.

El análisis estadístico de los resultados, no mostró diferencias estadísticas en el número de brotes formados por explantes al utilizar distintas combinaciones de

reguladores de crecimiento, a excepción del que contenía 2 mg L⁻¹ de cinetina y 0.5 mg L⁻¹ de AIA con el que se obtuvo el menor número de brotes por explante (1.4). Fue posible obtener un promedio de dos brotes por explante en la mayoría de los tratamientos probados (Cuadro 5.3.1) (Figura 5.3.1)

Cuadro 5.3.1. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de brotes adventicios de *Stevia rebaudiana* B.

Tratamiento	Reguladores de Crecimiento			Medias
	AIA (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	
T1	0.0	0.0	1.3	2.68 a
T2	0.3	4.0	0.0	2.24 ab
T3	0.5	0.0	2.0	1.40 b
T4	0.8	0.0	8.0	1.92 ab
T5	1.0	2.0	0.0	2.08 ab

* Valores con la misma letra dentro de las columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$

Fue posible encontrar diferencias en las características de los brotes obtenidos de acuerdo a la combinación de reguladores de crecimiento empleados, así los segmentos nodales cultivados en 1.3 mg L⁻¹ cinetina formaron brotes con hojas grandes, brillantes, tallos firmes y vigorosos, sin formación de callo en la base, aunque en algunos brotes se presentó el efecto de vitrificación (Figura 5.2).



Figura 5.2. Formación de brotes adventicios en segmentos nodales de *Stevia rebaudiana* cultivados con cinetina (1.3 mg L⁻¹).

El efecto de la vitrificación *in vitro* es un proceso anormal con cambios anatómicos, morfológicos y fisiológicos, tales que producen hojas de una apariencia vidriosa (Levitus et al. 2010). Este fenómeno está regulado por dos factores clave, la humedad relativa y el potencial del agua, que afectan a dos procesos fisiológicos fundamentales como la fotosíntesis y la transpiración. Debido a la disfunción metabólica asociada, las plantas se vuelven completamente heterótrofas y transpiran excesivamente debido a un mal funcionamiento estomático, y a cambios estructurales en las paredes celulares (Orozco, 2004).

Por otra parte, los tratamientos que contenían auxina y citocinina (AIA/K) indujeron la formación de brotes adventicios con hojas pequeñas y tallos delgados y flácidos con coloración verde oscuro, y en la base de los brotes se mostró un pequeño callo oscuro. Así mismo, los brotes adventicios formados en el medio suplementado con AIA y BA en los tratamientos mostraron hojas pequeñas y tallos con entrenudos muy largos al mismo tiempo que se formó callo en base de los mismos.



Figura 5.3. Efecto de las citocininas y auxinas en la inducción de brotes de estevia, **a)** AIA/K: (0.5/8.0 mg L⁻¹), **b)** K (1.3 mg L⁻¹) y **c)** AIA/K (1/2 mg L⁻¹).

Estos resultados concuerda con los de Mitra y Pal, (2007), quienes obtuvieron que la kinetina es más eficiente que la BAP con respecto a la multiplicación de los brotes axilares y proliferación en *Stevia rebaudiana*. Estos autores encontraron que después de 12 semanas de iniciar el cultivo se formaron 10.4 brotes por explante

en un medio conteniendo de kinetina (10 mg L^{-1}) y AIA (1.0 mg L^{-1}), mientras que sólo obtuvieron 1.5 brotes por explante cuando utilizaron 10 mg L^{-1} de BAP. Figura 5.3.

Por su parte, Espinal de Rueda *et al.* (2006), encontraron la mejor respuesta en la proliferación de brotes en explantes de segmentos nodales de *Stevia rebaudiana* cultivados con $6 \text{ } \mu\text{M}$ de kinetina con 50 % de macroelementos MS (2.5 brotes) seguida del tratamiento con $4 \text{ } \mu\text{M}$ de kinetina en con 50 % de macroelementos (1.3 brotes), obteniendo en promedio 1.3 brotes por explante.

Existen estudios similares en la proliferación de brotes de *Stevia* en los cuales se menciona que las hormonas endógenas de la planta son necesarias para disparar la elongación y estimular el enraizamiento (Patil 1996; Nepovin y Vanek, 1998; Sikach, 1998; Ferreira y Handro, 1998 y Sivaram y Mukundan, 2003). En la mayoría de los casos la BA resultó ser esencial para el crecimiento y fue mejor que la cinetina para la inducción de brotes en los explantes. Se ha reportado que la combinación de BAP y IAA, es mejor para disparar la elongación. Taware *et al.* (2010), confirma que la combinación de auxinas con citocininas, dan como resultado longitudes muy cortas en los brotes en estevia.

Tamura *et al.* (1984), observó que la combinación de kinetina y auxinas dio como resultado brotes adventicios de corta longitud, una longitud muy corta de los brotes. Ellos mismos encontraron que los explantes crecidos en 0.3 mg L^{-1} a 1.3 mg L^{-1} de BAP mostraban tallos con longitudes normales. Santalla *et al.* (1998), obtuvo que las citocininas no inducen organogénesis en los cultivos de tejidos de *S. rebaudiana*.

5.4. Enraizamiento

Las características genéticas, anatómicas y morfológicas propias de cada especie confieren la capacidad de enraizamiento de los brotes adventicios, sin el uso de fitohormona exógenas: En la mayoría de los casos los brotes adventicios no forman raíces sin un estímulo hormonal (auxinas) siendo necesario aplicar auxinas

para inducir la formación de raíces en tales estructuras; dicho proceso puede efectuarse *in vitro* o *in vivo* cuando el brote se transfiere a un sustrato (Olivera, 1998).

En la presente investigación se manejaron dos medios de cultivo para la formación de raíces: el primer medio consistió en el 50 % de las sales de MS, sacarosa (20 g L^{-1}), además de ácido Indolbutírico (AIB 1.0 mg L^{-1}); el segundo medio fue uno similar pero sin AIB. En el primer medio solo se indujo la formación de brotes en 7 días el cual se observaron pequeñas protuberancias en la base del brote y en el segundo medio sin AIB, las raíces crecieron en 10 días obteniendo una longitud de 5mm a 2 cm. Cabe señalar que los brotes muy delgados no lograron formar raíces (Figura 5.4).

Espinal de Rueda et al. 2006 lograron la formación de raíces en brotes de Stevia al utilizar 0.5 mg L^{-1} de ANA, las cuales alcanzaron una longitud de 10 cm después de 15 días de la inducción. Estos resultados se asemejan a los encontrados por Lyakhovkin et al. (1993) y Tamura et al., (1984), quienes utilizaron 0.1 mg L^{-1} de ANA. De la misma forma, Taware et al. (2010), obtuvieron el 100 % de formación de raíces al cultivar brotes de Stevia rebaudiana en 2 mgL^{-1} de AIB. Espinal et al., (2006) obtuvo que al añadir 0.5 mg/L de ANA hubo 73 % de enraizamiento y se formaron raíces mayores de 10 mm de longitud. Se observó una mayor formación de tejido callogénico y un pobre desarrollo radicular en aquellos tratamientos cuyos medios nutritivos se encontraban, ya sea ausentes de auxinas o con altos niveles (2 mg/L) de auxina,



Figura 5.4. Formación de raíces en brotes adventicios *in vitro* de *Stevia*.

No existen estudios sobre el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en el enraizamiento *in vitro* de *S. rebaudiana*. Sin embargo, en especies como Gerbera (*Gerbera jamesonii*), Olivera et al. (2000), encontraron que incrementar la concentración de sacarosa de 20 a 40 g L⁻¹ en el medio de cultivo causó un aumento en el número y longitud de las raíces y una reducción en la velocidad de enraizamiento.

Por otro lado, Galiba y Erdei (1986) mencionan que la concentración de sacarosa en el medio de cultivo es de suma importancia, ya que influye, en la formación de cloroplastos y afectan tanto el metabolismo de la planta como las condiciones osmóticas del medio, lo cual puede alterar su desarrollo.

5.5. Aclimatación y establecimiento en el invernadero

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

Aunque la presencia de las raíces afecta positivamente la aclimatación de las microplantas, cuando éstas son muy largas dificultan el trasplante ya que tienden a romperse, lo cual a su vez puede afectar la sobrevivencia de la planta.



Figura 5.5. Aclimatación de plantas de *S. rebaudiana* regeneradas *in vitro*.

Las plantas cultivadas *in vitro* frecuentemente tienen una cutícula poco desarrollada y escasa funcionalidad del aparato estomático que puede permitir una alta tasa de transpiración, lo cual puede ocasionar la muerte por deshidratación. Por lo anterior, es necesario proporcionar las condiciones necesarias que le permitan a las microplantas adaptarse a aquellas que predominan en el invernadero (mayor intensidad lumínica y temperatura, y menor humedad relativa). El proceso de

aclimatación es un proceso gradual que implica la rehabilitación de los estomas, así como su desarrollo, principalmente (Levitus et al. 2010 y Morgado et al. 2000).

Las microplantas de *S. rebaudiana* se transfirieron al invernadero para su aclimatación bajo estas condiciones y se determinó durante 60 días, el porcentaje de sobrevivencia y altura (Figura 5.5). Durante los 10 primeros días de aclimatación, las microplantas presentaron deshidratación y empezaron a mostrar daño en las hojas causado por los rayos del sol los cuales se caracterizaron por el cambio de coloración hacia un verde más oscuro. Dicho daño se redujo considerablemente al colocar, una malla de 90 % de sombra sobre las plantas durante ocho días.

La sobrevivencia durante el periodo de observación en general fue alta, ya que después de 60 días y con un porcentaje de sobrevivencia 81.82 % (Figura 5.6).

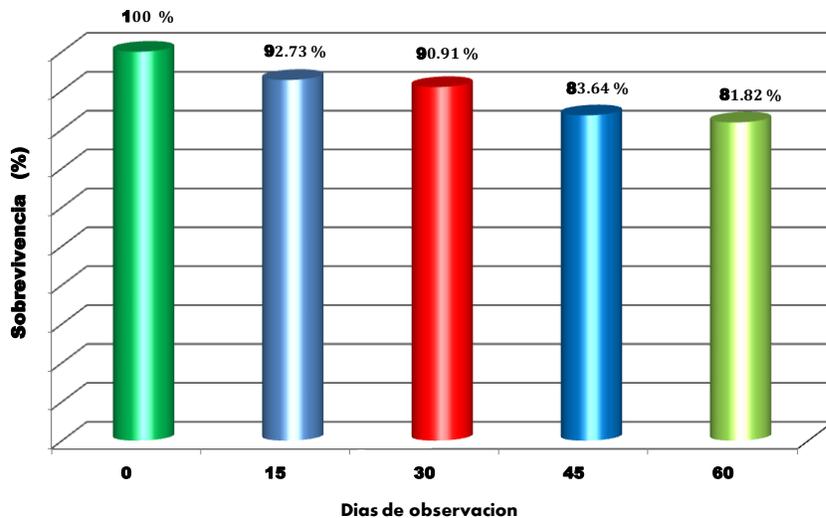


Figura 5.6. Sobrevivencia de las microplantas de *S. rebaudiana* bajo condiciones de invernadero.

Los resultados obtenidos indican que el procedimiento de aclimatación fue favorable para el crecimiento de las microplantas ya que permitió la sobrevivencia de más del 80 % de estas.

Para encontrar los puntos críticos de crecimiento en el proceso de adaptación a invernadero de las plantas durante la etapa de aclimatación, se determinó la

diferencia en la altura de las plantas en intervalos de 15 días. La aplicación de la estadística descriptiva a los resultados permitió observar que el día 0, se establecieron 45 plantas con una altura mínima de 1.5 cm y un máximo de 15 cm, después de 60 días, las plantas mostraban una longitud mínima de altura de 5.6 cm y una máxima de 36.2 cm (Cuadro 5.5.1).

Asimismo, se observó que el 25 % del total de las microplantas establecidas el día 0, tenían una altura de 4 cm, incrementado su altura hasta 17.40 cm a los 60 días establecidas en el invernadero, también se destaca que el 75 % de la microplantas establecidas el día 0, las plantas tenían una altura de 6.50 el cual también incremento su altura a 27 cm a los 60 días (Cuadro 5.5.1).

Cuadro 5.5.1. Estadística descriptiva en la etapa de aclimatación de microplantas de estevia.

Estadística Descriptiva	Altura (cm) Día 0	Altura (cm) Día 15	Altura (cm) Día 30	Altura (cm) Día 45	Altura (cm) Día 60
No. de observaciones	45	45	45	45	45
Mínimo	1.500	3.00	5.00	5.50	5.60
Máximo	15.00	15.50	23.30	28.20	36.20
1° Cuartil	4.00	6.00	10.20	16.50	17.40
Mediana	5.00	7.80	14.50	19.40	23.30
3° Cuartil	6.50	10.50	16.90	24.20	27.00
Media	5.32	8.11	13.69	19.35	21.68
Varianza (n-1)	6.11	10.17	20.61	30.68	40.25
Desviación estándar (n-1)	2.47	3.190	4.540	5.539	6.344

La Figura 5.7, muestra los cambios de altura de las microplantas durante 60 días; se observó que las plantas alcanzaron una altura de 8.11 cm en los primeros 15 días, lo que significa que en este periodo de tiempo éstas crecieron 2.8 cm; mientras que a los 30 días el crecimiento promedio fue de 5.58 cm.

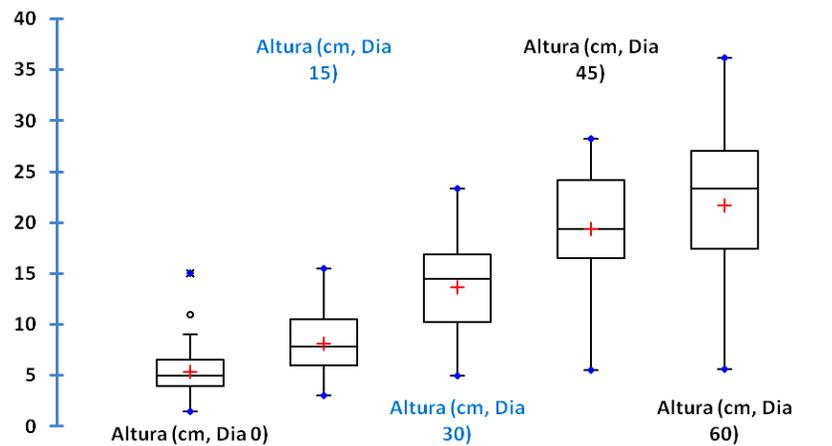


Figura 5.7. Aclimatación y establecimiento de las microplantas de *S. rebaudiana* en el invernadero.

El incremento en longitud de las microplantas de sólo 2.8 cm durante los primeros 15 días, pudo deberse a que durante este periodo de tiempo, las plantas estaban adaptándose a las condiciones del invernadero (alta temperatura e intensidad lumínica y baja humedad relativa); mientras que a los 30 y 45 días, se observa una altura 5.58 y 5.66 cm, respectivamente, lo que podría indicar que para este tiempo las plantas ya habían logrado adaptarse a las condiciones del invernadero.

El periodo de 15 días de aclimatación en *Stevia* concuerda con aclimatación de *Capsicum chinense* de Barrales et al., (2009), y reportaron que el periodo de aclimatación en *C chinense* fue de 15 días, pues después de este tiempo se observó un aumento en los valores de las variables de respuesta evaluadas. Estrada et al., (2001), observaron en chile ancho (*capsicum annum*) valores bajos para el peso de la panta, número de hojas y área de hoja durante los primeros 6 días en el invernadero, pero tres días después, dichos valores incrementaron drásticamente. Asimismo, en *Saccharum spp.* Se observó disminución en el número de hojas y raíces durante la etapa de aclimatación (Rodríguez et al., 2003).

En la Figura 5.8, se muestra la tasa de crecimiento promedio diario por planta durante los 60 días de evaluación. En ella se puede observar que el crecimiento

promedio fue de 0.3 cm entre los 15 y 45 días, mientras que en el intervalo de 45 a 60 días, el incremento en altura fue de 0.16 cm.

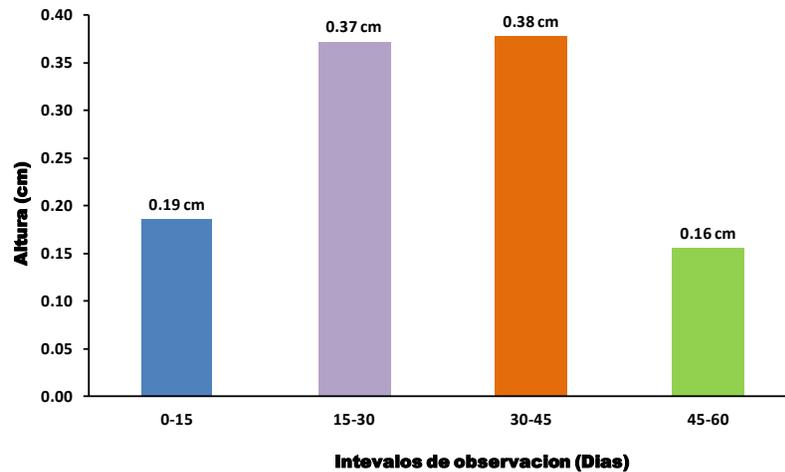


Figura.5.8. Crecimiento promedio diario de las microplantas de *S. rebaudiana* en condiciones de invernadero.

La aclimatación y la sobrevivencia de la microplantas de *S. rebaudiana* se vio favorecida por varios factores como el sustrato, la bolsas de polietileno sobre ellas durante 10 días que mantuvo la humedad relativa alta y la malla sombra que redujo la intensidad lumínica; así como los riegos intermitentes y la fertilización (Figura 5.9).



Figura 5.9. Microplantas de *S. rebaudiana* creciendo en el invernadero bajo malla sombra a los 50 días del trasplante.

Los resultados obtenidos indican que el procedimiento de aclimatación fue favorable para el crecimiento de las microplantas de *Stevia* ya que no sólo permitió la sobrevivencia de más del 80% de estas, sino que lograron llegar a la madurez y a la formación de semillas (Figura 5.10).



Figura 5.10. Flores y semillas de microplantas de *Stevia* después de 6 meses de crecerlas en el invernadero.

Sivaram y Mukundan (2003), reportaron una tasa de supervivencia del 70 % de brotes enraizados de *S. rebaudiana*, mientras que Jin (2006), por su parte obtuvo 98.4 % de supervivencia durante la aclimatación en campo.

De la misma forma, Espinal de Rueda et al. (2006), en el sistema de microtúnel hubo una sobrevivencia de 82.7 y 71.6 % para bolsas plásticas, respectivamente. En el sistema nebulizado se obtuvo una sobrevivencia de 16 y 2.5 % para bolsas plásticas respectivamente durante la aclimatación de microplantas de estevia y la mayor tasa de crecimiento entre la tercera y cuarta semana.

5.10. Análisis cualitativo de los Steviósidos Diterpenicos

Los Steviosidos Diterpenicos se encuentran en diferentes proporciones en las hojas de *Stevia* en una compleja mezcla de glucósidos naturales diterpenicos dulces llamados como steviol-glicósidos o glucósidos de steviol (SGS). El Steviósido se concentra en un 4-13 %, el Rebaudiosido C en 1-2 %, el Rebaudiosido A se concentra

en 2-4 % y Dulcosido A en 0,4-0,7 %, mientras que para el Steviolbiosido, Rebaudiosido B, Rebaudiósido D, Rebaudiósido E solo se encuentran en cantidades de trazas (Melis et al., 2009). El mayor contenido de Steviósido se encuentra en las hojas, lo que sugieren que estas sirven como el tejido principal para la síntesis y acumulación primaria de Steviosidos Diterpenicos (Soejarto et al., 1983 y Melis et al., 2009).

La extracción de los Steviosidos Diterpenicos en agua caliente es la mejor opción para la extracción debido a su mayor solubilidad del Steviósido en agua. Sin embargo, algunos autores recomiendan el uso de disolventes, tales como Etanol, Metanol/Cloroformo, Glicerina, Sorbitol ó Propileno Glicol (Esmat *et al.*, 2010). El método óptimo para la extracción de steviósidos comprende varias etapas entre las más importantes es por extracción acuosa con temperatura, filtración, clarificación, purificación, precipitación, recristalización y secado de steviosido (Bravo, 2009).

Para determinar la presencia o ausencia de glucósidos diterpenicos en planta madre, microplantas aclimatadas en el invernadero y planta de cultivo *in vitro* se utilizaron hojas, también usó callo friable. La extracción y separación de glucósidos diterpenicos se utilizaron diferentes solventes. La extracción se realizó en solución etanolica al 100 % y para la separación de los compuestos se utilizó dos solventes uno de ellos a base de Cloroformo-Metanol (35:15(v/v)) y el otro en Cloroformo-Metanol-Agua ((20:20:5(v/v))).

Los resultados obtenidos por cromatografía en placa fina indicaron que la separación de los compuestos de steviósidos diterpenicos no fue clara y eficiente cuando se utilizó la mezcla de solventes de Cloroformo-Metanol (35:15(v/v)), por lo que se probó Cloroformo-Isopropanol-Acidoacético-Agua (25:25:5:5 (v/v)), la cual permitió una mejor separación de los steviósidos diterpenoides en las diferentes muestras en experimentación, paralelamente se utilizaron algunos compuestos estándares de Steviosido y Rebaudiosido A marca SIGMA. Los compuestos estándares de Steviosido y Rebaudiosido A se manifestaron como bandas de color

violeta en las placas de (TLC) de Sílica gel, al ser reveladas con solución Timol a temperatura de 110 °C (Figura 5.10).

Jaroslav et al., (2007), determinaron que la extracción óptima de los steviósidos se puede realizar con solventes de extracción, agua o metanol, ya que resultan ser parámetros con muy buena reproducibilidad; así mismo, determinaron que la extracción óptima del steviosido ocurre a una temperatura de 110 °C en hojas de *Stevia rebaudiana*, un incremento en la temperatura puede resultar una degradación significativa del steviosido. Kroyer (1999) por su parte, indicó que la degradación de steviosido, ocurre a una temperatura máxima de 80 a 100 grados centígrados (Chang y Coock, 1983).

En el revelado de las Placas de Silica gel (Figura 5.10), se diferenciaron de manera visual la presencia de seis a ocho bandas en los extractos de Planta madre así como en las microplantas aclimatadas en invernadero, y se identificaron el Steviol, Steviosido y Rebaudiosido A, el resto de las bandas separadas pueden corresponder a otros compuestos de la familia de los Steviosidos diterpenicos no identificados en este trabajo de investigación (Figura 5.10a y b, Cuadro 5.10.2.). mientras las plantas cultivadas *in vitro*, así como en los callos, se reconoció el Steviosido como el Rebaudiosido A (Figura 5.10c y d, Cuadro 5.10.2.). Por otra parte, se menciona que el estándar de Steviol fue utilizado pero no se muestra en la Figura 5.10, ya que la banda no se mostró con claridad. Bondarev et al. (2001, 2002) observaron que los glucósidos diterpenicos ó glucósidos de steviol (SGS) están presentes tanto en plantas regeneradas *in vitro*, como en callos y brotes adventicios de *Stevia*, y el contenido de tales compuestos depende principalmente del grado de desarrollo de los brotes.

Se observó también, que en las muestras en experimentación fue posible separar otros compuestos que podrían tratarse de compuestos que pertenecen a la familia de Steviosidos diterpenicos, sin embargo en este trabajo no se realizó la comparación con todos los estándares de steviósidos diterpenicos ya que por el momento no se encuentra identificados y clarificados como estándares además por

limitaciones del presupuesto no se adquirieron, el cual representa una desventaja de la técnica de TLC.

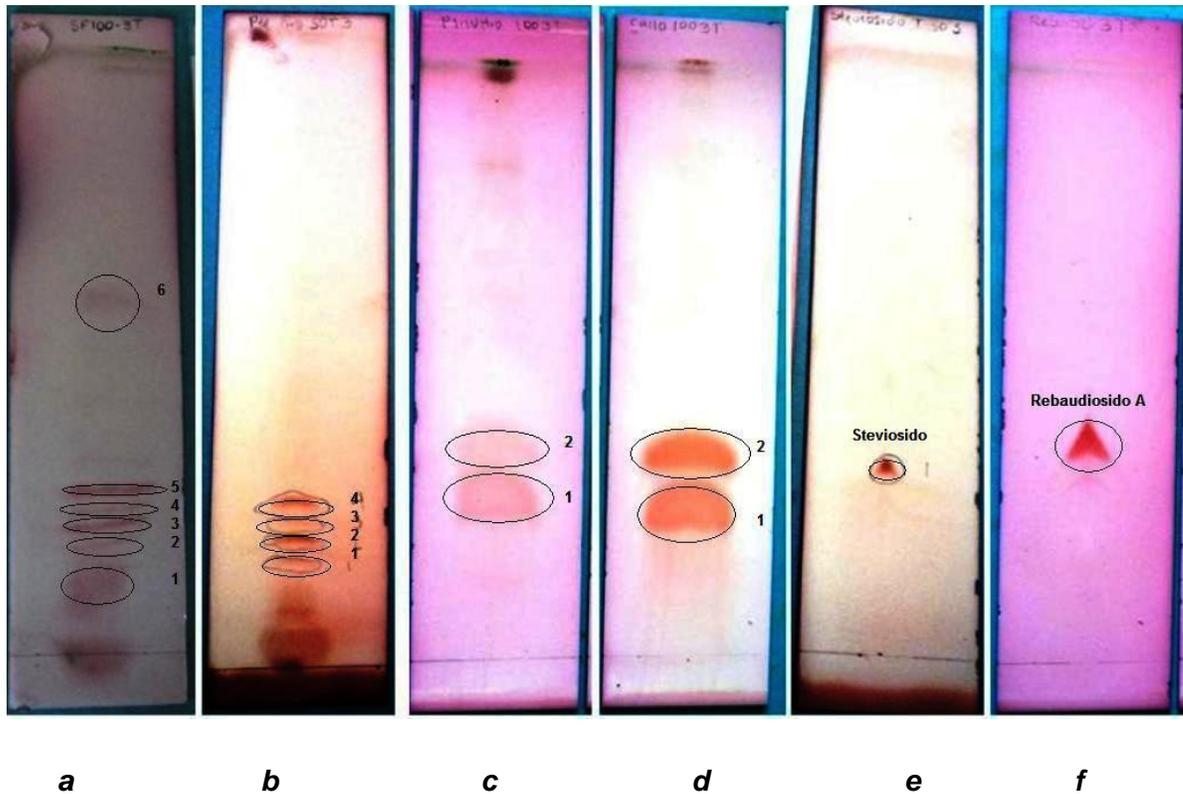


Figura 5.10. Steviósidos Diterpenicos separados por Cromatografía en Placa fina de diferentes tejidos de *Stevia rebaudiana*: a) Planta madre, b) microplanta aclimatada, c) Plantas cultivadas *in vitro*, d) Callo, e) Steviosido (Sigma) y f) Rebaudiosido A (Sigma).

La identificación cualitativa del Steviol, Steviosido y Rebaudiosido A se realizó por comparación de los Rf de los estándares vs los compuestos separados en cada uno de las muestras de *Stevia*. Los resultados mostrados en el cuadro 5.10.1, indicaron que los estándares de Steviosido y Rebaudiosido A tuvieron un Rf de 0.3 y 0.4, respectivamente, mientras que el estándar de Steviol presentó un barrido con un Rf de 0.20 hasta 0.11.

Cuadro 5.10.1. Caracterización de los estándares de Steviósidos diterpenicos

Compuesto estándar (Sigma Aldrich, USA)	Masa molecular [g/mol]	Rf
Steviol	318.45	0.20, 0.11
Steviosido	804.87	0.27
Rebaudiosido A	967.01	0.36

Bravo (2009) por su parte obtuvo que el Steviosido por extracción acuosa y después del proceso de clarificación mostró un Rf con valores de entre 0.63 y 0.67. El valor de Rf de 0.63 con la sexta banda revelada de la muestra de la planta madre de este trabajo.

Cuadro 5.10.2. Comparación de Rf de muestra de Steviósidos Ditepenicos.

Número de Bandas	Planta madre	Rf		
		Planta micropropagada aclimatada	Planta cultivada <i>in vitro</i>	Callo
1	0.12	0.10	---	---
2	0.22	0.16	---	---
3	0.2	0.19	0.26	0.25
4	0.29	0.22	---	---
5	0.31	---	0.36	0.34
6	0.57	---	---	---

Bondarev et al. (2003) informaron que el nivel de glucósidos de diterpenoides (SG) presentes en las hojas de la planta de *Stevia* depende de la edad de la misma y de su fase de desarrollo. El contenido de SG en hojas de plantas jóvenes es superior comparado con algunas plantas que han finalizado su crecimiento. Los extractos de *Stevia* pueden contener un elevado porcentaje de los steviósidos y Rebaudiosido A y cantidades más pequeñas los otros glucósidos de steviol como son; Rebaudiosido C, Dulcósido A, Rubosido, Steviolbiosidos y rebaudiósidos B. La composición química de

los extractos depende del ambiente en el que hayan crecido las plantas (suelo, clima), así como de los procesos de extracción y purificación que se utilicen.

Jiménez et al. (2010), En un análisis de sondeo evaluadas en 2000 plantas de Stevia a campo abierto se determinaron los contenidos de stevioles, y se obtuvo que existe una gran variabilidad para los contenidos de steviosido y Rebaudiosido A en las hojas, encontrándose valores de 0-21 % para steviosido y 0 a 12 % para Rebaudiosido A; Algunos resultados similares han sido reportados por otros autores (Ramesh, 2007; Rodríguez, 2007). También fue posible identificar individuos cuyo contenido de steviosido alcanza valores de 21 % y de Rebaudiosido A de 12 % constituyéndose un material de partida idóneo para la obtención de líneas clonales con elevado contenido de estos glucósidos.

En la actualidad la producción *in vitro* de la planta de Stevia para la extracción de Steviósidos Diterpenicos no ha sido muy estudiada y los resultados obtenidos por diferentes investigadores hasta cierto punto son algo inciertos, por ejemplo, Nabeta et al. (1976). Miyagawa et al. (1984), indicaron que en estudio de cultivo de callo y células en suspensión no aportaron pruebas de la producción de dichos compuestos, sin embargo Lee et al. (1982), si encontraron steviósidos en los callos de Stevia. Hsing et al. (1983), también observaron steviósidos en explantes de hojas después de los 70 días de cultivo. Por su parte, Swanson et al., (1992) no encontró steviósidos en el callos.

Capítulo 6

Conclusiones

- La contaminación de los explantes por bacterias y hongos redujo sustancialmente el potencial de respuesta de los mismos bajo condiciones de cultivo *in vitro*.
- La oxidación de los callos formados a partir de tejidos de hoja limitó el establecimiento de las células cultivadas en medios líquidos.
- El protocolo de regeneración desarrollado en la presente investigación permitió obtener plantas de *Stevia rebaudiana* B., a partir de segmentos nodales, las cuales se establecieron con éxito en condiciones de invernadero
- La cinetina (1.3 mg L^{-1}) en el medio MS indujo el mayor número de brotes por explante.
- Las condiciones de aclimatación permitió la sobrevivencia de más de 80 % de las microplantas a las condiciones de invernadero.
- Por cromatografía en capa fina, los extractos de Planta madre y Planta microplantas aclimatadas, se identificaron el Steviol, Steviósido y Rebaudiósido A
- Por cromatografía en capa fina los extractos de plantas cultivadas *in vitro*, así como en los callos se identificaron Steviósido y Rebaudiósido A.

Capítulo 7

Referencias Bibliográficas

- (Ciat) Centro Internacional de Agriculturatropical. 1991. Cultivo De Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (eds.). Cali, Colombia. 970p.
- Abdelwahd, R., Hakam N., Labhilili M., UduPa S. 2008. Use of an ansorbent and antioxidantes to reduce the efeccts of leached phenolics in *in vitro* plantled regeneration oh *faba* bean. African journal of biotechnology 7:997-1002
- Ahmed M. B., Salahin R. M., Karim M. A., Razvy M. M., Hannan R., Sultana M., Hossain and Islam R., 2007. An Efficient Method for *in vitro* Clonal Propagation of a Newly Introduced Sweetener Plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Bangladesh. American-Eurasian J. Sci. Res. 2(2):121-125.
- Álvarez-García R., Torres-Valencia J., Román L., Hernández J., Cerda-García-Rojas C. y Joseph-Nathan P. 2005. Absolute Configuration of the a-methylbutyryl residue in longipinene derivatives from *Stevia pilosa*. Phytochem. 66, 639-642.
- Anbzhagan M., Kalpana M., Rajendran R., Natarajan V., and Dhanavel D. 2010. *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Emir. J. Food Agric. 2010. 22 (3): 216-222.
- Arpita Das, Saikat Gantait and Nirmal Mandal, 2011. Micropropagation of an Elite Medicinal Plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Agricultural Research*, 6: 40-48.
- Barathi N., 2002. Stevia, A way to sweeten life. En "The Hindu". Fecha:19.09.02. Citado:08-02-08. Growmore Biotech Ltd. Disponible en: <http://www.growmorebiotech.com/article1>.

- Barba A. 1988. Reguladores del crecimiento vegetal. In: Cultivo de Tejidos Vegetales. D. V. . Ed. Trillas. México. pp.48-66.
- Barrales Lopez A. Trejo L. C. y Rodriguez de la O. J. 2009. Luz. Sacarosa, nutrimentos y recipientes en el enraizamiento in vitro y aclimatación de *capsicum chinense* JACQ. Postgrado Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal, Colegio de Posgraduados, Km. 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Bespalhok F. J. C., and Hattori K., 1997. Embryogenic Callus Formation and Histological Studies from *Stevia Rebaudiana* (Bert.) Bertoni Floret Explants. Department of Genetic and Plant Breeding, School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa ku, Nagoya, Japan 464-01
- Bespalhok J. C., Hashimoto J. M., et al. 1993. Induction of somatic embryogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana*. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. 1993, 5(1): 51-53.
- Bespalhok J. C., Vieira L. G. E., et al. 1992. Fatores influenciando a micropropagação *in vitro* de gemas axilares de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal., 4(1): 59-61.
- Blanco M., Valverde R., Gómez L. 2003. Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. Agronomía Costarricense 27(1): 19-28. 2003
- Bondarev N. I., Reshetnyak O.V., Nosov A.M. 2001. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni, Plant Sci. 161 (2001) 155Á/163.
- Bondarev N. I., Sukhanova M.A., Reshetnyak O.V., Nosov A.M. 2003. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* Bertoni and its dynamics during ontogenesis. Biol. Plant. 47: 261-264, 2003/4.

- Bondarev N.I., Reshetnyak O.V., Nosov A.M. 2002. Features of development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycoside, *Planta Med.* 68 (2002) 757-759.
- Brandle J., Richman A., Swanson A., Chapman B. 2002. Leaf from *Stevia rebaudiana*: A Resource for Gene Discovery in Diterpene Synthesis. *Plant Mol Biol.* 2002;50: 613-22.
- Brandle, J. E. and Rosa, N. 1992. Heritability for yield, leaf:stem ratio and stevioside content estimated from landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Can. J. Plant Sci.* 72: 1263-1266.
- Brandle, J. E., Starratt A. N., y Gijzen M. 2000. *Stevia rebaudiana*: its biological, chemical and agricultural properties. Consulta: Junio 2000: http://res2.agr.ca/london/pmrc/faq/stevia_rev.html.
- Brandle, J. E., y Telmer P. G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68, 855-863.
- Bravo M. M., Ale N. B., Huamán J. M., Delmás D. R., Rodríguez M. B., Polo M. S., Bautista M. C. 2009. Caracterización química de *Stevia rebaudiana*. *Rev. Per. Quim.. Ing Quim.* Vol.12 No. 2, pag. 5-8.
- Buchanan B., Gruissem W. y Jones R. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants.* American Society of Plant Physiologists, Waldorf, MD.
- Cassacia J. y Álvarez E. 2006. Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del ka'a he'e (*Stevia rebaudiana* (Bertoni)) en el Paraguay. Ministerio de Agricultura y Ganadería-Paraguay, Manual Técnico N°8, 51 p.
- Castillo Verónica 2011. Conferencia. *Stevia rebaudiana*: Edulcorante saludable.
- Ceiba R. N., Dinie E. R., Wilma D., Esteban C. 2006. Propagación in Vitro de *Stevia rebaudiana* B. a Partir de Segmentos Nodales. Escuela Agrícola

Panamericana, P.O. Box 93, Tegucigalpa, Honduras. drueda@zamorano.edu.
Volumen 47(1-2):11-18

Chang S. S., Cook J. M. 1983. J Agric Food Chem 31: 409-412

Chawla H. S., 2002. Introduction to plant biotechnology. Science Publishers Inc., USA.
pp. 189–201.

Curi R., Alvarez M., Bazotte R. B., Botion L. M., Godoy J. L., & Bracht A. 1986. Effect
of *Stevia rebaudiana* on glucose tolerance in normal adult humans. Braz J Med
Biol Res 19(6), 771–774.

Das, K., R. Dang, T.N. Shivananda y N. Sekeroglu. 2007. Influence of biofertilizer on
the biomass yield and nutrient content in *Stevia (Stevia rebaudiana, Bert)* grown
in Indian subtropics. Journal of Medicinal Plants Research. 01(01), 005-008.

De Vargas, R. 1980. Informe sobre viaje al Japón para observar la producción,
comercialización e industrialización de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni.
Asunción

Devlin, R. M. y Witham F. H. 1983. Plant Physiology. 4th. Ed. PWS Publishers.
Boston, Massachusetts. U.S.A. 577 p.

Dimassi-Theriou, K., Bosabalidis A., 1997. Effects of light, magnesium and sucrose on
leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation in kiwifruit
culture in vitro. Plan Cell Tissue and Organ Culture. 47(2):127-134.

Dodds, J. H. and Roberts L.W. 1985. Somatic embryogenesis In: Experiments in Plant
Tissue Culture. J. H. Dodds and L.W. Roberts (eds.). Second Edition.
Cambridge University Press. New York, EE.UU. pp. 122-126.

Eafit, Escuela de Administración y Finanzas. 2004. Inteligencia de mercados inter-
nacionales de *S. rebaudiana*. Departamento de Negocios Internacionales,
Medellín, Colombia.

- Esmat Abou-Arab A., Azza Abou-Arab A. and Ferial Abu-Salem M. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana bertonii* plant. African Journal of Food Science Vol. 4(5) pp. 269-281, May 2010.
- Espinal de Rueda D., Del valle W., Cifuentes E., Ramia N. E. 2006. Propagación in Vitro de *Stevia rebaudiana* B. a Partir de Segmentos Nodales. Ceiba, 2006. Volumen 47(1-2):11-18
- Estrada-luna A. A. F. T. Davies Jr., and J.N. Egilla. 2001. Physiological changes and growth of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization and post-acclimatization. Plan cell, Tissue and Organ Culture 66:17-24.
- Felippe, G.M. 1971. *Stevia rebaudiana* Bert.: uma revisao. Ciencia e Cultura 29 (11) 1240-1248. II Seminario Brasileiro sobre *Stevia rebaudiana* (Bert.).Bertoni Resumos ITAL Campinas 9/82. Instituto de Tecnología de Alimentos, Sao Paulo.
- Ferreira C. & Handro W. 1988. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* through leaf explants from adult plants. Plant medic 54(2): 157-160.
- Ferreira C. M. and Handro W. 1987. Some morphogenetic responses of leaf explants of *Stevia rebaudiana* cultured *in vitro*. Revista Brasileira de Botanica, 10:113-116.
- Ferreira C. M. and Handro W. 1988. Production, maintenance and plant regeneration from cell Suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Plant Cell Reports 7: 123-126.
- Ferreira, C. M. y Handro, W, 1987. Micropropagacion of *Stevia rebaudiana* Through Leaf Explants from Adults Plants. Intitute of Biosciencias. University of Sao Paulo Brazil. P. 157-160.

- Flachsland E, Mroginski L, et al. 1966. Regeneration of plants from anthers of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Compositae) cultivated *in vitro*. *Biocell*, 20: 87-90.
- Franz P. F., & Schel J. H. N. 1991. Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of Maize (*Zea mays*). *Canadian Journal of Botany* 69: 26-33, 1991.
- Fronz D., Folegatti M.V., 2003. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. *Scientia Agricola*, 60 (3):8.
- Galiba, G. and Erdei L. 1986. Dependence of wheat callus growth, differentiation and mineral content on carbohydrate supply. *Plant. Sci* 45: 65 - 70.
- Gamborg O. L., Murashige T., Thorpe T. A. & Vasil I. K. 1976. Plant Tissue Culture Media. *In Vitro* 12:473-478
- Gardana C., Scaglianti M. y Simonetti P. 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217(9),1463-70.
- Gattoni L. A. 1945. Caa-Jhee A wild shrub native to Paraguay (*Stevia rebaudiana* Bert.) September. Typed Material. STICA, Paraguay.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture Part 1: The Technology. 2ed. England. Exegetics Ltda. 574 p.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture, Part 1: The technology. Ed.2. Exegetics Limited. Edington, Wilts, England, pp. 21–33.
- Geuns J. M. C. 2003. Molecules of interest stevioside. *Phytochemistry*. 6. 913-921.
- Geuns, J. M. 2003. Stevioside. *Phytochemistry*. 64, 913-921.

- Grashoff, J. L. 1972. A systematic a study of the North Central and Souter, American.Specias of Stevia PhD dibbertartion.University of Texas.Austin 609 pp
- Guenther A., P. Zimmerman y Wildermuth M. 1994. Natural Volatile Organic-Compound Emission Rate Estimates for U.S. Woodland Landscapes.Atmospheric Environment. 28(6), 1197-1210.
- Guevara-García A, San Román C, Arroyo A, Cortes M, De La Luz Gutiérrez- Nava M, León P. Characterization of the Arabidopsis clb6 Mutant Illustrates the Importance ofPosttranscriptional Regulation of the Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway. Plant Cell. 2005;17(2):628-643.
- Hanson J. R., De Oliveira B. H. 1993. Stevioside and related sweetditerpenoid glycosides. Natural Products Reports 10, 301–309.
- Hartmann H. and Kester D. 1998. Propagación de las plantas. 6ta. Ed. C.E.C.S.A., México. 700p.
- Hartmann H. y Kester D. 1987. Propagación de plantas: principios y prácticas. Ed. CECSA, México. 760 pp.
- Hernández, L.R., Catalán, C.A.N., Joseph-Nathan P. 1998. The Chemistry of the Genus Stevia (Asteraceae). Rev. Acad. Colomb. Cieñe. Ex. Fís. Nat. 1998, 22, 229-279.
- Hossain M. A., Shamim Kabir A. H. M., Jahan T. A. And Hasan M. N., 2008. Micropopagation of Stevia. Int. J. Sustain. Crop Prod. 3(4):1-9 (June 2008)
- Hsieh M.. y Goodman H. 2005. The Arabidopsis lspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. Plant Phys. 138(2), 641- 653.

- Hsing Y.O., Su W. F. and Chang W. C., 1983. Accumulation of Stevioside and Rebaudioside A in callus culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Botanical Bulletin of the Academia Sinica 24, 115–119. [Chemical Abstracts (1983) 99, 172877b].
- Hurtado M., Merino M. M. E., 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas. Mexico.
- Jarma A., 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. Rev Colomb Cienc Hortic. 2008;2(1):109-120.
- Jarma Orozco y Alfredo de Jesús. 2010. Adaptación de dos clones de Estevia (*Stevia rebaudiana* bert.) en tres ambientes del Caribe colombiano / Adaptation of two clones of Stevia (*Stevia rebaudiana* bert.) in three Colombian Caribbean environments. Doctorado Tesis, Universidad Nacional de Colombia.
- Jaroslav P., Vardova E. O., Karasek P., Roth M., Benesova K., Kotlarokova P., Caslavsky J., 2007. Anal Bional Chem 388; 1847-1857 DOI 10.1007/s00216-007-1404-y
- Jeppesen P. B., Gregersen S., Poulsen C. R., & Hermansen K. 2000. Stevioside acts directly on pancreatic β cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K^+ -channel activity. Metabolism 49(2), 208–214
- Jiménez T., Cabrera G., Álvarez E., Gómez F., 2010. Evaluación del contenido de esteviósido y rebaudiósido A en una población de *Stevia rebaudiana* Bertoni (kaâ heê) cultivada comercialmente. Estudio preliminar. Instituto Nacional de Tecnología y Normalización (INTN). Asunción-Paraguay e Instituto Agronómico Nacional (IAN). Caacupé Paraguay. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, Vol. 8(1) Junio 2010: 47-53
- Jin h. s., 2006. Rapid propagation *in vitro* and enhanced stevioside accumulation in *stevia rebaudiana* bert., *journal of plant biology.*, vol. 49, no.4, Pag. 267-270

- Jordán Molero Francisco. 1983. La propagación de ka'á he'e, *Stevia rebaudiana* Bertoni. Primer Simposio Nacional de la Stevia (ka'á he'e) Julio 1983, Asunción, Paraguay, 29 p.
- Kasahara H, Hanada A, Kuzuyama T, Takagi M, Kamiya Y, Yamaguchi S. 2002. Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Gibberellins in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*. 2002;277(47):45188-45194.
- Kim, K., Y. Sawa y H. Shibata. 1996. Hydroxylation of ent-Kaurenoic acid to steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni - purification and partial characterization of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys*. 332(2), 223-230.
- Krikorian, A. D. 1991a. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 41-78. Krikorian, A.D. 1991b. Propagación clonal.
- Kroyer G. T. 1999. *Lebensm-Wiss Technol* 32:509-512
- Landázuri A. P. A., Tigreiro. S. J. O. 2009. *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias. boletín técnico edición especial. Sangolquí – Ecuador.
- Lee J.I., Park J.R., Choi B.S., Han J.S., Oh Sang L., Yamada Y. 1982. Studies on the callus culture of stevia as a new sweetening source and formation of stevioside, *Hanguk Sikp'um Kwahakhoe Chi Korean* 14 (1982) 179–183.
- Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mroginski A. 2010. *Biología y Mejoramiento Vegetal II Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información el Desarrollo de la Biología*. Argentina.

- Lyakhovkin A.G., Tran D.L, Titov D.A y Mai P.A., 1993. Cultivation and utilization of Stevia. Agricultural Publishing House (Vietnam). p 5-43.
- Machacuay C. S., 2007. Elaboración y caracterización de una bebida nutraceutica a base de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), Facultad De Ingeniería Y Ciencias Humanas. Escuela Académica Profesional De Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional Del Centro Del Perú.
- Manitto P. 1981. Biosynthesis of Natural Products; Wiley: New York, 1981; Cap. 1-8.
- Marín W. 2004. Sondeo de mercado de la Estevia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá Colombia.
- Martínez R. R., 1997. Organogénesis y embriogénesis somática *in vitro* en Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) (Un árbol de uso múltiple), UACH, México. 103p.
- Matsui M., Matsui K., Kawasaki Y., Oda Y., Noguchi T., Kitagawa Y., Sawada M., Hayashi M., Nohmi T., Yoshihira K., Ishidate M., Sofuni T. 1996. Evaluation of the genotoxicity of steviosido and steviol using six *in vitro* and one in vivo mutagenicity assays, *Mutagenesis* 11 (1996) 573Á/579.
- Mejia Anaya, R. & C. Vittorelli, 1988. Cultivo In Vitro de Plantas de Papa. Manual de Laboratorio . INIAA. Instituto Nacional de Investigacion Agricola y Agroindustrial, Peru, 111 pp.
- Melis MS, Rocha ST, Augusto A. Steviol effect, a glycoside of *Stevia rebaudiana*, on glucose clearances in rats. *Braz J Biol* 2009; 69(2): 371-4.
- Metivier J., and Viana A.M. 1979. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble protiens, sugars and stevioside in leaves of *stevia rebaudiana*. *Journal of Experimental Botany*, 1979. 30(119): p. 1211-1222.

- Mitra A., and Pal A., 2007. In vitro regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert) from the Nodal Explant. *J. Plant Biochemistry & Biotechnology* Vol. 16(1), 59-62, January 2007.
- Miyagawa H., Fujita Y., et al., 1984. Studies on tissue culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni and its components. *Shoyakugaku Zashi*, 38: 12-18.
- Miyagawa H., Fujita Y., Fujioka N., Kohda H., Yamasaki K. 1984. Studies on the tissue culture of *Stevia rebaudiana* and its components, *Shoyakugaku Zasshi*. 38 (1984)12–18.
- Molinas, S., 1989. Fortuna *Stevia* del Paraguay S.R.L.: Promoción cultivo industrialización y comercialización de la *Stevia rebaudiana* Bertoni (ka'a he'e). Asunción, Paraguay. 24 p.
- Monteiro R. 1982. Estudos cromosômicos em *Stevia rebaudiana* Serie Multiaristatae no Brasil. *Rev. Bras. Bot.* 5:5Á15.[English abstract.]
- Morgado I. F., Carneiro J., Leles P., Barroso D., 2000. Resíduos agroindustriais prensados como substrato para a produção de mudas de cana-de-açúcar *Sci. Agric.* vol.57 (4). Piracicaba.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497
- Nabeta K., Kasai T. Sugisawa H., Phytosterol from the callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Agric. Biol. Chem.*40 (1976) 2103–2104.
- Natali L., Sánchez C. y Cavallini A. 1990. 1996. In vitro culture of *Aloe Babadensis* Mill. meristems. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 20: 71-74.
- Nepovim A., Drahosova H., Valicek P. y Vanek T. 1998. The effect of cultivation conditions on the content of stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni plants cultivated in the Czech Republic. *Pharmaceut Pharmacol Lett.* 8, 19-21.

- Oliveira V. Z. O. 1998. Cultivo *in vitro* de gerbera y su aclimatación en invernadero. Tesis de Maestría en Ciencias de fruticultura. Colegio de Posgraduados. México.
- Olivera-Ortega V. Gutiérrez-Espinosa M., Gutiérrez-Espinosa J. Andrade-Rodríguez M. 2000. Cultivo *in vitro* de Gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. Bioagro 12(3): 75-80. 2000
- Oriza C., Zarate S., Buendía L., Orozco J., Lechuga J. A. 2005. Establecimiento de Cultivos de Callo de *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) Hemsl. A partir de Explantes Foliares. Dpto. de Biotecnología, UAM-Iztapalapa San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina 09340 México, D.F.
- Orozco C. C., 2004. Situación actual de la biotecnología en Guatemala. Consejo nacional de Áreas Protegidas –CONAP. Guatemala.
- Orozco Carlos. 2004. Situación actual de la Biotecnología en Guatemala. Consejo Nacional de Áreas Protegidas. Guatemala. 86 p. Primera edición.
- Patil V, Ashwini K. S., et al. 1996. *In vitro* multiplication of *Stevia rebaudiana*. Curr. Sci., 70(11): 960.
- Pezzuto J. M., Compadre C. M., Swanson S. M., Nanayakkara N. P. D., Kinghorn A. D., 1985. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 82, 2478–2482.
- Pierik R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Trad. Por Luis Ayerbe Mateo-Sagasta. 3 ed. Madrid, España, Mundi-Prensa. 325p.
- Pierik, R. L. M. 1987. In vitro culture of higher plants. Martin Nijhoff Publishers, Boston.
- Ramesh K., Singh V., Paramvir S. A. 2007. Production potential of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Under intercropping systems Division of Natural Plant Products,

- Institute of Himalayan Bioresource Technology, Palampur. Archives of Agronomy and Soil Science 2007; 53(4): 443–58.
- Ramesh K., Singh V., y Megeji N. W. 2006. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (bert.) Bertoni]: A comprehensive review. En: Advances in Agronomy Vol. 89. 360 p. Academic Press. San Diego, California–USA.
- Ramos V. 2007. Análisis Ultraestructural en Células Desdiferenciadas de Cempaxúchil (*Tagetes erecta*). Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
- Richman A. S., Gijzen M., Starratt A. N., Yang Z., Brandle J. E., 1999. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *Plant J.* 19, 411–421.
- Rodriguez C., Posser C.A., De Lucas G.R. & Fachinello J.C., Baptista J. 2003. Estabelecimento e multiplicacao *in vitro* de *Prunus sp.* em diferentes meios de cultivo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(1):131-133.
- Rodríguez G. H., Acosta de la Luz LL., Hechevarría S. I., Rivera A. M. M, Rodríguez Ferradá C. A., Sánchez G. E. 2007. Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni en Cuba. *Rev. Cubana Plant Med* [revista en la Internet]. 2007 Dic (citado 2009 Dic 09);
- Sakaguchi, Mixue e Tatsuiko Kan. 1982. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni e o esteviosídeo. *Ciencia e Cultura* 34(2) Fevereiro de 1982. 235- 248.
- Salisbury F. B. Ross C. W. 1992: *Plant physiology*. Wadsworth Publishing Company, Inc. Belmont
- Santalla M. J., Power J. B., Davey M. R. 1998. Efficient *in vitro* shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica* 102: 195-202.

- Segura J. 1993. Morfogénesis *in vitro*. In: Fisiología y Bioquímica Vegetal. J. Azcón-Bieto y M. Talón (eds.). Ed. Interamericana. Mc Graw-Hill. pp 381-392.
- Shock C. C., 1982. Rebaudi's stevia: natural noncaloric sweeteners. California Agriculture, 1982. 36(9): p. 4-5.
- 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(4): 294-299.
- Sivaram L. and Mukundan U. 2002. Feasibility of commercial micropropagation of *Stevia rebaudiana* in India. J. Trop. Med. Plants., 3: 97-103.
- Sivaram L., Mukundan U. 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. In Vitro Cell. Dev. Biol. 39 (5):520-523.
- Skirvin R. M., Chu, M. C. and Kearnes H. 1981. *In vitro* proliferation and rooting of 'Harboite' and 'Monmorency' sour cherry. Hort Science 16:459-460 (Abstr. 445).
- Soejarto D. D., Kinghorn A. D., Farnsworth N. R., 1982. Potential sweeten in gagents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf herbarium samples for sweetness. Journal of Natural Products 45, 590–599.
- Soejarto DD, Compadre CM, MedonPJ, Kamath SK, Kinghorn, AD. Potential Sweetening Agents of Plant Origin, II. Field Search for Sweet-Tasting *Stevia* Species; Economic Botany 1983;37: 71-9.
- Suárez E. I., Salgado A. J. 2008. Propagación *In Vitro* de *Stevia rebaudiana* Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis. Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería Agronómica. Carrera 6 No. 76-103. TEMAS AGRARIOS - Vol. 13:(1) Enero-Junio 2008 (40 –48)
- Suga T. y Endo T. 1991. Geranyl diphosphate synthase in leaves of *Pelargonium roseus*. Phytochem. 30(6), 1757-1761.

- Sumida T. 1980. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a new possible crop for sweetening resource in Japan. J. Cent. Agric. Exp. Sta. 31, 1-71.
- Swanson S. M., Mahady G. B., Beecher C.W. 1992. "Stevioside biosynthesis by callus, root, shoot and rooted-shoot cultures in vitro". Plant Cell Tissue Organ Cult. Vol. 28, pp. 151–157.
- Tabiyed D. Bernard F. Stacker H. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA, effects on brown ing in *pistacia vera* shoot tips culture. Acta Horticulturae 726:201-204
- Taiariol D. 1995. Propagación vegetativa de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Tamura Y. Nakamura S. et al. 1998. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. Plant Cell Reports, 3: 183-185.
- Tamura Y. Nakamura S. Fukui H. Tabata M. 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by Stem-tips culture. Plant cell reports. Japón. 3:183-185 p.
- Taware A. S., Mukadam D. S., Chavan A. M., Taware S D. 2010. Comparative studies of in vitro and in vivo grown plants and callus of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). International Journal of Integrative Biology. IJIB, 2010, Vol. 9, No. 1,10.
- Teixeira P. D., Lima A., Ducroquet J. P. H. J. & Guerra M.P. 2004. Multiplicacao in vitro do porta-enxerto de *Prunus* spp. "Carelli". Revista Brasileira de Fruticultura, 26(2):377-379.
- Tisserat B. 1985. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. En: Ixon, R. (Ed). Plant Cell Culture, A Practical Approach. IRL Press, Oxford, p79-105
- Umiel N., Goldner R. 1976. Protoplasma. 89:83-94.

- Valencia R., Pitman N., Leon-Yáñez S. Y Jorgensen P.M. 2000. Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador. Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Van Staden J., Fennell C., Taylor N. 2006. Plant stress in vitro: the role of phytohormones. *Acta horticulturae* 725:55-62
- Vasser J., Dubois J., Hilbert J. L., Couillerot J. P.,1995. Somatic embryogenesis in Cichory (*Cichorium Species*). BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, Berlin, Springer-Verlag, 1995, p.125-137.
- Vergara C., Jarma A., Polo J. y Pastrana L. 2003. Crecimiento y desarrollo de dos variedades de *Stevia rebaudiana* en tres tipos de suelo del Medio Sinú. p.68. En: Memorias XXXIII Congreso Anual de Comalfi. Montería, Colombia.
- Villanueva G.E., Giménez T.A., Quezada P.J. Pascual C.J. y Murillo G.J. 2005. Establecimiento de células en suspensión *Stevia rebaudiana* Bertoni. Facultad de agronomía Universidad Mayor de San Andrés.
- Villegas Monter A. 1990. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. C.H. Rossell y V. M. Villalobos (ed.). FAO. No.105. pp :21-27.
- Villegas Monter, A. 2006. Apuntes del curso de Propagación in vitro de frutales, Fruticultura. Recursos Genéticos y Productividad - Montecillo., CP. 30 P.
- Wada Y., Tamura Y., et al., 1981. Callus cultures and morphogenesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Yukagaku*, 30: 215-219.
- Xili L., Chengjiany B., Eryi X., Reiming S., Yuengming W., Haodong S., Zhiyian H., 1992. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. *Food and Chemical Toxicology* 30, 957–965.
- Yamazaki T., Flores H. E. 1991. Examination of steviol glycoside production by hair root and shoot cultures of *Stevia rebaudiana*, *J. Nat. Prod* 54.986-992.

Yang Y. W. and Chang C. W. 1979. *In vitro* plant regeneration from leaf explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Z. Pflanzenphysiologie, 93: 337-343.