

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADO

ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE *Stevia rebaudiana* B. A PARTIR DE ÁPICES
MERISTEMÁTICOS, UTILIZANDO MEDIO NUTRITIVO A DIFERENTES
COMBINACIONES DE 6-BENCILAMINOPURINA (6-BAP) Y ÁCIDO
NAFTALENACÉTICO (ANA)

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTADO POR
ELOÍSA LISSETTE SANDOVAL GUTIÉRREZ

DOCENTES ASESORES
MAESTRO RICARDO FIGUEROA CERNA
LICENCIADA E INGENIERA NELLY RUTH GUERRERO DE MENÉNDEZ

MAYO, 2019

SANTA ANA, EL SALVADOR, CENTROAMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

AUTORIDADES



M.Sc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

RECTOR

DR. MANUEL DE JESÚS JOYA ÁBREGO

VICERRECTOR ACADÉMICO

ING. NELSON BERNABÉ GRANADOS ALVARADO

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

LICDO. CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

SECRETARIO GENERAL

M.Sc. CLAUDIA MARÍA MELGAR DE ZAMBRANA
DEFENSORA DE LOS DERECHOS UNIVERSITARIOS

LICDO. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARIN

FISCAL GENERAL

FACULTAD MULTIDICPLINARIA DE OCCIDENTE

AUTORIDADES



DR. RAÚL ERNESTO AZCÚNAGA LÓPEZ

DECANO

M. Ed. ROBERTO CARLOS SIGÜENZA CAMPOS

VICEDECANO

M.S.c. DAVID ALFONSO MATA ALDANA

SECRETARIO

LICDO. CARLOS MAURICIO LINARES HERNÁNDEZ

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

DEDICATORIA

A mis padres **Jorge Alberto Sandoval Macal y Sandra Lizet Gutiérrez Salguero** por su apoyo emocional y económico durante toda mi formación profesional, por sus consejos, su amor y su guía; les dedico mi tesis de grado que representa la culminación de una de mis metas alcanzadas.

A mi hermanita **Katherinne Elizabeth Sandoval Gutiérrez** por su apoyo, cariño y atención durante la culminación de mis estudios

A mi abuelita **Fidelina Salguero Cerna** por su incondicional apoyo, amor e interés en mi formación académica durante toda mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi **Padre Celestial** por ser la guía en mi vida, por abrirme las puertas adecuadas para la realización de mi investigación, puesto que sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible.

A mis docentes asesores **M.Sc. Ricardo Figueroa Cerna e Ing. Nelly Ruth Guerrero** por su guía y enseñanza, por aportar sus conocimientos y ayudarme de buena voluntad en la realización de esta investigación.

A los técnicos del Departamento de biotecnología **Ing. Claudia Isabel Morales, Yuri Beatriz Mercado, Blanca Elizabeth Sorto, Elmer Antonio Alvarenga y José Eduardo Mendoza** por compartir sus conocimientos, por su ayuda y aprecio en cada proceso de la investigación.

Al Ing. Luis Felipe Barahona por aportarme sus conocimientos y darme de su tiempo en la realización de esta investigación.

Al Ing. Jaime Ayala Jefe del departamento de Socioeconómica y Biometría de CENTA por brindarme su orientación y respaldo.

A mi mejor amiga y compañera **María de los Ángeles Acosta Valladares** por su apoyo constante desde el inicio hasta la culminación de la investigación, al compartir su conocimiento y sus consejos que nunca me faltaron, así como su sincera amistad.

A todos **mis compañeros de Lic. En Biología** por su apoyo y amistad durante toda la carrera.

A la **Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñonez” (ENA)** por brindarme sus instalaciones y recursos necesarios para el desarrollo de esta investigación.

A todo **el personal docente** del Departamento de Biología por formarme como profesional durante toda la carrera y brindarme sus conocimientos.

Resumen

Stevia rebaudiana B. es una planta herbácea originaria de Paraguay, contiene un edulcorante natural bajo en calorías, esta planta aporta una contribución significativa a la vida humana, puesto que ofrece una solución para las personas con diabetes y obesidad, al ser sustituida por la azúcar de caña. La propagación de esta especie es principalmente por esquejes; pero con este método de reproducción se obtiene bajo número de individuos por planta, otra forma es por semillas, esto implica recombinación genética y la tasa de germinación es muy baja o nula para considerarse efectiva para el cultivo. Se formuló un protocolo de establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de ápices meristemáticos, utilizando medio nutritivo a diferentes combinaciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido naftalenacético (ANA), para ello se midieron las variables formación de brotes, tamaño de los brotes y período de brotación, se utilizaron las sales de Murashige y Skoog suplementadas con las dosis de fitorreguladores T1: 0.20 mg/l 6-BAP + 0.025 mg/l ANA, T2: 0.40 mg/l 6-BAP + 0.050 mg/l ANA, y T3 sin fitorreguladores, se obtuvo diferencia estadísticamente significativa en la variable formación de brotes destacándose el Tratamiento 1 con el mayor número de brotes, para la variable tamaño de los brotes no hubo diferencia estadísticamente significativa puesto que los 3 tratamientos presentaron promedios de longitudes similares, se determinó al Tratamiento 1 como el mejor tratamiento para el protocolo del establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. ya que presento mayor número de brotes y no existió deformación de los mismos.

Índice

	Página
1. Introducción.....	xii
2. Revisión de la literatura.....	13
2.1 Origen y distribución.....	13
2.2 Clasificación taxonómica de la especie.....	13
2.3 Botánica de la especie.....	14
2.3.1 Raíz.....	14
2.3.2 Tallo.....	14
2.3.3 Hoja.....	15
2.3.4 Inflorescencia.....	15
2.3.5 Fruto y semilla.....	16
2.3.6 Contenido dulce de glucósido en partes de la planta.....	16
2.4 Plagas y enfermedades.....	17
2.5 Importancia de la “stevia”.....	20
2.5.1 Medicinal.....	20
2.5.2 Medioambiental.....	20
2.5.3 Económica.....	20
2.6 Cultivo de “stevia” en El Salvador.....	21
2.6.1 Características agronómicas del cultivo de “stevia”.....	21
2.7 Propagación de la especie.....	23
2.7.1 Propagación sexual.....	23
2.7.2 Propagación asexual.....	23
2.8 Cultivo de tejidos vegetales.....	24
2.8.1 Fines del cultivo de tejidos vegetales.....	24

2.8.2 Factores físicos que influyen en el cultivo de tejidos.....	25
2.8.3 Etapas del cultivo de tejidos vegetales.	25
2.8.4 Técnicas de cultivo de tejidos vegetales.....	27
2.8.5 Medio nutritivo para el cultivo de tejidos.....	28
2.9 Antecedentes de cultivo in vitro de <i>Stevia rebaudiana</i> B.	31
3. Metodología.....	33
3.1 Enfoque, alcance y diseño de la investigación	33
3.2 Descripción del área de estudio	33
3.3 Universo, población y muestra	33
3.4 Recolección de datos	34
3.4.1 Fase de campo.	34
3.4.2 Fase de laboratorio.....	35
3.5 Variables evaluadas	40
3.5.1 Formación de brotes.	40
3.5.2 Tamaño de brotes.....	41
3.5.3 Período de brotación.....	41
3.6 Procesamiento y tabulación de datos.....	41
3.7 Análisis de los datos	41
3.8 Selección del tratamiento para el protocolo de establecimiento in vitro.....	41
4. Resultados.....	42
4.1 Fase de establecimiento	42
4.1.1 Formación de brotes.	42
4.1.2 Tamaño de los explantes.....	44
4.1.3 Período de brotación.....	45
4.1.3 Protocolo para el establecimiento in vitro de <i>Stevia rebaudiana</i> B.	46

5. Discusión	49
5.1 Fase de establecimiento.....	49
5.1.1. Formación de brotes por explante.	49
5.1.2 Tamaño de brotes por explante.....	50
5.1.3 Período de brotación.....	51
5.1.4 Protocolo para el establecimiento in vitro de <i>Stevia rebaudiana</i> B.	52
6. Conclusiones.....	53
7. Recomendaciones	54
8. Literatura citada.....	55
Anexos	59

Índice de tabla

	Página
Tabla 1 Géneros de hongos causantes de enfermedades en el cultivo de “stevia”.....	18
Tabla 2 Lista de los insectos de incidencia negativa en “stevia”.	19
Tabla 3 Productividad de “stevia” calculada mediante la cantidad de hoja seca.	21
Tabla 4 Parámetros y condiciones del cultivo de “stevia” en el campo.	22
Tabla 5 Funciones de los fitorreguladores de acuerdo al tejido.	30
Tabla 6 Días de siembra de ápices meristemáticos de “stevia” durante la fase de establecimiento	34
Tabla 7 Composición química de las sales de Murashige y Skoog y sustancias orgánicas	36
Tabla 8 Tratamientos y dosis de fitorreguladores para el establecimiento in vitro..... de "stevia"	37
Tabla 9 Análisis de varianza (ANOVA) para la formación de brotes por tratamiento de <i>Stevia rebaudiana</i> B., en medio de cultivo suplementado con diferentes dosis de fitorreguladores	43
Tabla 10 Prueba de Tukey para la variable formación de brotes al evaluar..... los tratamientos 1, 2 y 3	44
Tabla 11 Análisis de varianza (ANOVA) para tamaño de los brotes por. tratamiento de <i>Stevia rebaudiana</i> B., en medio de cultivo suplementado con diferentes dosis de fitorreguladores	45

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Raíz de <i>Stevia rebaudiana</i> B.....	14
Figura 2. Tallo de <i>Stevia rebaudiana</i> B.....	14
Figura 3. Hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> B.....	15
Figura 4. Inflorescencia de <i>Stevia rebaudiana</i> B.	15
Figura 5. Semillas de <i>Stevia rebaudiana</i> B. vistas bajo el estereoscopio.	16
Figura 6. Estructura química de Steviosido (der) y rebaudiosido A (izq) de <i>Stevia rebaudiana</i> B.	17
Figura 7. Preparación de medio nutritivo con las sales Murashige & Skoog.....	36
Figura 8. Utensilios desinfectados con alcohol al 70%	38
Figura 9. Ápices de <i>Stevia</i> en agua destilada.	38
Figura 10. Desinfección de ápices en NaClO al 5% y Tween 80.....	39
Figura 11. Enjuagues de los ápices con agua destilada estéril.	39
Figura 12. Material vegetativo dentro de recipientes plásticos con papel estéril.....	40
Figura 13. Promedio de numero de brotes por tratamiento en la etapa de establecimiento de <i>Stevia rebaudiana</i> B., en medio de cultivo suplementado con diferentes dosis de fitorreguladores	42
Figura 14. Promedio de longitud de brotes por tratamiento en la etapa de..... establecimiento de <i>Stevia rebaudiana</i> B., en medio de cultivo suplementado con diferentes dosis de fitorreguladores	44
Figura 15. Periodo de brotación en la etapa de establecimiento de..... <i>Stevia rebaudiana</i> B., en medio de cultivo suplementado con diferentes dosis de fitorregu ladores	46

1. Introducción

La especie *Stevia rebaudiana* B. pertenece a la familia de las asteráceas, usada por sus propiedades edulcorantes y por poseer muy bajo contenido calórico, que aporta el esteviósido y rebaudiósido, sustancias aprobadas por la FDA¹, siendo una alternativa saludable para pacientes diabéticos considerando que no aumenta los niveles de glucosa en la sangre; adicionalmente se le atribuyen propiedades antibióticas.

En El Salvador, se han identificado cuatro sitios en los que se cultiva “stevia”: Cantón El Carmen en Cojutepeque departamento de Cuscatlán, San Juan Opico departamento de La Libertad, CENTA² (Banco de Germoplasma), ENA³ y Santo Domingo en San Vicente (Mejía et al., 2014).

La propagación de esta especie es principalmente por esquejes; pero con este método de reproducción se obtiene bajo número de individuos por planta, otra forma es por semillas pero esto implica recombinación genética y la tasa de germinación es muy baja o nula para considerarse efectiva para el cultivo.

Como alternativa de propagación de esta especie, la técnica de cultivo de tejidos vegetales permite la obtención de plantas con las mismas características de la planta madre. Con esta técnica se alcanza una propagación masiva, que permite mayor control sobre la sanidad del material y conservación de su pureza varietal.

La investigación consistió en el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de la extracción de ápices meristemáticos, utilizando las sales de Murashige y Skoog, considerando dos fitorreguladores vegetales: 6-BAP⁴ y ANA⁵ a diferentes concentraciones. Con los resultados obtenidos, se formuló un protocolo de establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. como información base para la micropropagación de la especie.

¹FDA: Food and Drug Administration.

²CENTA: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova”.

³ENA: Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñonez”.

⁴6-BAP: 6-bencilaminopurina

⁵ANA: ácido naftalenacético

2. Revisión de la literatura

2.1 Origen y distribución

Al referirse al origen de la especie *Stevia rebaudiana* B. se distribuye en gran parte de América:

Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni es una planta originaria del Sudeste de Paraguay, de la parte selvática subtropical de Alto Paraná. Esta planta fue usada ancestralmente por sus aborígenes, como edulcorante y medicina. Sin embargo, el género *Stevia* consta de más de 240 especies de plantas nativas de Sudamérica, Centroamérica y México, con muchas especies encontradas en lugares tan lejanos como Arizona, Nuevo México y Texas. Por siglos las tribus Guaraníes de Paraguay y Brasil usaron especies diferentes de “stevia” y principalmente, *Stevia rebaudiana* B.; ellos la llamaron ka’a he’ê o yerba dulce (Martínez, 2015, p.6).

Stevia. Rebaudiana B. cuenta con más de 144 variedades a nivel mundial, destacando a Morita 2, esta especie presenta numerosos eco tipos; también la variedad Ariete es actualmente muy cultivada, debido a su mayor edulcoración. La variedad Morita 2 fue desarrollada en Japón por Toyosigue Morita, la ventaja de esta variedad es que presenta mayores rendimientos de hoja seca y mejor contenido químico que las otras variedades. (Martínez, 2015).

2.2 Clasificación taxonómica de la especie.

Respecto a la clasificación taxonómica de “stevia”, Flann (2011, parr. 1), plantea lo siguiente:

Reino:	Plantae
Phylum:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Género:	<i>Stevia</i>
Especie:	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni)

2.3 Botánica de la especie

2.3.1 Raíz.

Las raíces son fibrosas, filiformes y perennes, formando abundantes reservas, distribuyéndose en la superficie de la tierra; es la única parte de la planta que no contiene esteviósido, las raíces finas se juntan alrededor de la superficie del suelo y raíces más gruesas en las zonas más profundas (Ramesh, Singh y Megeji, 2006) (Ver fig. 1).



Figura 1. Raíz de *Stevia rebaudiana* B.

2.3.2 Tallo.

El tallo es erecto, subleñoso y pubescente; durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, sin embargo después del primer ciclo vegetativo forma numerosos tallos, puede alcanzar hasta 90 cm de altura en su hábitat natural y en los trópicos puede llegar a tener alturas superiores a 100 cm (Martínez, 2015) (Ver fig. 2).



Figura 2. Tallo de *Stevia rebaudiana* B.

2.3.3 Hoja.

La planta posee hojas elípticas, ovales o lanceoladas, algo pubescentes; presentan disposición opuesta en sus estados juveniles, y alternas cuando las plantas llegan a su madurez fisiológica (Martínez, 2015) (Ver fig. 3).



Figura 3. Hojas de *Stevia rebaudiana* B.

2.3.4 Inflorescencia.

La flor es hermafrodita, pequeña y blanquecina; su corola es tubular, pentalobulada, en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas. La planta es auto incompatible (protandria), por lo que la polinización es entomófila (Martínez, 2015) (Ver fig. 4).



Figura 4. Inflorescencia de *Stevia rebaudiana* B.

2.3.5 Fruto y semilla.

El fruto es un aquenio que puede ser claro (estéril) u oscuro (fértil) y es diseminado por el viento, la semilla tiene un pequeño endospermo (Martínez, 2015) (Ver fig. 5).



Figura 5. Semillas de *Stevia rebaudiana* B. vistas bajo el estereoscopio.

2.3.6 Contenido dulce de glucósido en partes de la planta.

En la planta de “stevia” se encuentran diez glucósidos de los cuales el esteviósido y el rebaudiósido A, son de los más importantes, la planta contiene diferentes cantidades de glucósido y esteviósido, de acuerdo al siguiente orden de mayor a menor: hojas, flores, tallos, semillas. La raíz es el único órgano que no contiene esteviósido (Sparks, 2006).

En 1997 Ngowata purificó el extracto de stevia obteniendo un Esteviósido, un polvo blanco y altamente higroscópico, por lo cual hay que mantenerlo en un envase hermético para evitar la humedad. En la producción a gran escala se utiliza el mismo método anterior, salvo para el paso final que genera productos secos mediante el uso de una secadora en aerosol.

Los investigadores informaron que de 3000 g de Estevia se podía producir 101,5 g de polvo fino de color amarillo de Esteviósido. Extractos de la *Stevia rebaudiana* B. se utilizan como edulcorante natural o en suplementos dietéticos por su contenido de glucósidos: Esteviósido y rebaudiósido con características químicas y farmacológicas adecuadas para su uso en la alimentación humana. Los principios de la *Stevia rebaudiana* B. se deben a sus

componentes naturales activos presente en las hojas que son el Estevisido y rebaudiosidos. El Estevisido tiene un ligero sabor amargo y proporciona 250 a 300 veces el dulzor del azúcar.

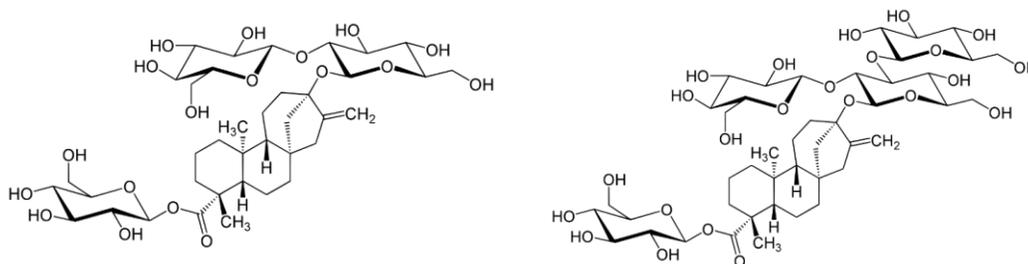


Figura 6. Estructura química de Steviosido (der) y rebaudiosido A (izq) de *Stevia rebaudiana* B. recuperado de Dulcosides A and B, Kobayashi, M., Horikawa, S., Degrandi, I.H., Ueno, J. and Mitsuhashi, H. (1977) p. 22

Las sustancias del tipo glucósidos conocidas como steviósidos, rebaudiósidos en su forma pura pueden tener un poder endulzante 300 veces más dulce que el azúcar de mesa. Como referencia se dan las siguientes equivalencias: 1 Kg. de hoja seca y molida de estevia endulza 150 Litros de agua, 1 Kg. de Estevisido endulza 1,500 Litros de agua y 1 Kg. de azúcar endulza 25 Litros de agua (Martínez, 2015).

Las hojas de la planta son 30 veces más dulce que el azúcar y el extracto o edulcorante puro es 300 veces más (Martínez, T., 2002 cit. Por Martínez, 2015 p. 56).

2.4 Plagas y enfermedades

La “stevia” es una planta susceptible al ataque de plagas y enfermedades, sus mayores problemas fitopatológicos son los ocasionados por hongos y nematodos, como se muestra en la tabla 1, mientras que las plagas más frecuentes son: los ácaros e insectos masticadores, raspadores y succionadores. Estos factores inciden negativamente en el rendimiento y calidad del producto, debiendo realizarse un estricto control de plagas (Martínez, 2015).

Tabla 1
Géneros de hongos causantes de enfermedades en el cultivo de “stevia”.

Síntomas	Genero	Órgano atacado
Marchitamiento	<i>Fusarium sp.</i>	Raiz-Tallo
	<i>Rhizoctonia sp.</i>	Raiz-Tallo
	<i>Sclerotium sp.</i>	Raiz-Tallo
Manchas necróticas	<i>Septoria sp.</i>	Hojas
	<i>Alternaria sp.</i>	Hojas- Tallos
Ennegrecimiento	<i>Colletotrichum sp.</i>	Tallos
	<i>Phomopsis sp.</i>	Tallos
	<i>Curvularia sp.</i>	Tallos
	<i>Botryodiplodia sp.</i>	Tallos
	<i>Phyctaena sp.</i>	Tallos
Pudrición oscura y aborto	<i>Aspergillus sp.</i>	Flores
	<i>Cladosporium sp.</i>	Flores

Nota. Adaptado de Martínez Cruz, Michel. (2015). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una revisión. Cultivos Tropicales, p.10.

Los tres primeros grupos de enfermedades (marchitamiento, manchas necróticas y ennegrecimiento) son los que mayores daños ocasionarían a la producción de este rubro, teniendo en cuenta que los hongos *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.* y *Sclerotium sp.*, ocasionan la muerte de las plantas, reduciendo así la población de plantas por unidad de área. Las manchas necróticas influyen negativamente en la calidad del producto, dando lugar a que las hojas se clasifiquen en una categoría inferior y de menor precio, pues a nivel comercial se prefieren hojas de coloración verde y sin manchas (Martínez, 2015).

Tabla 2
 Lista de los insectos de incidencia negativa en “stevia”.

Nombre científico	Orden	Órgano atacado
Tetranychus sp.	Spacari	Hojas
Agallia sp.	Homoptera	Hojas
Myzus persicae	Homoptera	Hojas – brotes
Diabrotica sp.	Coleoptera	Hojas
Dichelops furcatus	Hemiptera	Hojas – brotes
No identificado	Hemiptera	Hojas – brotes
Taylorilygus pallidus	Hemiptera	Hojas – brotes
Harmostes serratus	Hemiptera	Hojas – brotes
Proxys sp.	Hemiptera	Hojas – brotes
Trips tabaco	Thysanoptera	Hojas – brotes
Pseudoplusia includens	Lepidoptera	Hojas
Spodoptera sp.	Lepidoptera	Hojas
Schistocerca sp	Orthoptera	Hojas
Gryllotalpa sp.	Orthoptera	Raíz - Tallo
Pseudococcus sp.	Homoptera	Raíz

Nota: Adaptado de Martínez Cruz, Michel. (2015). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una revisión. Cultivos Tropicales, p. 7.

Los daños ocasionados por los insectos de los órdenes Coleoptera, Lepidoptera y Orthoptera influyen directamente en el rendimiento del cultivo pues estos consumen las hojas, con lo cual el área foliar se reduce, causando una menor cosecha de hojas como se muestra en la tabla 2. Las plagas chupadoras y raspadoras (Hemiptera, Homoptera, Acari y Thysanoptera) causan daño indirecto, pues se alimentan de la savia o del jugo celular, disminuyendo el crecimiento de la planta. (Martínez, 2015).

2.5 Importancia de la “stevia”

2.5.1 Medicinal.

La “stevia” es apta para personas diabéticas; por su propiedad hipotensora es también recomendada para personas con tensión alta, pues la reduce, es adecuada para bajar el nivel de acidez de la sangre y de la orina, ayuda a bajar de peso, debido a que es bajo en calorías; su sabor dulce proviene de varias sustancias entre ellas la más destacada es el esteviósido, que no produce enfermedades como las causadas por el consumo de azúcar en exceso y los demás edulcorantes artificiales (Mejía, Avendaño y Lozano, 2014).

En Japón se comprobaron los beneficios de esta planta y la ausencia de efectos desfavorables para la salud y hoy día la “stevia” es utilizada en la versión japonesa de la Coca Cola dietética y de los chicles Wrigley y cuenta con el 40% de participación del mercado de edulcorantes en ese país. (Mejía et al., 2014).

2.5.2 Medioambiental.

El cultivo de “stevia” tiene capacidades de restaurar el suelo donde se cultiva, también estimula el crecimiento de raíces al sembrar otro cultivo, puede contribuir a mejorar el suelo luego del mal uso de fertilizantes y abonos inorgánicos, así mismo desintoxica la tierra de residuos agroquímicos (Mejía et al., 2014).

2.5.3 Económica.

Los principales productores son Japón, China, Taiwan, Tailandia, Corea, Brasil, Malasia y Paraguay (Mejía et al., 2014).

La “stevia” que se produce china es pobre en calidad dado que solo tiene del 5 al 6% de esteviósido/rebaudosidos, mientras que en Paraguay tiene entre el 9 y 13%, por lo que la exportación de esta planta es un éxito. La “stevia” puede remplazar los otros edulcorantes en comidas, tortas y bebidas en general (Mejía et al., 2014).

La productividad de “stevia” se calcula mediante la cantidad de hoja seca que se puede obtener durante los primeros doce meses como se muestra en la tabla 3, iniciando con una plantación madre, esta planta puede ser una opción viable para ciertos países con cultivos ilícitos debido a que su cultivo es muy promisorio por su buen precio internacional (Mejía et al., 2014).

Tabla 3
Productividad de “stevia” calculada mediante la cantidad de hoja seca.

Área	3 meses	6 meses	12 meses	Total
1,00 has.	500,00 kgs.	666,67 kgs.	2,166,67 kgs.	3,333,33 kgs
1,25 has.	625,00 kgs.	833,33 kgs	2,708,33 kgs.	4,166,66 kgs
2,50 has.		1,250,00 kgs	1,666,67 kgs.	2,916,67 kgs
3,75 has.		1,875,00 kgs	2,500,00 kgs.	4,375,00 kgs
5,99 has.			5,833,33 kgs.	5,855,33 kgs
6,25 has.			7,291,67 kgs.	7,291,67 kgs
8,50 has.	500,00 kgs.	1,916,67 kgs	9,666,67 kgs.	12,083,33 kgs
11,25 has.	625,00 kgs.	2,708,33 kgs	12,500,00 kgs.	15,833,33 kgs

Nota. Adaptado de Mejía A., & Avendaño, S, & Lozano, J. (2014). Estudio de factibilidad para la agroindustrialización de los productos derivados de la planta de “stevia” para pequeños productores en el municipio de Tejutepeque, Cabañas (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador facultad de ingeniería y arquitectura, San Salvador, El Salvador, p. 54.

2.6 Cultivo de “stevia” en El Salvador

En nuestro país, actualmente se han identificado cuatro sitios en los cuales se cultiva la “stevia”, estos son: Cantón El Carmen en Cojutepeque departamento de Cuscatlán, San Juan Opico departamento de La Libertad, CENTA (Banco de Germoplasma) y Santo Domingo en San Vicente (Mejía et al., 2014).

2.6.1 Características agronómicas del cultivo de “stevia”.

La “stevia” es una variedad de planta que al igual que muchas de las plantaciones, requieren de parámetros para poder desarrollarse a plenitud. Según la Fundación para la Innovación Tecnológica Agropecuaria (FIAGRO), el cultivo de la “stevia” en El Salvador puede

desarrollarse a plenitud, en ambientes que presentan condiciones como se muestran en la tabla 4 (Martínez, 2015).

Tabla 4
Parámetros y condiciones del cultivo de “stevia” en el campo.

Parametro	Condiciones
Altitud	100 a 1200 m.s.n.m
Precipitacion	1000 a 2000 mm/año
Temperatura media	24 ° a 35 °
Temperatura relativa	75% a 85%
Brillo solar	6 a 10 horas
Vientos	Moderados
Textura del suelo	Franco- arenoso, franco- arenoso-arcilloso.
pH	5.5 a 6.5
Materia organica	Alta
Pendiente del terreno	No mayor a 6%
Canales de drenaje	Muy buenos
Ubicación del terreno	Cerca a vias de carretera y centros poblados
Densidad de siembra	Entre 80,000 a 100,000 plantas por hectarea
Control de arbustos	Cobertura plastica moulch
Sistema de riego	Ferti-riego por goteo
Mecanizacion	Cosecha y post cosecha

Nota. Adaptado de Mejia A., & Avendaño, S, & Lozano, J. (2014). Estudio de factibilidad para la agroindustrialización de los productos derivados de la planta de “stevia” para pequeños productores en el municipio de Tejutepeque, Cabañas (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador facultad de ingeniería y arquitectura, San Salvador, El Salvador, P. 44.

La “stevia” se cultiva a temperaturas entre los 24 y 35°C, crece entre los 300 y 1600 metros sobre el nivel del mar, su hábitat es en zonas con mucha luz solar pero con temperaturas que no excedan los 35 °C. Es una planta de gran adaptabilidad y las cantidades de luz pueden controlarse con invernaderos o filtros. (Martínez, 2015)

En estado silvestre crece en terrenos arenosos, poco fértiles y de buen drenaje; es ligeramente acidófila. Requiere días largos, y mucho sol. Para efectos agrícolas se prefiere emplear esquejes, suelo de textura ligera e irrigar con frecuencia durante el período seco. La cosecha se realiza justo antes de la floración, para mantener la máxima concentración posible de edulcorante en las hojas (Martínez, 2015)

2.7 Propagación de la especie

2.7.1 Propagación sexual.

La “stevia” se propaga por medio de aquenios, gran parte de estos son estériles, el porcentaje de germinación es bajo, entre 10 y 38 %, son livianos y de fácil dispersión, observándose alta heterogeneidad en las poblaciones resultantes, debido principalmente a la polinización cruzada; la recolección de la semilla es lenta y difícil debido a que la floración no es uniforme, lo que afecta a la maduración de la semilla (Martínez, 2015).

La producción de plántulas a través de semilla se realiza en almácigos convencionales, pero con algunas recomendaciones y prácticas especiales, como poner cobertura inmediatamente después de sembrar, con una tela fina, para evitar que las semillas sean arrastradas por el viento; la propagación por medio de aquenios es útil para el mejoramiento genético, pero no para cultivos comerciales (Martínez, 2015).

2.7.2 Propagación asexual.

Debido a la alta heterogeneidad de las plantas obtenidas a través de semillas, la propagación agámica es la mejor por conservar las características de la planta madre. Ésta puede ser por retoños, esquejes y por cultivo de tejidos. La reproducción por retoños puede utilizarse para plantaciones pequeñas, puesto que su número es reducido; los retoños nacen en la base del tallo o bajo tierra; aparecen pequeños vástagos, muchos con sus respectivas raíces, que pueden separarse y plantarse en el lugar definitivo (Martínez, 2015).

La propagación por estacas es el método más conveniente para ser usado a escala comercial; para esto es importante tener una plantación madre, que va a proveer del material vegetativo inicial. Para el establecimiento de la plantación madre se debe realizar una selección de plantas que presenten características deseables como vigor, rusticidad y productividad (Martínez, 2015).

2.8 Cultivo de tejidos vegetales

La técnica de cultivo de tejidos vegetales se define como: El cultivo de células, tejidos, y/u órganos extraídos de la plantas, que se mantiene bajo condiciones artificiales y permite reproducir plantas que poseen todas las características de la planta madre, o sea que esta es una técnica de propagación vegetativa en condiciones artificiales (Usui et al., 1996, p.1).

Por medio de esta técnica se puede dar origen a plantas enteras pues el principio fundamental de la técnica es la totipotencia celular que consiste en que cada célula de un organismo vegetal contiene todos los genes del mismo, es decir que si una célula individual da origen a una planta completa, está expresando su totipotencia celular. En el cultivo de tejidos se pueden obtener plantas a partir de células, hojas, tallos, raíces, ápices meristemáticos, flores, al inducirlos a desarrollarse para convertirse en vegetales enteros (Nabors, 2006).

2.8.1 Fines del cultivo de tejidos vegetales.

De acuerdo a Usui, Okabe, Victores y Ramírez (1996) explica que “actualmente la técnicas de cultivo de tejidos se ha diversificado con diferentes objetivos. Por ejemplo: Mejoramiento, Producción, Desinfección, Uniformización, etc” (p.67).

El cultivo se basa en dos principios importantes: el primero es la totipotencia celular que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia exacta del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa; y el segundo principio es el balance hormonal que está definido como las sustancias químicas que la planta produce de manera natural que incide en sus etapas fenológicas. (Roca y Mroginski, 1991)

El cultivo de tejidos permite la propagación clonal rápida y masiva en un periodo breve de tiempo de un gran número de plántulas, bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra, mediante el cultivo hay ciertas ventajas que favorecen: menores costos de mano de obra, ausencia de infecciones de campo, ausencia de peligros ambientales, acceso al material para la micro propagación, disponibilidad permanente del material (Espinoza, 1992)

El crecimiento de las plantas y el contenido de esteviósido en las hojas de las plantas cultivadas a partir de cultivo de tejidos, son más uniformes que la planta cultivada a partir de

semillas, los número de raíces, biomasa de brotes y contenido de esteviósido es mayor en las plantas de crecimiento vegetativo (Truong y Valicek, 1999)

2.8.2 Factores físicos que influyen en el cultivo de tejidos.

Los factores físicos que intervienen en el cultivo de tejidos con mayor impacto son:

La temperatura puesto que as respuestas morfogenicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación, en general temperaturas entre 25 y 28 °C son adecuadas para el establecimiento de los cultivos (Roca y Mroginski, 1991).

La luz, en condiciones *in vitro*, la intensidad y cantidad de luz es muy baja en comparación con condiciones naturales por lo que se recomienda el espectro útil para los vegetales es de 400 a 700 nanómetros.

El pH, la acidez o alcalinidad del medio de cultivo es importante y diferente para cada tipo de planta, por lo que se hace necesario ajustarlo a los requerimientos de cada especie, sin embargo el pH adecuado para las plantas generalmente oscila entre 4.5 a 7.0

La humedad, en condiciones *in vitro* la humedad dentro de los recipientes es cercana al 100%, por lo que la planta *in vitro* no desarrolla un adecuado sistema de regulación hídrica (López 2013, cit por Rumaldo 2016)

2.8.3 Etapas del cultivo de tejidos vegetales.

Murashige en 1974 propuso tres pasos fundamentales para micropropagar eficientemente una especie: 1) Establecimiento aséptico del cultivo, 2) Multiplicación, y 3) Enraizamiento y la preparación del explante para su trasplante al suelo (Roca y Mroginski, 1991).

2.8.3.1. Fase de establecimiento.

El primer paso para el establecimiento se basa en la elección del explante o la planta madre, dependerá del objetivo que se desea alcanzar y la especie vegetal utilizada, Es frecuente la utilización de ápices o meristemas, hojas, entrenudos, cotiledones, anteras, esto puede resultar efectivo con el uso de técnicas y medios nutritivos específicos. Otro punto importante en la fase de iniciación de un cultivo es la asepsia, las condiciones físicas y químicas en las que se cultiva un explante es un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos como bacterias y

hongo, evitar la contaminación es un aspecto básico para lograr el éxito en el establecimiento, incubación y manipulación (Roca y Mroginski, 1991)

Previo a la introducción del material a la cámara de flujo laminar se deberá realizar una desinfección de la planta madre, Roca y Mroginski (1991) explica que:

Hay una gran vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de etanol (70 % v/v) y de hipoclorito de sodio (NaClO) del 1 % al 3% contenido en productos de uso doméstico.

2.8.3.2 Fase de multiplicación.

Durante la incubación en un medio artificial estéril, el explante se multiplica con la formación de callos o yemas, según las condiciones de cultivo. La fase intermedia de formación de callos se evita cuando se tienen fines de micropropagación debido al hecho de que las plantas que provienen de callos embriogénicos presentan diferentes grados de variación. (Roca y Mroginski, 1991).

La fase de multiplicación se considera que se debe a la división de las células, al aumento de su tamaño o a ambos procesos, la diferenciación estará asociada con la producción de nuevas células cuya organización está de acuerdo con las condiciones *in vitro*. (Roca y Mroginski, 1991).

2.8.3.3 Fase de enraizamiento.

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales (Roca y Mroginski, 1991)

De igual manera requiere se requiere cambiar el balance hormonal, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas para lograr el estímulo que el explante necesita para la diferenciación del sistema radical (Roca y Mroginski, 1991).

2.8.3.4 Fase de aclimatación.

En todos los cultivares la técnica de aclimatación se debe desarrollar bajo una atmósfera natural. Lo más importante es conocer cómo se controla esto en el área de ambiente artificial o

invernadero. Para la aclimatación de las vitro plantas deben controlarse 3 condiciones: obscuridad, humedad y temperatura (Usui et al., 1996).

2.8.4 Técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

2.8.4.1 Embriogénesis somática.

La embriogénesis somática, es el proceso de desarrollo que produce un embrión a partir de una o de un grupo de células somáticas (Merino 1998).

Estos embriones son parecidos a los embriones cigóticos presentes en la semilla pero provienen de células somáticas es decir de células no implicadas en el proceso sexual (Etienne, Etienne, Vázquez y Berthouly, 1999).

En micropropagación se usa para obtener clones somáticos y regenerar plantas completas con características uniformes y así establecer cultivares de plantas valiosas, libres de microorganismos y difíciles de obtener por métodos de cultivo tradicionales (Vargas, 2005).

2.8.4.2 Micro injerto.

La técnica consiste en microinjertar en condiciones asépticas un ápice caulinar, conteniendo dos o tres primordios foliares, excisado de una planta madre, sobre un portainjerto establecido y proveniente de semilla germinada in vitro, se decapita el portainjerto y se hace una escisión en forma de T invertida, en donde se introduce el microinjerto (Pereira da Paz y Pascual, 1998).

Refiriéndose a la técnica asexual de microinjerto:

La microinjertación in vitro se ha convertido en el procedimiento más recomendado para recuperar plantas de cítricos libres de virosis, a pesar de la dificultad intrínseca de su aplicación. Entre las principales ventajas de esta técnica están la producción de plantas sin características juveniles que florecen y fructifican dos años después del microinjerto y la ausencia de variaciones genéticas en el material procedente de plantas microinjertadas (Paniagua 2004, p.24).

2.8.4.3 Extracción de meristemo.

Esta técnica se utiliza con el objetivo principal de desinfección del material puesto que evita la presencia de virus en las plantas, es decir, para la propagación de plantas que en la

agricultura que tienen muchos problemas de contaminación. El meristemo que no tiene base de la hoja no se encuentra infectado de virus, debido a que no está diferenciado el sistema vascular y en esta región las células se dividen rápidamente, es por esto que hay mayor éxito de desinfección si se obtiene el meristemo lo más pequeño posible (Usui et al, 1996).

En el cultivo de meristemas o ápices meristemáticos, los pocos milímetros superiores a un ápice del vástago se cultivan en un medio que estimula el desarrollo de yemas axilares en la base de cada hoja o primordio foliar para convertirse en un vegetal entero. (Nabors, 2006).

El crecimiento del tallo en las plantas no solo es longitudinalmente sino que también produce hojas y ramas axilares, el meristemo apical da lugar a los primordios foliares y yemas axilares; consiste en un grupo de células de lenta división rodeadas de una región con células de rápida división, a medida que el tallo crece, nacen nuevos primordios foliares a partir de unas protuberancias en un flanco del meristemo apical del vástago, esto indica que aparecerá una nueva hoja. (Nabors, 2006)

2.8.5 Medio nutritivo para el cultivo de tejidos.

Las células requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos, estos nutrimentos los podemos encontrar en cualquier tejido de las plantas, en niveles macro y micro, las células en crecimiento pueden fabricar sus propias proteínas a partir de fuentes de nitrógeno y carbohidratos suministrados por el medio de cultivo. (Roca y Mroginski, 1991)

El éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo, como el empleo de tejidos viables, las combinaciones apropiadas de nutrientes y usando las sustancias químicas necesarias. Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en: sales inorgánicas (mezcla de sales), compuestos orgánicos y vitaminas (Merino, 1987)

Existe actualmente un gran número de sales minerales específicas para cada tipo de plantas, las más utilizadas son las sales de Murashige & Skoog desde 1962.

2.8.5.1 Fitorreguladores.

El término hormona deriva del griego *hormon*, que significa “despertar” o “estimular”, en los primeros estudios de estas sustancias los científicos observaron que habían unas sustancias que estimulaban las respuestas, más tarde se descubrió que también podían inhibirlas,

considerando que algunas hormonas suprimen el crecimiento de yemas axilares, mientras que otras lo promueven, el efecto de una hormona específica puede variar dependiendo de su concentración o donde está localizada en la planta (Nabors, 2006).

Las plantas producen sus propios reguladores vegetales o fitohormonas naturalmente, pero al desarrollar fragmentos de la planta en condiciones artificiales, en algunas ocasiones son requeridas por la misma, Robins, Weier y Stocking (1966) definen a una hormona vegetal como “una sustancia orgánica producida por la planta, la cual actuando en cantidades muy pequeñas, regula los procesos fisiológicos de la planta. Generalmente las hormonas existentes en la planta, son trasladadas del tejido donde se producen, al tejido donde actual para producir efectos especiales de crecimiento” (p.309).

La función que desempeñan las hormonas en los organismos vegetales es vital para el crecimiento celular, también influyen en muchos procesos como la formación de tejido nuevo, control de ciertos procesos fisiológicos como se muestra en la tabla 5, entre otras respuestas que ayudan al desarrollo de la planta, Nabors (2006) concluye que:

Las hormonas de las plantas, como ocurre con la de los animales y otros organismos, originan el crecimiento y desarrollo, así como las respuestas a estímulos medioambientales. Aunque las plantas carecen de sistema nervioso o cerebro que las ayude a responder a dichos estímulos, utilizan sus hormonas de manera notoria.

“En micropropagación, principalmente se utilizan Citocinina y Auxinas como reguladores de crecimiento. Lo más importante es la proporción y cantidad de las mismas” (Usui et al., 1996, p.35).

Tabla 5
Funciones de los fitorreguladores de acuerdo al tejido.

FUNCIONES		
Para formación de yemas adventicias	Para formación de raíces adventicias	Para diferenciación de callo
Promoción: Auxina < Citocinina	Promoción: Auxina > Citocinina	Promoción: Auxina > Citocinina
Inhibición: Auxina > Citocinina	Inhibición: Auxina < Citocinina	Inhibición: Auxina < Citocinina

Nota. Adaptado de Kanji Usui, Ken Okabe, Ruth Victores P. y Aida Eleonora Ramírez. (1996). Principios básicos de cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, p. 35.

2.8.5.1.1 Auxinas.

Refiriéndose a las sustancias que promueven el crecimiento celular, Robins et al. (1966) plantea que “las auxinas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, tanto en plantas superiores como en las inferiores; en las superiores pueden existir en el follaje, en el hipocotilo, tallos, pedicelos florales, raíces, frutos, semillas y aun en el polen” (p.312).

Las plantas no poseen glándulas para la secreción de hormonas, aun así logran sintetizarlas, la auxina se localiza como en ciertas partes de la planta y es transportada a todas partes donde lo requiera la misma. Las auxinas ayudan a coordinar actividades específicas de crecimiento, en una planta las yemas apicales y las hojas jóvenes que se están extendiendo son activos centros de síntesis y exportación de auxina. El regulador de tipo auxina natural y más común que ha sido identificado en las plantas es el ácido 3 indolacético (AIA), que actualmente se ha logrado la fabricación artificial de la sustancia. (Robins et al, 1966).

Roca y Mroginski (1991) plantea que “las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos” (p.64)

También se utiliza ampliamente un buen número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente; son las llamadas 'auxinas sintéticas',

entre las cuales el 2,4-D, el ANA y el AIB se encuentran ampliamente disponibles y se utilizan comúnmente. También existen muchos compuestos que son derivados de los ácidos fenilacético o fenoxiacético (clorosustituidos) y se ha encontrado una amplia utilización. (Roca y Mroginski, 1991)

2.8.5.1.2 Citoquininas.

Con respecto al tipo de reguladores vegetales que estimulan la formación de yemas:

Las citoquininas influyen en el crecimiento vegetal de varias maneras, incluidos el control de la división y diferenciación celulares, contrarrestando la dominancia apical, y retrasando el envejecimiento de las hojas, El nombre citoquininas se refiere a su papel en la división celular o citocinesis. Suelen ser formas modificadas de adenina y originalmente, se descubrieron como resultado de una serie de experimentos en plantas de tabaco, cuyo fin era encontrar agentes químicos estimulantes del crecimiento celular. Las citoquininas se sintetizan en la raíz y se transportan a través del xilema a otros órganos de la planta, donde fomentan de manera general un estado más juvenil de desarrollo (Nabors 2006, p. 269).

Las citocinina 6- Bencilaminopurina (6-BAP), es un agente inductor y regulador del crecimiento, la concentración más utilizada es de 0.1 a 2.0 mg/l. En forma natural se encuentra en los tejidos vegetales jóvenes, promueve la morfogénesis en explantes y específicamente en yemas axilares promueve la proliferación de brotes (CIREN, 1988)

2.9 Antecedentes de cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B.

Para evaluar la multiplicación, brotes establecidos *in vitro* fueron cultivados en ½ MS con cinco concentraciones de BAP (0.0, 2.22, 4.44, 8.88 y 17.6 µM). Posteriormente, los tallos multiplicados se subcultivaron en presencia de cinco concentraciones de ANA (0.0, 2.69, 5.37, 10.74 de 21.48 µM) para evaluar enraizamiento. Los resultados indicaron que el medio 1/2MS adicionado con BAP indujo una mayor tasa de multiplicación. 10.74 µM de ANA indujo el mejor enraizamiento; sin embargo, los tallos sin enraizamiento resultaron en la mayor supervivencia *ex vitro* (Suarez y Quintero, 2014).

En México se realizó una investigación en la cual los explantes se cultivaron en medio MS al 50% con una combinación de auxinas, citocininas, conteniendo 15g/L de sacarosa y 8

g/L de agar, cisteína (200 mg/L) ajustando pH 5.7. Los cultivos preparados fueron incubados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas luz ($32 \mu\text{M}/\text{seg m}^2$) y 8 horas de oscuridad. Al transcurrir 28 días se observaron plántulas sanas de 10-12 cm de largo que presentaban raíces. El alto porcentaje de sobrevivencia y de crecimiento, indican que las condiciones beneficiaron el desarrollo y crecimiento de las plántulas. La viabilidad de la multiplicación *in vitro* es el punto de partida para obtener plantas en forma masiva con características seleccionadas. (Romero, Ríos y Cabrera, s.f).

Otra de las investigaciones realizadas en Mexico, mediante segmentos nodales, los cuales fueron cultivados me medio basal M&S suplementado con distintas combinaciones de BAP (2,0 a 4,0 mg. L.-1) cinetina (1,3 a 8,0 mg. L.-1) y AIA (0,3 a 1,0 mg. L.-1). El análisis mostro diferencias para el porcentaje de explantes que formaron brotes y el número de brotes formados, resultando inferior a la combinación que contenia 2,0 mg. L.-1 de cinetina y 0,5 mg. L.-1 de AIA, en la cual solo se obtuvo 29.41% explantes con brotes y 1,40 brotes por explante (Vazquez, Robledo, Muratalla y Martinez, 2014).

3. Metodología

3.1 Enfoque, alcance y diseño de la investigación

La investigación tuvo un enfoque cuantitativo, con un alcance descriptivo y explicativo; puesto que se midieron, evaluaron y recolectaron datos sobre las variables del fenómeno, así como también estuvo dirigida a responder por las causas de los mismos. (Sampieri, 2006).

La investigación tuvo un diseño experimental, específicamente es un experimento puro, puesto que poseen grupos de comparación (manipulación de la variable independiente) y equivalencia de los grupos (Sampieri, 2006).

Las variables independiente fueron: las dosis de fitorreguladores: 6-bencilaminopurina (6-BAP) y Acido naftalenacetico (ANA). Se midieron y evaluaron las variables dependientes: formación de brotes, tamaño de brotes por explantes (cm) y periodo de brotación para cada tratamiento.

3.2 Descripción del área de estudio

La investigación se realizó en el Departamento de Biotecnología- Laboratorio de Biotecnología de la escuela nacional de agricultura “Roberto Quiñonez” (ENA), ubicada en San Andrés, kilómetro 33 1/2, carretera a Santa Ana, Departamento de La Libertad, El Salvador.

3.3 Universo, población y muestra

El universo fueron los arbustos de la especie *Stevia rebaudiana* B., en el departamento de La Libertad.

La población fueron los arbustos de la especie *Stevia rebaudiana* B., dentro del municipio de Ciudad Arce.

La muestra fueron 120 ápices como material vegetativo, de 50 arbustos de la especie *Stevia rebaudiana* B., de los cuales se extrajeron los ápices meristematicos, del vivero San Andrés, ubicado en el km 34 carretera a Santa Ana, Cantón San Andrés, seleccionados de manera intencionada, cumpliendo con las mejores condiciones como tamaño de la planta (20 cm) tamaño de la hoja (4-5cm), libre de plagas, edad (2 meses).

3.4 Recolección de datos

Durante toda la fase de establecimiento, que se llevó a cabo entre los meses de Abril a Junio de 2018, la toma de datos se realizó dos veces por semana por cada tratamiento, durante 1 mes, las cuales fueron registradas en hojas diseñadas para la recolección de datos del desarrollo *in vitro* de los ápices como se muestra en el anexo A

Cada uno de los tratamientos tuvo un total de 20 unidades por serie, divididas en 2 siembras de 20 unidades en cada tratamiento como se muestra en la tabla 6, es decir 40 unidades por tratamiento, para un total de 120 unidades experimentales

Tabla 6
Días de siembra de ápices meristemáticos de “stevia” durante la fase de establecimiento

Semana	Días de la semana	
	Lunes	Martes
1	T1 (20 unidades)	T2 (20 unidades)
2	T3 (20 unidades)	T1 (20 unidades)
3	T2 (20 unidades)	T3 (20 unidades)

Nota. Cada tratamiento tuvo un total de 40 unidades experimentales, cada tratamiento se sometió a la toma de datos por 4 semanas (1 mes), se sembraron 20 unidades por día por el tiempo que lleva la extracción de ápice meristemático.

3.4.1 Fase de campo.

3.4.1.1 Colecta y traslado de material vegetativo.

La planta madre que se utilizó para la investigación, fue colectada en el vivero San Andrés, ubicado en el km 34 carretera a Santa Ana, Cantón San Andrés, Ciudad Arce, La Libertad, el material colectado fueron brotes apicales.

Se aseguró que el material cumpliera con las mejores condiciones, tamaño de la planta (20 cm) tamaño de la hoja (4-5cm), libre de plagas, edad (2 meses).

Para la colecta de las muestras se utilizó un bisturí N° 10, se cortaron los brotes apicales de la planta madre, cada brote apical se colocó en los recipientes plásticos con agua destilada.

3.4.2 Fase de laboratorio.

3.4.2.1 Diseño experimental.

Se organizaron los tratamientos en un diseño completamente al azar. Se utilizó la mezcla de dos fitorreguladores 6-Benzilaminopurina (6-BAP) y Acido naftalenacetico (ANA) a diferentes dosis:

T1: 6-BAP 0.20 mg y ANA 0.025 mg

T2: 6-BAP 0.40 mg y ANA 0.050 mg

T3: 6-BAP 0 mg y ANA 0 mg

El total de tratamientos en la investigación fueron 3. A cada tratamiento se le aplico un total de 40 repeticiones, siendo la unidad experimental cada tubo con un explante.

3.4.2.2 Preparación de medio nutritivo.

3.4.2.2.1 Agua destilada

Se adicionan 500 ml de agua destilada en un Erlenmeyer.

3.4.2.2.2 Sacarosa

Como fuente de energía se utilizó azúcar comercial del cañal 20 g/l

3.4.2.2.3. Preparación de Sales M&S.

Para la preparación del medio nutritivo se utilizaron las sales de Murashige & Skoog, estas sales tienen una presentación en polvo y contiene todas las soluciones madre como se muestra en la tabla 7; Se preparó de acuerdo a las especificaciones técnicas del fabricante, es decir, para 1 litro de medio nutritivo, se diluyo en 3 ml de agua destilada previamente calentada en hotplate, con un agitador magnético, al disolverse completamente se vertió en el Erlenmeyer.

Tabla 7
Composición química de las sales de Murashige y Skoog y sustancias orgánicas

N.	Componentes	Concentración	mg/l	Cantidad requerida para 1 lt
I	Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	100X	1650	10 ml/l
II	Nitrato de potasio (KNO_3)	100X	1900	20 ml/l
III	Cloruro de calcio (CaCl_2)	100X	440	20 ml/l
IV	Sulfato de magnesio (MgSO_4)	100X	370	10 ml/l
V	Fosfato de potasio (KPO_4)	100X	170	10 ml/l
VI	Hierro(FeSO_4)	100X	27.8	10 ml/l
VII	Microelementos		mg/l	10 ml/l
	H_3BO_3	100X	6.2	10 ml/l
	$\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$	100X	22.3	10 ml/l
	$\text{ZnSO}_4\text{7H}_2\text{O}$	100X	8.6	10 ml/l
	KI	100X	0.83	10 ml/l
	$\text{NaMoO}_4\text{2H}_2\text{O}$	100X	2.5	10 ml/l
	$\text{CuSO}_4\text{5H}_2\text{O}$	100X	0.025	10 ml/l
	$\text{CoCl}_2\text{6H}_2\text{O}$	100X	0.025	10 ml/l
	$\text{Na}_2\text{EDTA}_2\text{H}_2\text{O}$	100X	37.4	10 ml/l

Nota. Adaptado de Roca, William M.; Mroginski, Luis A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO, p. 30.

3.4.2.2.4 Sustancias orgánicas.

Las sustancias orgánicas se prepararon de acuerdo a las especificaciones técnicas del fabricante (Tiamina B1, Piridoxina B6, Acido nicotínico, glicina y mioinocitol) para luego verterlas en el Erlenmeyer de la preparación anterior (Ver fig. 6).



Figura 7. Preparación de medio nutritivo con las sales Murashige & Skoog.

3.4.2.2.5 Fitorreguladores.

6-BAP a 1N y ANA a 0.1 N, se tomó la concentración correspondiente de 6-BAP y ANA para cada tratamiento como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8
Tratamientos y dosis de fitorreguladores para el establecimiento in vitro de "stevia"

Tratamientos	Sales minerales	Fitorregulador	Cantidad (mg/l)	Fitorregulador	Cantidad (mg/l)	Unidades por serie	Numero de series
T1	M&S	6-BAP	0.20 mg	ANA	0.025 mg	20	2 (40)
T2	M&S	6-BAP	0.40 mg	ANA	0.050 mg	20	2 (40)
T3 (Testigo)	M&S	6-BAP	-	ANA	-	20	2 (40)

Nota. 6-BAP= 6-bencilaminopurina, ANA= ácido naftalenacético; las dosis descritas en esta tabla son utilizados para otras especies en el laboratorio de biotecnología en ENA por lo tanto se sometieron a prueba para *Stevia rebaudiana B.*

3.4.2.2.6. Agente gelificante.

Se utilizó Phytigel 2.33 g/l.

3.4.2.1.5 pH.

El pH se ajustó a 5.7 para 1l de medio nutritivo.

Seguidamente de la adición de los componentes del medio, se llevó al punto de ebullición luego de esto se retiró el Erlenmeyer de los agitadores magnéticos y se vertió cada medio de cultivo (tratamiento) en beakers plásticos para dispensar 25 ml de medio en cada tubo de ensayo, se taparon y luego se esterizaron a 121 °C a 20 lb de presión por 15 minutos, como se muestra en el anexo B1 pasado el tiempo de esterilización se colocaron en una gradilla cubriendo la tapa con plástico, y finalmente de dejaron reposar hasta la solidificación a una inclinación de 40 °.

3.4.2.3 Desinfección del material vegetal.

Cada ápice meristemático se sometió a las siguientes etapas de desinfección del Laboratorio de Biotecnología de la ENA.

- Se rociaron los utensilios para la desinfección con alcohol al 70% (Ver fig. 7).



Figura 8. Utensilios desinfectados con alcohol al 70%

- Se lavaron los ápices realizando 2 enjuagues con agua destilada durante 2 minutos en beakers de 500 ml (Ver fig. 8).



Figura 9. Ápices de “stevia” en agua destilada.

- Se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% y 3 gota de Tween 80 (C₅₈H₁₁₄O₂₆) en un beacker durante 5 minutos. Luego se colocaron los ápices en recipientes plásticos sumergidos en agua destilada (Ver fig. 9).



Figura 10. Desinfección de ápices en NaClO al 5% y Tween 80.

- Se introdujo el material desinfectado a la cámara de flujo laminar, en donde se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril, y se dejaron secar aproximadamente 30 minutos cubiertos con papel estéril para evitar la deshidratación del tejido (Ver fig. 10).



Figura 11. Enjuagues de los ápices con agua destilada estéril.

- Luego el material vegetativo se colocó dentro de un recipiente plástico con papel estéril, y se realizó la siembra de cada ápice en el medio nutritivo correspondiente (Ver fig. 11)



Figura 12. Material vegetativo dentro de recipientes plásticos con papel estéril.

3.4.2.4 Siembra de ápices meristemáticos.

Se realizó en condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar, con la ayuda de un estereoscopio, pinzas, mechero Bunsen y bisturí como se muestra en el anexo B2, asegurándose realizar la actividad en el menor tiempo posible para evitar la deshidratación del tejido

En esta fase, se realizó la extracción de ápice meristemático la cual consistió en aislar el meristemo con 2 pares de primordios foliares.

3.4.2.5 Área de incubación.

Luego de la ejecución de las actividades anteriores, se incubaron en un área especial en condiciones físicas controladas: temperatura (25 °C) luz artificial con lámparas fluorescentes de 2,000 luxes (fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad) y humedad relativa al 20%.

Durante los primeros 7 días de incubación el explante estuvo en total oscuridad, pasado este tiempo se sometió 7 días a luz difusa, luego de esto se incubaron con el fotoperiodo antes descrito en el resto de los días como se muestra en el anexo C.

3.5 Variables evaluadas

3.5.1 Formación de brotes.

Visualmente se realizó un conteo del número de brotes que presentó cada tubo (explante) durante cuatro semanas de incubación y se obtuvo un promedio de los mismos por cada

tratamiento, se consideró como brotes al tejido diferenciado a partir del material vegetativo establecido inicialmente y se tomó en cuenta la morfología de los explantes (sin deformación).

3.5.2 Tamaño de brotes.

Se realizó la medición de cada brote que contenían los tubos (explantes) durante cuatro semanas, para ello se utilizó una regla milimetrada, la medida se expresó en cm, se obtuvo un promedio de la longitud por cada tratamiento, se consideró la longitud del brote desde la base del explante hasta el ápice.

3.5.3 Período de brotación.

Se realizó la toma de datos 1 día por semana de cada tratamiento, en esta variable se tomó en cuenta la diferencia en el tiempo de brotación por semana de cada tratamiento, comparando las cuatro semanas de establecidos los explantes.

3.6 Procesamiento y tabulación de datos

Los datos fueron procesados con el programa Microsoft Excel 2017 para la elaboración de gráficos, los datos fueron analizados con el software estadístico InfoStat (versión 2018) para la elaboración de tablas, para la toma de imágenes se utilizó un teléfono móvil Samsung Galaxy S7 edge.

3.7 Análisis de los datos

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confianza para comprobar si hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, se realizó la prueba de Tukey para la comparación de medias para las variables que presentaron diferencia significativa, estas pruebas fueron aplicadas a la formación de brotes y al tamaño de los brotes.

3.8 Selección del tratamiento para el protocolo de establecimiento *in vitro*.

El tratamiento elegido para formular el protocolo de establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. se tomó en cuenta los mejores resultados en cuanto a las variables evaluadas, a las cuatro semanas de establecido el cultivo, si estadísticamente no existe significancia entre los tratamientos se tomó en cuenta el aspecto económico, la forma y coloración del explante para determinar la mejor dosis.

4. Resultados

4.1 Fase de establecimiento

Se determinó el mejor protocolo de establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. mediante la evaluación de cuatro variables: formación de brotes, tamaño de los brotes (cm) y periodo de brotación.

4.1.1 Formación de brotes.

Se evaluó durante la fase de establecimiento y se midió la capacidad de desarrollar brotes en los explantes a las cuatro semanas de su respectiva siembra.

Se obtuvieron los siguientes resultados para la variable formación de brotes: el tratamiento que produjo mayor número de brotes, fue el que contenía 0.20 mg/l 6-BAP + 0.025 mg/l ANA (T1), con un total de 75 brotes y un promedio de 1.87 brotes por explante, muy de cerca quedo el tratamiento con 0.40 mg/l 6-BAP + 0.050 mg/l ANA (T2), con 69 brotes por tratamiento y un promedio de 1.72; el que produjo menor número de brotes fue el tratamiento sin fitorreguladores totalizando 24 brotes por tratamiento y un promedio de 0.6 (Ver fig. 12).

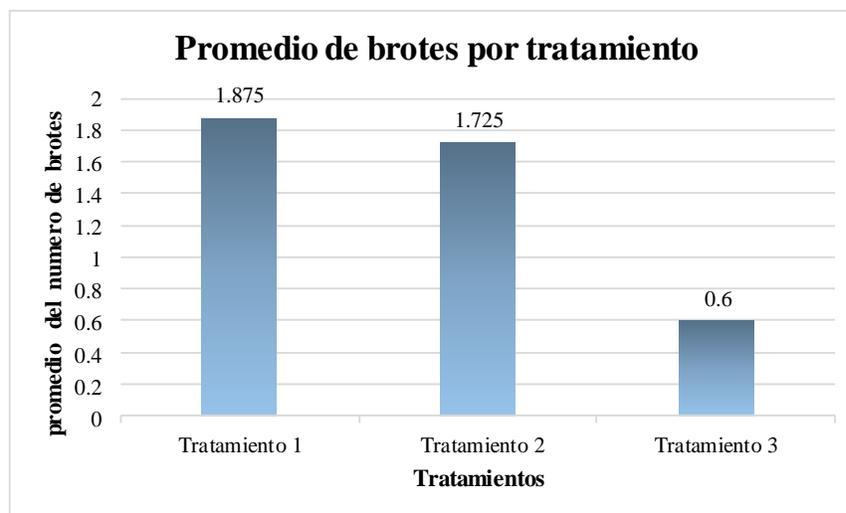


Figura 13. Promedio de numero de brotes por tratamiento en la etapa de establecimiento de *Stevia rebaudiana* B., en medio de cultivo suplementado con diferentes dosis de fitorreguladores.

4.1.1.1 Prueba estadística ANOVA.

Tomando en cuenta las dosis de 6-Benzilaminopurina (6-BAP) y Acido naftalenacetico (ANA), se realizó la comparación entre los 3 tratamientos en función al número de brotes a las cuatro semanas de incubación, mediante el análisis de varianza como se muestra en la tabla 9. El ANOVA presento diferencia estadísticamente significativa en el promedio de brotes de los tratamientos que se evaluaron en esta investigación.

Tabla 9

Análisis de varianza (ANOVA) para la formación de brotes por tratamiento de Stevia rebaudiana B., en medio de cultivo suplementado con diferentes dosis de fitorreguladores

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
formacion de brotes	120	0.11	0.10	114.37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	38.85	2	19.43	7.58	0.0008
tratamientos	38.85	2	19.43	7.58	0.0008
Error	299.95	117	2.56		
Total	338.80	119			

Nota: El valor de la probabilidad P valor < 0.05 indica significancia entre los tratamientos.

En la tabla 9 se observa que el P valor (0.0008) de la prueba ANOVA es menor al valor de significancia, lo que demuestra que hay diferencia significativa entre los tratamientos.

4.1.1.2 Prueba estadística Tukey.

Para esta prueba se obtuvo la diferencia mínima significativa (DMS) para comprobar la diferencia entre las medias de los tratamientos como se muestra en la tabla 10, el resultado que se obtuvo fue que entre el T1 y el T2 no hay diferencia con respecto a las medias obtenidas en el número de brotes y los tratamientos en los que se encontró diferencia entre ellos son el T3 y T2; y el T3 y T1.

Tabla 10

Prueba de Tukey para la variable formación de brotes al evaluar los tratamientos 1, 2 y 3.

```

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.84993
Error: 2.5637 gl: 117

```

tratamientos	Medias	n	E.E.	
tratamiento 3	0.60	40	0.25	A
tratamiento 2	1.73	40	0.25	B
tratamiento 1	1.88	40	0.25	B

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

4.1.2 Tamaño de los explantes.

Se evaluó durante la fase de establecimiento y se midió la longitud de los brotes en los explantes a las cuatro semanas de su respectiva siembra.

Se obtuvieron los siguientes resultados por tratamiento: el tratamiento sin fitorreguladores obtuvo la mayor longitud en la cuarta semana, con un promedio de 0.95 cm, seguido del tratamiento 1 que contenía 0.20 mg/l 6-BAP + 0.025 mg/l ANA, con 0.84 cm por tratamiento; y con menor longitud el tratamiento 2 que contenía 0.40 mg/l 6-BAP + 0.050 mg/l ANA, con 0.67 cm en promedio (Ver fig. 13).

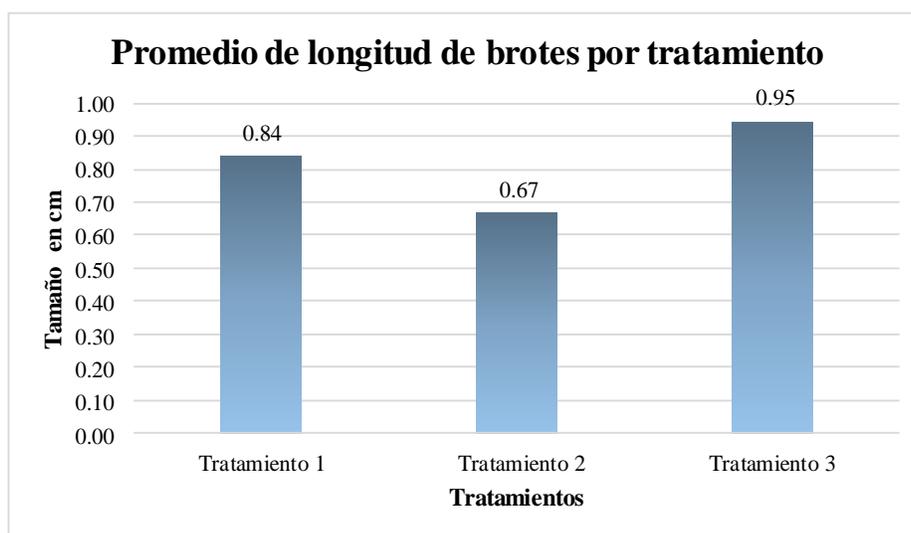


Figura 14. Promedio de longitud de brotes por tratamiento en la etapa de establecimiento de *Stevia rebaudiana* B., en medio de cultivo suplementado con diferentes dosis de fitorreguladores.

4.1.2.1 Prueba estadística ANOVA.

Tomando en cuenta los volúmenes de 6-Benzilaminopurina (6-BAP) y Acido naftalenacetico (ANA), al realizar las mediciones a las cuatro semanas de incubación, el análisis de varianza ANOVA como se muestra en la tabla 11, pues no existió diferencia estadísticamente significativa en el promedio de la longitud de los brotes en los tratamientos que se evaluaron en esta investigación.

Tabla 11

Análisis de varianza (ANOVA) para tamaño de los brotes por tratamiento de Stevia rebaudiana B., en medio de cultivo suplementado con diferentes dosis de fitorreguladores.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
tamaño de los brotes	120	0.01	0.00	122.31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.57	2	0.78	0.79	0.4584
tratamientos	1.57	2	0.78	0.79	0.4584
Error	116.89	117	1.00		
Total	118.46	119			

Nota. El valor de la probabilidad P valor < 0.05 indica la significancia entre los tratamientos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p> 0.05)

En la tabla 12 se observa que el P valor (0.4585) de la prueba ANOVA es mayor al valor de significancia, lo que demuestra que no hay diferencia significativa entre los tratamientos.

4.1.3 Periodo de brotación.

Se realizó el conteo del número de brotes que presentaron los explantes por tratamiento, de acuerdo a los días de evaluación, es decir, durante la cuarta semana de incubados los explantes, para establecer una comparación de la velocidad de los tratamientos al formar brotes (Ver fig. 14).

Durante la etapa de incubación que duro 30 días, en el Tratamiento 2 se observó un incremento del número de brotes durante la segunda semana, a diferencia del Tratamiento 1 que en mismo tiempo solo formo la mitad de estos, sin embargo al realizar la toma de datos a la cuarta semana, existió un notable aumento en el número de brotes en el Tratamiento 1, con un total de 75.

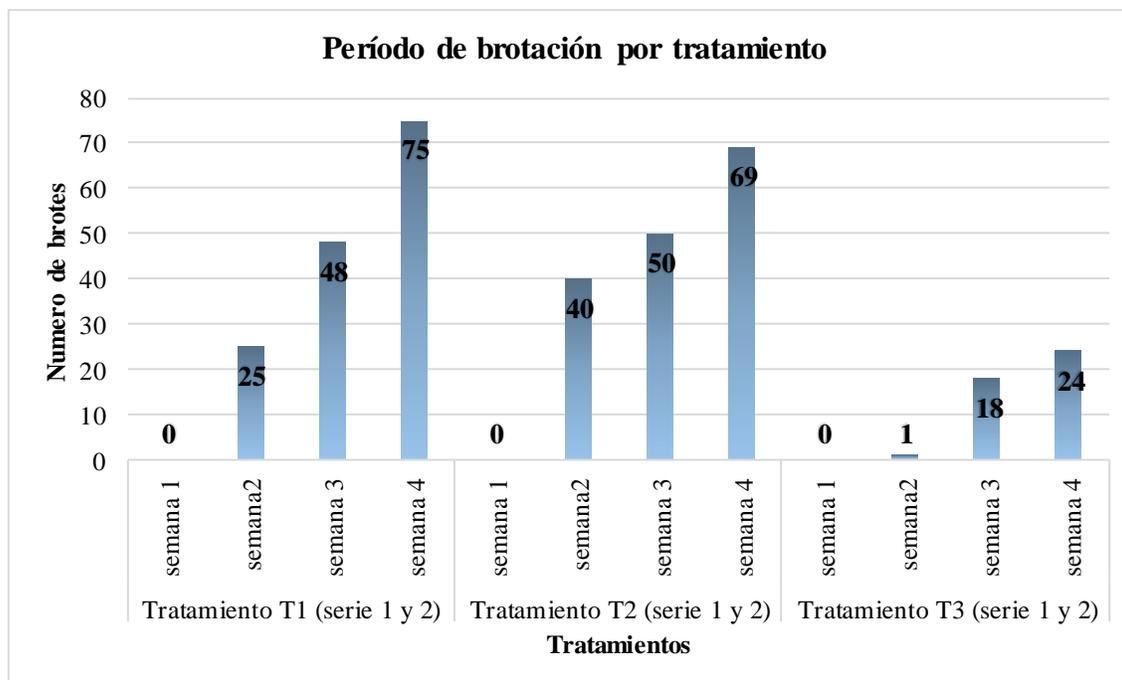


Figura 15. Período de brotación en la etapa de establecimiento de *Stevia rebaudiana* B., en medio de cultivo suplementado con diferentes dosis de fitoreguladores.

4.1.3 Protocolo para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B.

Para el protocolo de establecimiento de *Stevia rebaudiana* B. se realizara la extracción de ápices meristemáticos.

Se determinó la dosis de fitoreguladores que contenía el Tratamiento 1 para el protocolo de establecimiento *in vitro* de “stevia”, se observó los mejores resultados mediante las variables: Formación de brotes, tamaño de los brotes (cm) y periodo de brotación.

4.1.3.1 Selección de los materiales.

El material vegetativo deberá cumplir con las mejores condiciones, tamaño de la planta (20 cm), etapa fenológica (vegetativa), sanidad (libre de plagas), edad (2 meses) y la especie.

Para la colecta de las muestras (ápices) se utilizara una hoja de bisturí estéril n° 10, se le rociara con alcohol al 70% al recipiente plástico donde se depositaran los ápices, para prevenir la contaminación externa.

4.1.3.2 Desinfección de los materiales.

Instrumentos:

- Beacker
- Recipiente plástico
- 1 litro de agua destilada
- 1 litro de agua destilada estéril
- Alcohol etílico al 70%
- Hipoclorito de sodio al 5%
- Tween 80

Lavar los ápices realizando 2 enjuagues con agua destilada durante 2 minutos en un beaker de 500 ml.

Desinfectar con hipoclorito de sodio (NaClO) al 5%, adicionando 3 gotas de Tween 80 (C₅₈H₁₁₄O₂₆) durante 5 minutos, luego se colocar los ápices en recipientes plásticos sumergiéndolos en agua destilada estéril.

Introducir el material a la cámara de flujo laminar en donde se le realiza nuevamente 3 enjuagues con agua destilada estéril, se dejan secar aproximadamente 30 min cubiertos con papel toalla para evitar la deshidratación del tejido.

Colocar sobre papel toalla en los recipientes plásticos para finalmente realizar la extracción de cada ápice meristemático.

4.1.3.3 Extracción de ápices meristemáticos.

Instrumentos:

- | | |
|-----------------------------|---------------------------|
| ➤ Papel estéril | ➤ Pinzas |
| ➤ Cajas Petri esterilizadas | ➤ Mango de bisturí |
| ➤ Alcohol etílico al 90% | ➤ Mechero de bunsen |
| ➤ Estereoscopio | ➤ Cámara de flujo laminar |

Medio nutritivo: MS solidificado con Phytigel 2.33 g/l, fitorreguladores 0.20 mg/l 6-BAP + 0.025 mg/l ANA, sacarosa 20 g/l, pH 5.7, (Distribuir 25 ml en cada tubo de ensayo). Se deberá esterilizar a 121 °C a 20 lb de presión durante 15 minutos.

Por medio del estereoscopio eliminar todas las hojas de una en una hasta llegar a los primordios foliares, con la ayuda de pinzas y bisturí.

Extraer el ápice meristemáticos con 2 pares de primordios e inmediatamente colocarlo en el tubo de ensayo que contiene el medio nutritivo.

Incubarlos bajo una iluminación de 2000 luxes, a una temperatura de 25 °C, un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y a humedad relativa al 20%

Durante los primeros 7 días de incubación el explante debe permanecer en total oscuridad, pasado este tiempo se somete 7 días a luz difusa, luego al fotoperiodo antes descrito en el resto de los días (30 días).

5. Discusión

5.1 Fase de establecimiento

5.1.1. Formación de brotes por explante.

Para esta variable se obtuvo un promedio de 1.87 brotes por explante, en el tratamiento 1 que contenía 0.20 mg/l 6-BAP + 0.025 mg/l ANA, con la mayor puntuación en cuanto a número de brotes, este resultado se atribuye probablemente a la presencia de 6-BAP en el medio de cultivo, considerando que incrementa significativamente el número de brotes producidos por cada explante en comparación con el tratamiento sin fitohormonas, en el que no se obtuvo ningún otro brote más que el establecido inicialmente.

La presencia de brotes en el tratamiento 1 y 2, está relacionado con la citocinina 6-BAP y la auxina ANA, se observó que la combinación de estos fitorreguladores induce la formación de brotes en los explantes de “stevia”, de acuerdo a Ramesh et al., (2016) si los niveles de 6-BAP son bajos, es decir, de 0.1-0.2 mg/l habrá mayor formación de brotes puesto que la alta dosis de 6-BAP resulta en una menor cantidad de los mismos.

En el tratamiento 3 sin fitorreguladores, solamente se observó el desarrollo del ápice meristemático establecido inicialmente que se tomó en cuenta como brote, pero no indujo a la formación de otros brotes.

El tratamiento 3 obtuvo un promedio de 0.60 brotes por explante, este hecho podría deberse a que naturalmente las plantas generan sus propios compuestos hormonales sintetizados en los ápices o en la cofia de la raíz puesto que, son los sitios donde se tiene mayor demanda de hormonas ya que son los puntos de crecimiento en las plantas, estos compuestos se encuentran en concentraciones muy bajas como para ser suficientes para la técnica de micropropagación *in vitro*, concordando con Anbazhagan (2010), al obtener una media de 0.20 brotes por explante en el tratamiento con ninguna fitohormona en el medio de cultivo, la adición de hormonas vegetales en el medio nutritivo es imprescindible.

El análisis estadístico ANOVA para el número de brotes por explante presentó diferencia estadísticamente significativa, esto se comprobó mediante el P valor < 0.05 como resultado de

los tratamientos como se muestra en la tabla 9, en el promedio de brotes de los tratamientos que se evaluaron T1, T2 y T3, lo que demuestra que las dosis utilizadas de fitorregulador, probablemente inciden en la producción de brotes en el explante durante la fase de establecimiento.

Entre los 3 tratamientos se observó que al realizar la prueba DMS de Tukey como se muestra en la tabla 10, solo se obtuvo diferencia significativa entre T2 y T3; y T1 y T3 puesto que en los tratamientos con fitorreguladores y el que no contenía ningún fitorregulador, existió una evidente diferencia en el número de brotes, en los tratamientos con fitorreguladores T1 Y T2 no existió diferencia estadísticamente significativa debido a que el número de brotes en los promedios fueron muy similares.

Se observó que el T1 presentaba mejor coloración y forma respecto al T2, siendo el primero el más idóneo para la formación de brotes de *Stevia rebaudiana* B.; así mismo la coloración verde intenso muy parecido a la planta en el campo destacando la respuesta positiva en el explante, de la absorción de sales del medio nutritivo y los fitorreguladores. En el T2 con la dosis más alta de fitorreguladores la coloración fue un verde claro translucido o pálido en algunos de los explantes, los tallos y hojas presentaban deformación por hiperhidratación como se muestra en el anexo D. Según Debergh (1987) niveles altos en los requerimientos especiales del cultivo *in vitro*, como nutrientes (minerales y carbohidratos) y reguladores de crecimiento son las principales causas de malformaciones e hiperhidricidad de los brotes.

5.1.2 Tamaño de brotes por explante.

En dicha variable no existió diferencia significativa entre los tratamientos con fitorreguladores y sin fitorreguladores, los tres tratamientos tuvieron un crecimiento muy similar en cuanto a la longitud de los explantes, sin embargo en el Tratamiento 3 se obtuvo el mayor promedio de 0.95cm, la importancia de este resultado radica en que a mayor longitud de los explantes existe más vigorosidad, por lo que favorece para la continuación de las siguientes etapas de la micropropagación *in vitro* concordando con Agrobiotecnología (2011), que asegura que un explante que posee mayor longitud va a proliferar y a sobrevivir a diferencia de uno que muestre poco desarrollo del tallo.

Probablemente al combinarse los fitorreguladores estos no inciden significativamente en el crecimiento longitudinal del explante; tal como se observó en la investigación no existió

diferencia significativa en cuanto a la longitud al combinarse 6-BAP y ANA, este resultado es similar al obtenido por Suárez et al. (2006), en el que se observó una disminución de la longitud de los explantes cuando 6-BAP y ANA eran utilizados en el medio de cultivo.

Así mismo se destaca la disminución de la longitud de los explantes al utilizar altas dosis de 6-BAP no produce los mejores resultados concordando con Suarez (2014) que observó que los tallos de “stevia” producidos en presencia de 6-BAP se reducían, la cual se agudiza con el incremento de la dosis de esta fitohormona.

En el tratamiento 2 que contenía mayor cantidad de fitorregulador en el medio nutritivo 0.40 mg/l de 6- BAP + 0.050 mg/l de ANA, se obtuvo un promedio de 0.67 cm, el tamaño menor obtenido de los 3 tratamientos, esto podría deberse al requerimiento hormonal de la especie, ya que responde de manera poco favorable respecto al crecimiento longitudinal en presencia de 6-BAP y ANA en dosis alta, como ya se sabe ANA es la fitohormona encargada de la elongación celular y por ende el crecimiento longitudinal del explante, sin embargo en combinación con 6-BAP no mostro los mejores resultados, puesto que dominó el fitorregulador en mayor dosis siendo este 6-BAP (Ver fig 13).

Los explantes sin la presencia de fitorreguladores puesto a prueba en Tratamiento 3, responden solamente a los macro y micro nutrientes que contiene el medio de cultivo, así como también a las hormonas vegetales que posee naturalmente, esto influyo positivamente en las características del explante, teniendo en cuenta que presento una morfología y coloración muy similar a como es en campo, como se muestra en el anexo E.

El análisis estadístico ANOVA para la longitud de los brotes por explante no presento diferencia estadísticamente significativa, esto se comprobó mediante el P valor < 0.4584 como se muestra en la tabla 10, en el promedio de los tratamientos, debido a que las medias que se evaluaron tuvieron una similitud en cuanto a la longitud de los explantes, la presencia o ausencia del fitorregulador no fue estadísticamente significativo en el crecimiento de los brotes “stevia”.

5.1.3 Período de brotación.

El tratamiento T2 que contenía la mayor dosis fitorregulador, en la segunda semana de incubación respondió positivamente en cuanto a la formación de brotes, sin embargo el T1 que contenía la mitad de la dosis de fitorregulador en el mismo tiempo, obtuvo solo la mitad de brotes; en la cuarta semana se observó que la dosis alta de fitorregulador no produjo los mejores

resultados en la formación de brotes, puesto que el tratamiento que contenía la mitad fitorregulador formo mayor número de brotes al finalizar el tiempo de incubación, George (1993) menciona que concentraciones muy altas de citoquininas pueden causar una cantidad de brotes pequeños, que usualmente no se alargan y que en algunas especies presentan una forma inusual llegando a ser hiperhídricos.

A la cuarta semana de cultivo, el explante ya ha utilizado los macro y micro nutrientes del medio nutritivo para todos sus procesos fisiológicos como se muestra en el anexo F, así mismo el explante ha metabolizado la citocinina 6-BAP que tiene como función el retraso del proceso natural de envejecimiento en las plantas, por lo que un subcultivo es requerido a los 30 días en el caso de “stevia”, esto permite mantener la cantidad necesaria de nutrientes en el explante para evitar el estrés del mismo, dicha observación concuerda con Criollo (2011) quien manifiesta que mediante la realización de subcultivos se desaceleran los procesos como la senescencia en los explantes.

5.1.4 Protocolo para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B.

Al evaluar las variables antes mencionadas se seleccionó el Tratamiento 1 que contenía 0.20 mg/l de 6-BAP + 0.025 mg/l de ANA, como el mejor para formular el protocolo de establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B., sus criterios de selección fueron: menor cantidad de fitorregulador pues reduce los costos, por la mayor formación de brotes, como también por las características morfológicas en tallo y hojas, como se muestra en el anexo G.

6. Conclusiones

En la fase de establecimiento los fitorreguladores 6-BAP y ANA estimulan la formación y el tamaño de los brotes en los Tratamientos 1 y 2.

El Tratamiento 2, presento malformaciones por hiperhidricidad en los brotes de “stevia”, causado por la dosis alta de fitorreguladores.

Al evaluar las variables se determinó que la dosis de 6-BAP 0.20 mg/l + ANA 0.025 mg/l es el mejor tratamiento para el protocolo del establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B.

Las dosis altas de 6-BAP disminuyen la cantidad de brotes de “stevia”, y las concentraciones bajas de 6-BAP inducen a mayor formación de brotes.

A los 30 días de incubados los explantes de “stevia” se evidencio la falta de nutrientes en el medio nutritivo, provocando la muerte del explante.

7. Recomendaciones

Realizar tratamientos con los fitorreguladores 6-BAP y ANA para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B.

Utilizar el protocolo para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B., con las dosis de fitorreguladores 0.20 mg/l de 6-BAP y 0.025 mg/l de ANA en su medio de cultivo.

Se deben realizar subcultivos antes de los 30 días de incubación para evitar la pérdida del material por falta de nutrientes en el medio de cultivo.

Realizar investigaciones de *Stevia rebaudiana* B. para continuar con la fase de multiplicación *in vitro*, utilizando diferentes dosis de fitorreguladores.

8. Literatura citada

- Agrobiotecnología (2011). Micropropagación comercial. Recuperado de [http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/teoricas-archivo-word/3%20 %20Cultivo %20 de%20tejidos.doc/view](http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/teoricas-archivo-word/3%20%20Cultivo%20de%20tejidos.doc/view).
- Avendaño M., y Lozano J. (2014). Estudio de factibilidad para la agroindustrialización de los productos derivados de la planta de stevia para pequeños productores en el municipio de Tejutepeque, Cabañas (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador facultad de ingeniería y arquitectura, San Salvador, El Salvador.
- CIREN (1988). Manual de cultivo de la frambuesa *Rubus idaeus*. Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN, CORFO) Edición N° 71, Santiago de Chile, Chile. Recuperado de [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4281/Flores%20 Enco%2c%20Manhiory%20Lizabeth.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4281/Flores%20Enco%2c%20Manhiory%20Lizabeth.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Criollo F. (2011). Establecimiento de un protocolo para la propagación masiva in vitro de cabuya azul (*Agave americana* L.) y Cabuya blanca (*Frucraea andina* Trel.).
- Debergh, I. L. (1987) Improving micropropagation, *IAPTC News letter 51*: 2-10.
- Espinoza, N. R. L. (1992). Cultivo de tejidos: micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. Lima, Perú. Recuperado de <http://cipotato.org/library/pdfdocs/ResGuide41143.pdf>
- Etienne, H.; Etienne, D.; Vásquez, N.; Berthouly, M. (1999). Aportes de las biotecnologías al mejoramiento genético del café; el ejemplo de la multiplicación por embriogénesis somática de híbridos F1 en América Central. Desafíos de la Caficultura Centroamericana, Capítulo 13. Publicación CIRAD/PROMECAFE IICA (Ed). San José, Costa Rica.
- Flann C. (2011). The catalogue of Life Taxonomic Clasification, Edition 2, Part A. Recuperado de <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2016/details/database/id/72>
- George, E. F. (1993). Plant propagation by tissue culture. Basingstoke, UK. 2° Ed. Springer.
- Grijalva, R. L. (2015). Manual para la elaboración de un proyecto de investigación: módulo 1, San Salvador, EDIPRO.

- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2006). Metodología de la investigación: Roberto Hernández Sampieri, Carlos Fernández Collado y Pilar Baptista Lucio (4a. ed. --.). México D.F.: McGraw-Hill.
- Kobayashi, M., Horikawa, S., Degrandi, I.H., Ueno, J. and Mitsushashi, H. (1977) Dulcosides A and B, new diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* **16**, 1405–1408 recuperado de <https://www.sciencedirect.com/article/abs/pii/S0031942200887920>.
- López M. (2013). Establecimiento de un protocolo para el inicio del cultivo in vitro de *Agave letonae* (HENEQUÉN) a partir de yemas axilares, tesis de licenciatura en biología. Universidad de El Salvador.
- Martínez C. M. (2015). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una revisión de Cultivos Tropicales 36(Supl. 1), 5-15. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielophp?script=sci_art_text&pid=S0258-59362015000500001&lng=es&tlng=es.
- Martínez, T. (2002). “La Hierba Dulce. Historia, Usos y Cultivo de la *Stevia rebaudiana bertonii*”. Colección Ciencias de la Salud. Recuperado de http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2421/1/Extracci%C3%B3n_de_un_edulcorante_natural_no_cal%C3%B3rico_a_escalade_laboratorio_a_partir_de_Stevia_rebaudiana_bertonii_y_su_aplicaci%C3%B3n_en_la_industria_de_alimentos.pdf
- Merino, C. (1998). Informe sobre el aprendizaje de la Biotecnologías aplicadas al café. Reporte de capacitación. Centro de Investigación de NESTLE tours Francia 28 p.
- Merino, M. E. (1987). Cultivo de tejidos vegetales (manual de prácticas). México, Trillas. Recuperado de https://www.cuautitlan2.unam.mx/fondo_editorial/comité_editorial/manuales/cultivosdetejidosvegetales_manualprac.pdf
- Nabors W. M. (2006). Introducción a la botánica. S.A., Madrid, pearson education.
- Paniagua R. C. (2004). Adaptación de la técnica de Microinjertación in vitro de apices caulinares, de valencia y pineapple utilizando patrones de carrizo (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) y Citrumelo (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus paradisi* M. Recuperado de <https://yu5et.files.wordpress.com/09/b101061a--pania6a--ed.pdf>.

- Pereira da Paz, B. y Pascual M. (1998). Microenxertia. Cultura de tecidos e transformacao Genetica de plantas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria & Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, Brasilia, Brasil.
- Ramesh K., Singh V. and Megeji N. W. (2006). Cultivation of stevia [*stevia rebaudiana* (bert.) bertonii]: a comprehensive review. *Advances in Agronomy*. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211305890030>
- Robins W. W., Weier T. E., y Stocking C. R. (1966). Botánica. México, Editorial limusa- Wiley, S. A.
- Roca W. M.; Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO.
- Rodríguez González, Horacio, Acosta de la Luz, Lérica L, Hechevarría Sosa, Isabel, Rivera Amita, María Magdalena, Rodríguez Ferradá, Carlos Alberto, Sánchez Govín, Ester, & Milanés Figueredo, Masgloiris. (2007). Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 12(4) Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962007000400004&lng=es&tlng=es.
- Romero C., Ríos A. y Cabrera S., (sin fecha). Cultivo in vitro de *Stevia rebaudiana*, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. Recuperado de <https://docplayer.es/25220502-Cultivo-in-vitro-de-stevia-rebaudiana-b-benemerita-universidad-autonoma-de-puebla-puebla-pue.html>.
- Sparks D. L. (2006). *Advances in Agronomy*. Recuperado de <https://www.elsevier.com/books/advances-in-agronomy/sparks/978-0-12-000794-3>.
- Suarez, I., & Quintero, I. (2014). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural a través de explantes con meristemos pre-existentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVI (1), 29-33.
- Suarez, I., Espitia, M., y Quintero, I. (2006). Efecto de auxinas y citocininas en la multiplicación y enraizamiento de *Stevia rebaudiana*. *Fitotecnia Colombiana*. 2006; 6(2):1-8. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752014000100004.

- Tamura, Y., Nakamura, S. Fukui, H. y Tabata, M. (1984). Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. *Plant Cell Reports*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/258766705_Clonal_propagation_of_Stevia_rebaudiana_Bertoni_by_stem-tip_culture.
- Truong, T. T. Valicek, P. (1999). Verification of growth and stevioside content of stevia plants propagated by vegetative and generative method. *Agric. Trop. Subtrop.*
- Usui K., Okabe K., Victores P. R. y Ramírez A. E. (1996). Principios básicos de cultivo de tejidos vegetales. Guatemala.
- Vázquez-Baxcajay, Liberia, Robledo-Paz, Alejandrina, Muratalla-Lúa, Alfonso, & Conde-Martínez, Víctor. (2014). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y detección de steviósidos. *Bioagro*, 26(1), 49-56. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612014000100006&lng=es&tlng=es.

Anexos

Anexo A. Ficha de toma de datos para el establecimiento in vitro de “stevia”.

Ficha de recolección de <i>Stevia rebaudiana</i> B., datos de tratamiento _____			
Fecha de evaluación : _____ N° de evaluación _____			
Numero de tubo	Numero de brotes por tubo	Longitud de brotes por explantes (cm)	Tiempo de incubación
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			

Anexo B. Actividades del establecimiento *in vitro* de “stevia” en la fase del laboratorio.



Anexo B1: Esterilización de medio nutritivo



Anexo B2: Siembra de ápice meristemático en cámara de flujo laminar

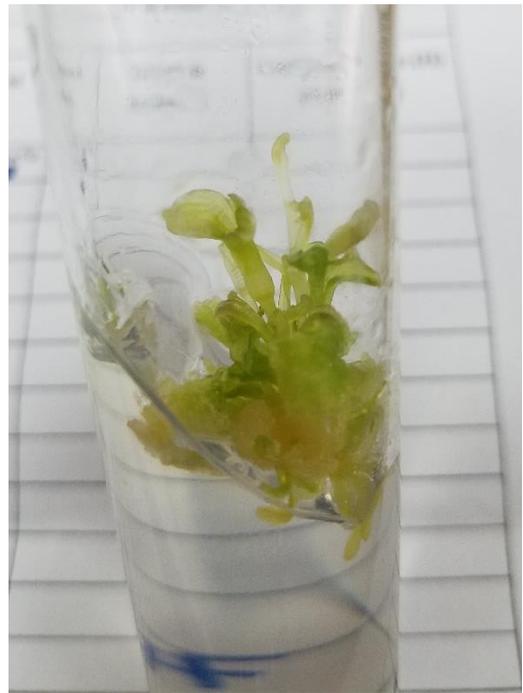
Anexo C. Explantes de “stevia” sometidos a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad bajo luz artificial con lámparas fluorescentes de 2,000 luxes.



Anexo D. Explantes de *Stevia rebaudiana* B. en incubación.

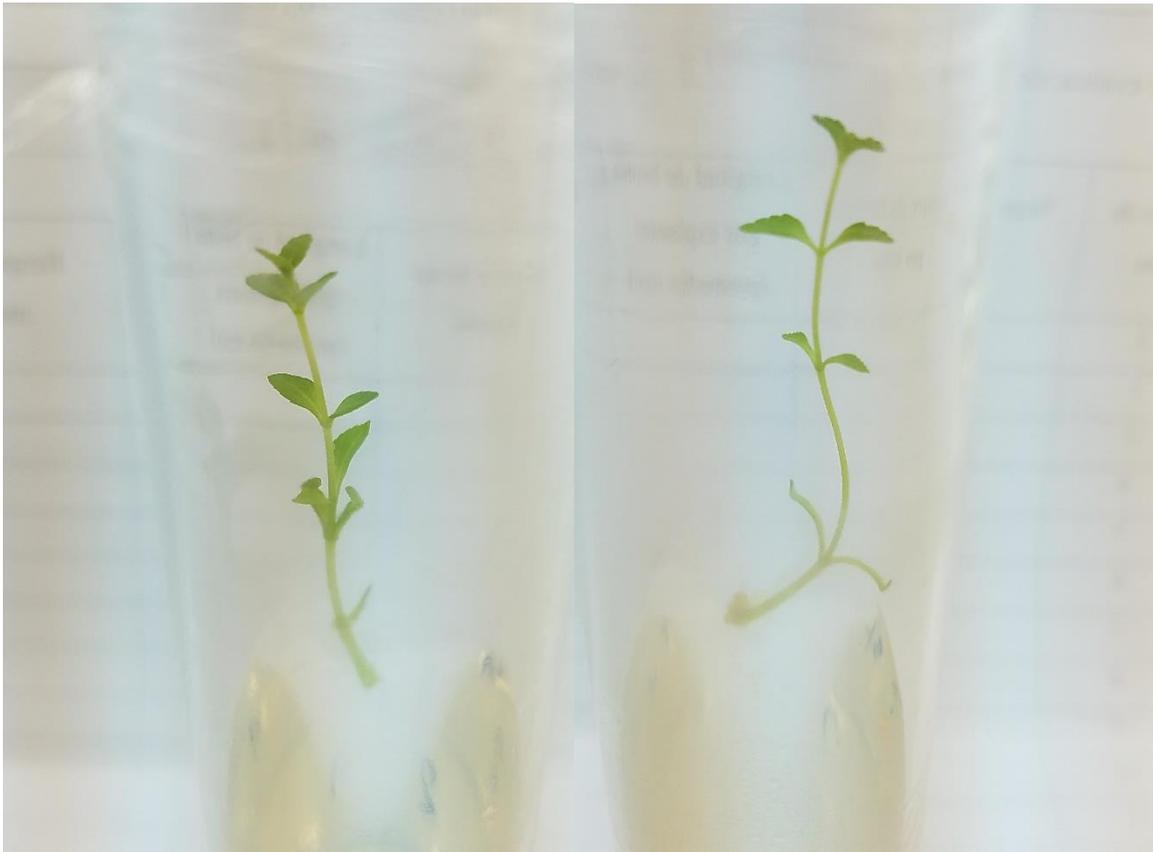


Anexo D1. Explante de Tratamiento 1.

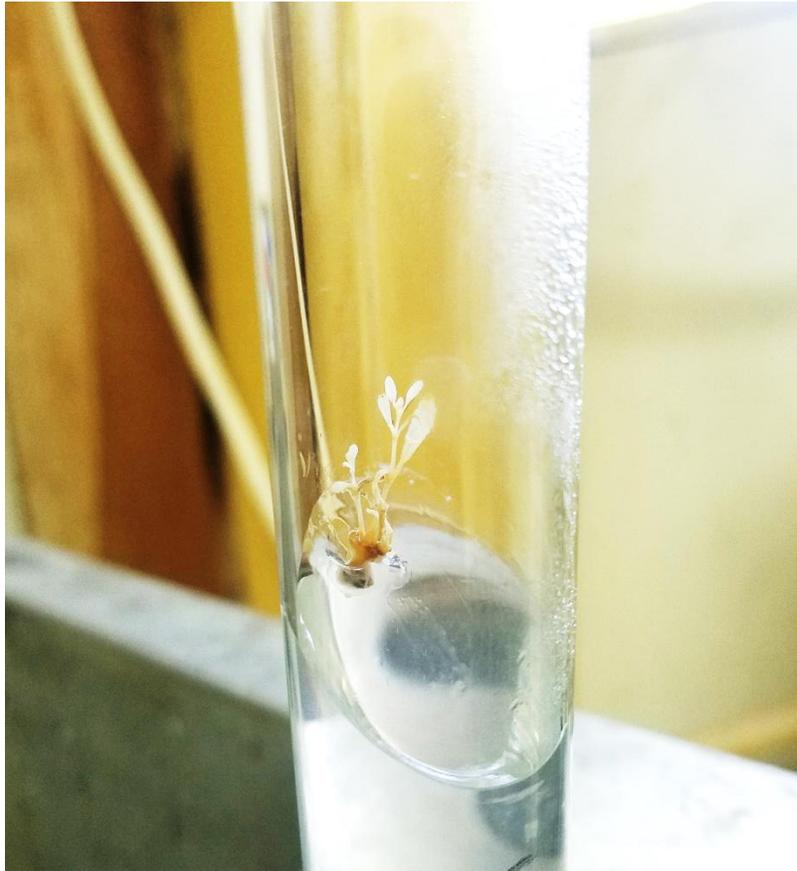


Anexo D2. Explante de Tratamiento 2.

Anexo E. Explantes de Tratamiento 3 (sin fitorreguladores).



Anexo F. Explante de *Stevia rebaudiana* B. pasados los 30 días de incubación.



Anexo G. Tratamiento 1 con 0.20 mg/l de 6-BAP + 0.025 mg/l de ANA en el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B.

