

Estrategia para la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Diego Martínez Rivillas¹, Aura Urrea², Elio Jiménez³, Lucia Atehortua²

¹Universidad CES-Programa de Biología CES-EIA. Calle 10A No 22-04. Medellín. Antioquia. Colombia. CP 050021. e-mail: dmartinez@ces.edu.co

²Laboratorio de Biotecnología SIU, Universidad de Antioquia. Carrera 53 No 61-30. Medellín. Antioquia. Colombia. CP 050010.

³Tropical Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 18905 SW 280th Street. Homestead. FL. USA. 33031.

RESUMEN

La multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni ha sido descrita con anterioridad en diferentes fuentes referenciales. Sin embargo, no se informa la implicación de las investigaciones realizadas en los procesos a escala productiva. El presente trabajo se realizó con el objetivo de establecer una estrategia para la propagación *in vitro* de *S. rebaudiana*. Se realizaron estudios en el establecimiento, la multiplicación de plántulas así como en el enraizamiento. Se determinó el efecto de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones con el fin de incrementar la producción de plántulas a gran escala. Se logró el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos con un 66.67% de explantes libres de contaminantes microbianos y 83.33% de supervivencia con el uso de NaOCl (1% v/v) durante 5 min y un tratamiento previo con Previcure. En la multiplicación *in vitro* se seleccionó el tratamiento con 6-BAP 0.5 + AIB 0.2 mg l⁻¹ y se logró el 76.67% de enraizamiento con 0.5 mg l⁻¹ de AIB. Estos resultados permiten proponer una estrategia que reduce el tiempo de obtención de ápices para el enraizamiento a dos semanas. Su aproximación a un esquema de producción a escala lo hace útil para su implementación en la rápida micropropagación de clones élites y la producción de material vegetal de siembra de estevia en una escala comercial.

Palabras clave: cultivo de ápices, escalado, estevia, reguladores de crecimiento

Strategy for *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni

ABSTRACT

In vitro multiplication of *Stevia rebaudiana* Bertoni has been described previously in different reference sources. However, the implication of the investigations carried out in the productive scale processes is not informed. The present work was carried out with the objective of establishing a strategy for the *in vitro* propagation of *S. rebaudiana*. Studies were carried out on planting, seedling multiplication as well as rooting. The effect of growth regulators at different concentrations was determined in order to increase the production of large-scale seedlings. The *in vitro* establishment of meristematic apices was achieved with 66.67% explants free of microbial contaminants and 83.33% survival with the use of NaOCl (1% v / v) for 5 min and a previous treatment with Previcure. The treatment with 6-BAP 0.5 + AIB 0.2 mg l⁻¹ was selected for *in vitro* multiplication, and 76.67% of rooting was achieved with 0.5 mg l⁻¹ of IBA. These results allow to propose a strategy that reduces the time of obtaining apices for the rooting to two weeks. Its approach to a scale production scheme makes it useful for its implementation in the rapid micropropagation of elite clones and the production of plant material of stevia planting on a commercial scale.

Keywords: growth regulators, scale up, shoot tips culture, stevia

INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni (estevia), es una especie perenne medicinal originaria del Paraguay y ha sido introducida en países del continente americano, entre ellos, Brasil, México, Estados Unidos de Norte América y

otros como Corea, Indonesia, Tanzania, Canadá, India (Pande y Gupta, 2013). Las propiedades medicinales de los metabolitos secundarios producidos por *Stevia rebaudiana* hacen de ella una planta con especial valor comercial dada la demanda de endulzantes no calóricos. Además, se describe que los

extractos de estevia, tienen propiedades terapéuticas, como actividad antioxidante, antimicrobiana y antifúngica (Junbi y Amber, 2010; Millones *et al.*, 2014). Por otra parte se considera que tiene un gran potencial como cultivo agrícola ya que la demanda de los consumidores de alimentos a base de hierbas está en ascenso y se ha demostrado que contiene ácido fólico, vitamina C y aminoácidos indispensables con excepción del triptófano (Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

Sin embargo, el bajo porcentaje de germinación de sus semillas y el bajo número de esquejes que se obtienen en los procesos de propagación vegetativa son factores limitantes para su cultivo a gran escala (Carneiro *et al.*, 1997; Pedroza, 2007; Taware, 2010). Consecuentemente, la micropropagación puede proveer grandes cantidades de plantas genéticamente uniformes lo cual representa una técnica alternativa para la rápida multiplicación de plántulas de estevia (Sairkar *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2011). En este contexto, la propagación clonal *in vitro* de estevia ha sido descrita usando explantes como hojas (Ali *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2011; Naidu *et al.*, 2011; Karimi *et al.*, 2014), segmentos internodales (Laribi *et al.*, 2012; Thiyagarajan y Venkatachalam, 2012; Shende y Manik, 2013; Singh *et al.*, 2014) y ápices (Giridhar y Sowmya, 2010; Das *et al.*, 2011). En estos procesos se ha descrito la formación de estructuras callosas en las plántulas micropropagadas y periodos de subcultivo mayores a tres semanas (Rangappa y Aind, 2013; Khalil *et al.*, 2014). Por otra parte, las posibilidades que ofrece la biotecnología y particularmente a través de las técnicas de cultivo *in vitro* tienen también un potencial uso en la producción industrial de metabolitos bioactivos (Singh *et al.*, 2014).

El objetivo del presente trabajo fue establecer una estrategia para la propagación *in vitro* de *S. rebaudiana*. Esta podrá ser implementada a nivel productivo con el fin de reducir el tiempo de cultivo y los costos de producción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal utilizado en las investigaciones realizadas corresponde a

plantas madre de *Stevia rebaudiana* cultivadas en condiciones de campo. Se tomaron como explantes iniciales brotes jóvenes.

Desinfección del material vegetal y establecimiento *in vitro*

Las operaciones de transferencia y manipulación del material vegetal fueron realizadas en una cabina de flujo laminar horizontal en el laboratorio de producción comercial.

Previo a la toma de los explantes, la mitad del total de las plantas madre utilizadas fueron tratadas con una solución del fungicida comercial Previcure Flex (Bayer), en una concentración de 1.0 ml l⁻¹ de solución y a la otra mitad no se le realizó el tratamiento previo. La aspersión se realizó sobre la superficie foliar de los explantes, garantizando que tanto las hojas como los tallos quedaran impregnados con la solución. La aspersión se efectuó la semana previa a la utilización del explante con el fin de controlar el crecimiento y proliferación de hongos al momento del proceso de establecimiento *in vitro*.

Se seleccionaron esquejes (segmento de brotes jóvenes de 1.0-2.0 cm con yema apical). Estos fueron lavados inicialmente con jabón líquido y luego enjuagados con agua desionizada estéril. Posteriormente fueron manipulados en cámara de flujo laminar donde se sumergieron en etanol al 70% (v/v) durante 1 min en agitación en un frasco estéril. Después se realizó la desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) a diferentes concentraciones (1, 1.5, 2%; v/v) durante 5 y 10 min en agitación para un total de 12 tratamientos. Luego se enjuagaron los explantes con agua desionizada estéril, repitiendo el procedimiento al menos tres ocasiones y se retiró el agua. Se procedió a la extracción de los ápices meristemáticos de aproximadamente 2 mm con cuchillas y la ayuda de un estereoscopio.

El medio de cultivo empleado para el establecimiento fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) (Phytotechnology, EU) con las vitaminas MS, agar 0.8% (m/v) y sacarosa (30 g l⁻¹). Previo a la esterilización en autoclave el pH se ajustó a 5.8 con NaOH 1N o HCl. El medio de cultivo fue esterilizado a 121°C y 1.2 kg cm⁻² de presión durante 20 minutos. Se

utilizaron tubos de ensayo (145.0 x 25.0 mm) y se les añadieron 10 ml de medio de cultivo. Los explantes se colocaron en cámara de crecimiento en la oscuridad durante una semana.

Trascurrido ese tiempo se ubicaron en condiciones de iluminación a $25 \pm 20^\circ\text{C}$ bajo luz blanca suministrada con lámparas fluorescentes con fotoperíodo de 16h luz por 8h de oscuridad con una intensidad de flujo de fotones fotosintéticos de $30\text{-}40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A las tres semanas de cultivo, los ápices meristemáticos fueron transferidos a un medio de cultivo fresco. Se calculó el porcentaje de contaminación microbiana como la relación entre la cantidad de explantes contaminados por microorganismos y el total de explantes cultivados, a los 14 días de cultivo. Además, se cuantificó el número de explantes vivos y se calculó el porcentaje de supervivencia de los explantes no contaminados a los 21 días de cultivo. Se tomaron como explantes vivos aquellos que conservaron la coloración verde de sus tejidos y explantes muertos aquellos que perdieron la pigmentación (explantes blancos).

Para el análisis de los datos de las variables porcentaje de contaminación y de supervivencia se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis/Mann Whitney previa comprobación de los supuestos de normalidad, mediante el paquete estadístico SPSS versión 18.0 sobre Windows.

Multiplicación *in vitro*

El objetivo del experimento fue determinar el efecto de la combinación de 6

bencilaminopurina (6-BAP) y ácido indol butírico (AIB) sobre la multiplicación *in vitro* de *S. rebaudiana* (Tabla 1).

Cada combinación empleada en los tratamientos fue preparada individualmente y dispensada en frascos de policarbamato de 500 ml de capacidad y 70 ml de medio de cultivo. En cada frasco se colocaron 10 explantes procedentes de la fase de establecimiento.

Se realizaron tres subcultivos de multiplicación cada dos semanas. Los ápices de los brotes y los segmentos nodales (segmento de brote de al menos 1 cm con una yema axilar) se manejaron en frascos por separado. Se cuantificó el número de brotes aptos para la multiplicación en cada recipiente en el momento del subcultivo. Como tratamiento control se usó el mismo medio de cultivo sin la adición de reguladores de crecimiento. Los experimentos fueron realizados por triplicado en diferentes momentos cada uno de ellos.

Enraizamiento *in vitro*

Para el enraizamiento se utilizó el medio de cultivo MS con AIB en diferentes concentraciones (0, 0.2, 0.5, 0.8 mg l^{-1}) tomando como referencia los resultados descritos por Ibrahim *et al.* (2008). Se utilizaron frascos de policarbamato de 500 ml de capacidad con y 70 ml de medio de cultivo. Se colocaron 10 explantes (ápices) por cada frasco. Se cuantificó el número de raíces desarrolladas por plántula luego de cuatro semanas de cultivo.

El análisis de los resultados se realizó utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurión 16.2.04. Se verificaron los supuestos correspondientes para el modelo.

Tabla 1 Concentraciones y combinaciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido indol butírico (AIB) para la multiplicación *in vitro* de plántulas de *Stevia rebaudiana*.

| Tratamiento | 6-BAP (mg l^{-1}) | AIB (mg l^{-1}) |
|-------------|------------------------------|----------------------------|
| control | 0.0 | 0.0 |
| A | 0.1 | 0.2 |
| B | 0.1 | 0.5 |
| C | 0.2 | 0.2 |
| D | 0.2 | 0.5 |
| E | 0.5 | 0.2 |
| F | 0.5 | 0.5 |

Propuesta de una estrategia para la propagación *in vitro* de *S. rebaudiana*

A partir de los resultados y las experiencias técnicas se propuso una estrategia para la propagación *in vitro* de *S. rebaudiana* con potencial de ser implementada en un sistema de producción comercial en condiciones *in vitro*. Para ello se consideraron aspectos como la composición del medio de cultivo, las semanas del cultivo, el número de ápices y segmentos nodales obtenidos en los respectivos subcultivos además del estimado de insumos requeridos, con el fin de seleccionar las condiciones adecuadas para la obtención de un alto número de plántulas en corto tiempo mediante la propagación de ápices y segmentos nodales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección del material vegetal y establecimiento *in vitro*

Los tratamientos realizados de desinfección de los explantes de estevia procedentes de campo permitieron su establecimiento en condiciones *in vitro*. Se observó que la inmersión de los explantes en NaOCl al 2% (v/v) durante 10 min disminuyó los porcentajes de contaminación microbiana con valores cercanos al 13%. Sin

embargo, cuando se consideró la supervivencia de los explantes se observó que esta también disminuyó hasta valores de 10% (Tabla 2).

Los ápices meristemáticos se desarrollaron y crecieron en el medio de cultivo MS. La aplicación de fungicida, a las plantas madre en campo, previo a la selección de los explantes iniciales favoreció el establecimiento *in vitro*. Se logró un incremento de los niveles de supervivencia cuando se emplearon las concentraciones más bajas de hipoclorito de sodio. Los resultados mostraron que el empleo de 5 min de inmersión de los explantes en NaOCl al 1% (v/v) además de un tratamiento de las plantas madre en campo con Previcure antes del proceso de desinfección, produjo un mayor porcentaje de supervivencia de plántulas (83.33%) con diferencias significativas con el resto de los tratamientos, con valores de 33.33% de contaminación microbiana (Tabla 2).

En la literatura científica se describe el uso de diferentes concentraciones de cloruro de mercurio (HgCl₂) solo o en combinación con fungicidas durante el proceso de desinfección de explantes de *S. rebaudiana* para su establecimiento en condiciones *in vitro* (Debnath, 2008; Singh *et al.*, 2014; Khalil *et al.*, 2014). En este sentido, Debnath (2008)

Tabla 2. Establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Stevia rebaudiana* a los 14 días de cultivo (n=30).

| Trat. | Aplicación de fungicida | NaOCl (%) (v/v) | Tiempo (min) | Contaminación microbiana (%) | Supervivencia (%) |
|-------|-------------------------|-----------------|--------------|------------------------------|-------------------|
| 1 | No | 1.0 | 5 | 60.00 a | 75.00 b |
| 2 | No | 1.5 | 5 | 40.00 b | 46.67 d |
| 3 | No | 2.0 | 5 | 35.48 bc | 45.16 d |
| 4 | Si | 1.0 | 5 | 33.33 bc | 83.33 a |
| 5 | Si | 1.5 | 5 | 22.58 de | 67.74 bc |
| 6 | Si | 2.0 | 5 | 25.00 cd | 62.50 c |
| 7 | No | 1.0 | 10 | 43.33 b | 20.00 e |
| 8 | No | 1.5 | 10 | 30.00 cd | 16.67 f |
| 9 | No | 2.0 | 10 | 13.33 e | 10.00 g |
| 10 | Si | 1.0 | 10 | 20.00 de | 26.67 e |
| 11 | Si | 1.5 | 10 | 16.13 e | 12.90 g |
| 12 | Si | 2.0 | 10 | 16.67 e | 16.67 f |

Letras no comunes dentro de cada columna indican diferencias según prueba de Kruskal Wallis/ Mann Whitney para $p < 0.05$

describió hasta un 40% de explantes libres de contaminantes microbianos con el empleo de HgCl_2 , valor superior al alcanzado en el presente trabajo donde se usó NaOCl en combinación con el fungicida Previcure. Este resultado es considerado un aspecto positivo para el establecimiento *in vitro* al evitar el uso del HgCl_2 , agente altamente nocivo para la salud humana. También se ha empleado NaOCl al 1% (v/v) (Shatnawi *et al.*, 2011; Noordin *et al.*, 2012; Namdari *et al.*, 2015).

Multiplicación *in vitro*

El cultivo de los explantes en frascos de policarbamato ofreció la posibilidad colocar al menos 10 explantes juntos una vez establecidos.

La respuesta del tipo de explante (ápices y segmentos nodales) fue diferente cuando estos se cultivaron en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento (tratamiento control). De manera general, no se observó el desarrollo de brotes secundarios. Sin embargo, en los tratamientos evaluados con adición de reguladores de crecimiento tanto los ápices como los procedentes de segmentos nodales alcanzaron un desarrollo adecuado para realizar el subcultivo luego de dos semanas, con la consiguiente reducción en los tiempos de subcultivo. Esta respuesta incrementa el número de explantes que potencialmente son útiles para el proceso de enraizamiento en un sistema de producción comercial.

Los resultados mostraron que la adición de reguladores de crecimiento en todas las concentraciones consideradas indujo un

incremento significativo en número de brotes por explante con respecto al control cuando se emplearon ápices para la multiplicación (Tabla 3).

En el tratamiento al cual no se adicionaron reguladores de crecimiento las plántulas procedentes de ápices se elongaron sin que se evidenciara el desarrollo de brotes axilares para un promedio de 1.01 brotes por explante inicial (coeficiente de multiplicación). Mientras, para los tratamientos en los cuales se emplearon los reguladores de crecimiento fue superior a dos. En el tratamiento F (6-BAP 0.5 + AIB 0.5 mg l^{-1}) se alcanzó hasta tres (más de 30 brotes por frasco como se muestra en la tabla 3 sin diferencias significativas con los resultados del tratamiento E (6-BAP 0.5 + AIB 0.2 mg l^{-1}).

Sin embargo, la adición de los reguladores de crecimiento estudiados (6-BAP y AIB) al medio de cultivo causó una disminución en el número de brotes obtenidos a partir de los segmentos nodales con respecto al tratamiento control donde el promedio por explante fue de 1.93 (Tabla 3).

Los resultados mostraron que el número de brotes fue mayor cuando se usaron ápices como explantes y son sometidos a tratamientos con reguladores de crecimiento, lo cual puede ser consecuencia de la estimulación de las yemas axilares dada por la citoquinina (6-BAP). Paralelamente esto parece influenciar el acortamiento en la distancia entre los nudos de tal manera que puede apreciarse en las plántulas una disminución en su tamaño y en el número de nudos cuando se compara con el tratamiento control (datos no mostrados).

Tabla 3. Multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* en diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (primer subcultivo de multiplicación).

| Tratamiento | BAP (mg l^{-1}) | AIB (mg l^{-1}) | No. brotes por frasco | |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------|
| | | | Ápices | Seg. nodales |
| Control | 0.0 | 0.0 | 10.14 e | 19.33 a |
| A | 0.1 | 0.2 | 23.92 d | 12.99 b |
| B | 0.1 | 0.5 | 25.75 c | 12.58 bc |
| C | 0.2 | 0.2 | 29.33 b | 12.69 b |
| D | 0.2 | 0.5 | 28.95 b | 12.40 bc |
| E | 0.5 | 0.2 | 30.39 a | 12.08 c |
| F | 0.5 | 0.5 | 30.68 a | 12.62 bc |

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas para $p < 0.05$ según la prueba de rango múltiple LSD

Para el caso de los segmentos nodales el promedio fue mayor en el control, lo cual es consecuente con la dominancia del meristemo apical y su influencia en la elongación de la plántula y la inhibición del desarrollo de yemas axilares. La proporción de auxinas/citoquininas ha sido estudiada por jugar un papel fundamental en la regulación de procesos como el desarrollo de estructuras apicales y radicales, explicando cómo la dominancia apical tiene un efecto en la elongación de la planta (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

En relación con aspectos morfológicos de las plántulas propagadas en los diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento, se observó un buen desarrollo foliar. En algunos casos se presentó un engrosamiento de los tallos en relación con aquellos materiales vegetales cultivados en el tratamiento control. Eventualmente, se observó una coloración marrón-rojiza en el tallo y hojas de algunas plántulas, lo que podría explicarse por el acortamiento de su longitud, como consecuencia de la estimulación y desarrollo de brotes secundarios a partir de yemas axilares. Estas características desaparecieron cuando las plantas fueron colocadas en medio de cultivo sin presencia de reguladores de crecimiento con el objetivo de favorecer el incremento en la longitud de las plántulas y permitir el desarrollo de raíces.

La figura 1 muestra el desarrollo de plántulas a partir de ápices y segmentos nodales a las

cuatro semanas de cultivo. Se observa el buen desarrollo de ápices en los tratamientos donde se empleó el medio de cultivo con los reguladores de crecimiento en relación con el medio de cultivo control.

La multiplicación de estevia bajo condiciones *in vitro* ha sido descrita con anterioridad por diferentes autores lo cuales han evaluado diferentes condiciones y tipos de reguladores, (Sreedhar *et al.*, 2008; Laribi *et al.*, 2012; Shende y Manik, 2013; Singh *et al.*, 2014). El uso de reguladores de crecimiento como 6-BAP y el AIB ha sido descrito en la micropropagación de estevia en procesos de gran escala, usando concentraciones entre 0.5 a 3.0 mg l⁻¹ de 6-BAP y periodos de subcultivos de 21 días (Thiyagarajan y Venkatachalam, 2012). Otros autores como Namdari *et al.* (2015) describen la obtención de 7.82 ± 0.7 ápices en explantes de *S. rebaudiana* cultivadas en medio de cultivo MS con 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP y 0.25 mg l⁻¹ de kinetina durante cuatro semanas. Por su parte, Noordin *et al.* (2012) informaron que el uso de 0.5 mg l⁻¹ de BAP induce un alto número de brotes luego de tres semanas de cultivo, sin embargo también observaron la presencia de estructuras callosas en la base de los plántulas formadas lo que pudiera potencialmente influenciar la estabilidad genética en el proceso y su adaptación *ex vitro*. A diferencia de los resultados referidos, en esta investigación se utilizan concentraciones más bajas de 6-BAP sin la formación de estructuras callosas y adicionalmente es posible realizar subcultivos en un período más corto, cada dos semanas.

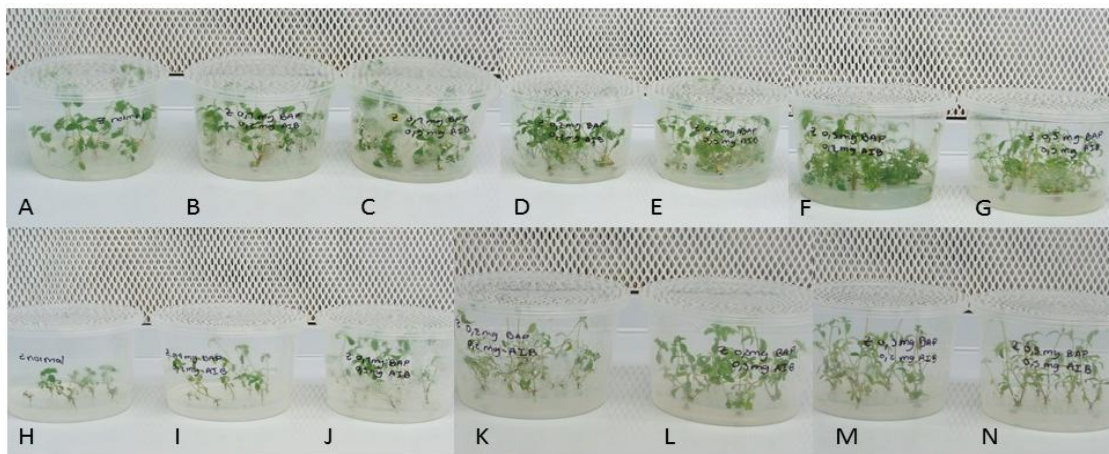


Figura 1. Desarrollo de plántulas de *Stevia rebaudiana* obtenidas a partir de ápices (Panel superior de A-G) y segmentos nodales (Panel inferior de H-N) a las dos semanas de cultivo, A, H: Medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. B, I: 6-BAP 0.1 + AIB 0.2 mg l⁻¹. C, J: 6-BAP 0.1 + AIB 0.5 mg l⁻¹. D, K: 6-BAP 0.2 + AIB 0.2 mg l⁻¹. E, L: 6-BAP 0.2 + AIB 0.5 mg l⁻¹. F, M: 6-BAP 0.5 + AIB 0.2 mg l⁻¹. G, N: 6-BAP 0.5 + AIB 0.5 mg l⁻¹.

Los resultados mostraron variaciones en el número de brotes por frasco a medida que se incrementó el número de subcultivos. La figura 2 muestra el efecto de los subcultivos sobre el número de brotes obtenidos en los diferentes tratamientos. Se observó que los tratamientos donde se emplearon reguladores del crecimiento formaron un grupo separado del tratamiento control en los dos tipos de explantes. Esta respuesta podría deberse a que en los tejidos vegetales se puede presentar un efecto acumulativo a consecuencia de la presencia de los reguladores del crecimiento

adicionados al medio de cultivo y el tiempo de permanencia de las plántulas en tales condiciones.

Después de tres subcultivos, desde lo cualitativo se observó en plántulas desarrolladas en medios de cultivo con 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP (tratamientos E y F) una disminución del tamaño foliar y un acortamiento de los tallos (Figura 3). Esta respuesta puede deberse a la acumulación de reguladores de crecimiento en las células. Las diferencias entre los subcultivos podrían deberse a fenómenos

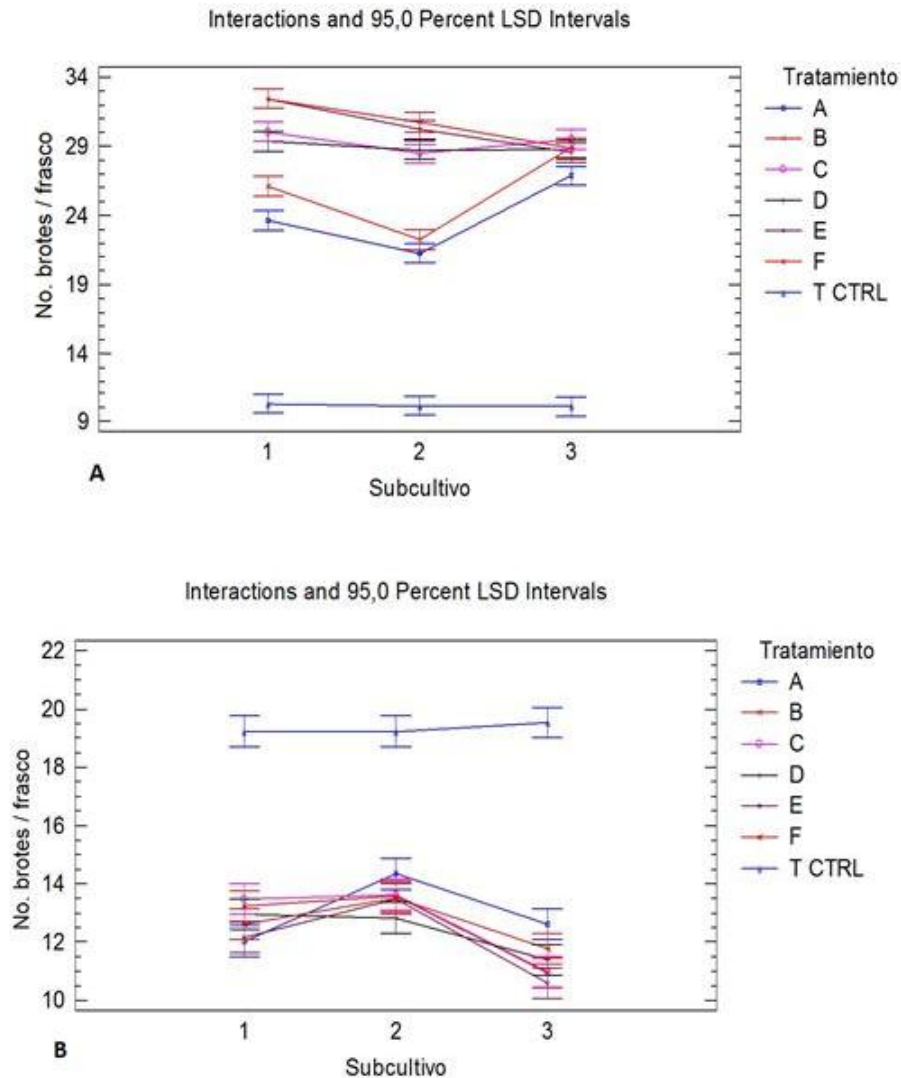


Figura 2. Efecto de los subcultivos en el número de brotes por frasco en la multiplicación de *S. rebaudiana* en presencia de diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento. A. ápices, B. segmentos nodales. Tratamientos: A (6-BAP 0.1 + AIB 0.2 mg l⁻¹), B (6-BAP 0.1 + AIB 0.5 mg l⁻¹), C (6-BAP 0.2 + AIB 0.2 mg l⁻¹), D (6-BAP 0.2 + AIB 0.5 mg l⁻¹), E (6-BAP 0.5 + AIB 0.2 mg l⁻¹), F (6-BAP 0.5 + AIB 0.5 mg l⁻¹), T CTRL (6-BAP 0 + AIB 0 mg l⁻¹).

de 'habituaación' de las plántulas a los constituyentes del medio de cultivo, razón por la cual de manera general se sugiere el uso de bajas concentraciones de reguladores de crecimiento. Respuestas similares han sido descritas con anterioridad por Ibrahim *et al.* (2008), quienes observaron un incremento en el número de brotes con una consecuente reducción en su longitud cuando emplearon 6-BAP (0.25 a 2.5 mg l⁻¹) durante varios subcultivos.

De manera cualitativa se observó que las plántulas al ser subcultivadas en medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento retornaban a una condición de normalidad, con elongación de tallos y formación de raíces.

Cuando los explantes de estevia son cultivados *in vitro* en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento, los segmentos nodales tardan al menos tres semanas en evidenciar un desarrollo de brotes, y al menos cinco semanas para obtener brotes con ápices aptos para cultivarlos en medios de cultivo para el enraizamiento. En este trabajo, el desarrollo de brotes a partir de segmentos nodales se presentó en menor tiempo cuando los explantes se cultivaron en presencia de los reguladores de crecimiento 6-BAP y AIB, por lo cual su corte y propagación se realizó luego de dos semanas. En este sentido, Laribi *et al.* (2012) también describen el desarrollo de brotes a partir de segmentos nodales en periodos de dos semanas cuando se cultivan las plántulas en medio de cultivo MS con 1.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, concentración que es 10 veces mayor a la descrita en el presente trabajo.

Resultados obtenidos en este trabajo, permitieron establecer que los brotes se formaron de manera directa, sin pasar por una fase intermedia de formación de callos, a diferencia de lo informado por Singh *et al.* (2014). Estos autores, en su investigación describen el uso de 6-BAP y AIB como promotores de la formación de brotes múltiples acompañada de estructuras callosas.

De otro lado, se considera que el uso de reguladores de crecimiento en bajas concentraciones puede ayudar a disminuir la posible variación somaclonal que pudiera presentarse en el proceso de propagación *in vitro*. Otros reguladores de tipo auxina han sido evaluados en combinación con 6-BAP. Al respecto, Rangappa y Aind (2013) evaluaron el efecto de 6-BAP (1.0 a 4.0 mg l⁻¹) en combinación con ANA (0.5 mg l⁻¹), encontrando su utilidad para la propagación de la especie. Estos estudios concuerdan con otros trabajos en los que se describe el uso de combinaciones de citoquinina/auxina para la propagación de explantes nodales de estevia (Thiyagarajan y Venkatachalam, 2012).

Enraizamiento *in vitro*

Los resultados durante la fase de enraizamiento mostraron que tanto la ausencia de reguladores de crecimiento como el uso de AIB lograron inducir la formación de raíces con porcentajes superiores al 60%. Se encontró que la adición de 0.5 mg l⁻¹ de AIB al medio de cultivo produjo un 76.67% de explantes enraizados (Tabla 4).

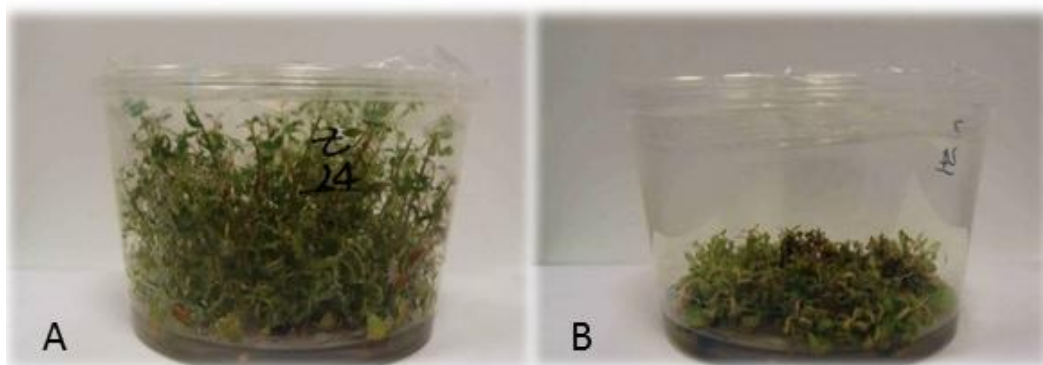


Figura 3. Plántulas de *Stevia rebaudiana* con tres subcultivos en medio de cultivo MS con 6-BAP. A, 0.1 y B, 0.5 mg l⁻¹.

Tabla 4. Efecto del AIB en el enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Stevia rebaudiana* a las cuatro semanas de cultivo (n=30).

| Tratamiento AIB (mg l ⁻¹) | Enraizamiento (%) | No. raíces/ explante |
|--|----------------------|-------------------------|
| 0 | 63.33 | 2.11 |
| 0.2 | 70.00 | 2.19 |
| 0.5 | 76.67 | 2.30 |
| 0.8 | 66.67 | 2.10 |

El AIB ha sido usado por otros autores para la inducción *in vitro* de raíces de estevia. En ellos se han evaluado concentraciones desde 0.001 hasta 1.5 mg l⁻¹ con hasta un 100% de inducción de raíces en los explantes luego de seis semanas de cultivo (Ibrahim *et al.*, 2008). Los resultados de este trabajo evidenciaron la formación de raíces a las cuatro semanas de cultivo en los diferentes tratamientos empleados, con reducción en el tiempo necesario para la inducción y formación de raíces según se describe en la literatura científica. Esto sumado a las ventajas alcanzadas en el proceso de multiplicación permite establecer una línea base útil en la implementación de la metodología de producción *in vitro* de plántulas de *S. rebaudiana*.

Estrategia para la propagación *in vitro* de *S. rebaudiana*

A partir de los resultados se propuso una estrategia para la producción de plántulas *in vitro* de estevia con potencial aplicación a escala comercial. A diferencia del empleo de medios de cultivo libres de reguladores de crecimiento (tratamiento control) que se han usado frecuentemente, se recomendó la adición de 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP y 0.2 mg l⁻¹ de AIB en la fase de multiplicación con un manejo por separado de ápices y segmentos nodales.

Dicha combinación de reguladores fue seleccionada por su potencial empleo en procesos productivos, dado en mayor medida por los efectos positivos en la multiplicación de las plántulas a bajas concentraciones y menor tiempo de subcultivo requerido. Esto, a escala productiva, podría contribuir a incrementar el número de plántulas propagadas, a mantener la fidelidad genética asociada a la

micropropagación acorde con lo descrito por Singh *et al.* (2014) y a la vez representa ahorros en insumos.

De los resultados, otro aspecto que puede beneficiar el proceso de multiplicación *in vitro* es el cultivo de los explantes en frascos de policarbamato, pues se conoce que el tipo de frasco de cultivo afecta la propagación *in vitro* de estevia y estos son los que más favorecen el proceso (Modi *et al.*, 2012) y a la vez contribuyen a la reducción de costos para el proceso productivo.

La Tabla 5 presenta la proyección estimada bajo las consideraciones previas y con las cuales puede establecerse que en el tratamiento control (sin reguladores del crecimiento) luego de cuatro semanas de cultivo se estima un número de 176.00 ápices y 308.8 segmentos nodales con un consumo de 1.0 litro de medio de cultivo. Comparativamente, al emplear el tratamiento con la combinación de 6-BAP y AIB, la estimación de la producción es mayor, con valores estimados de 913.9 ápices y 493.3 segmentos nodales con un consumo de 4.68 l de medio de cultivo (valor si se considera el medio de cultivo usado en el subcultivo de la segunda semana). La mayor diferencia se puede establecer al estimar la producción de ápices y segmentos nodales luego de ocho semanas del proceso. En este caso, el número de ápices estimados para el tratamiento control es de 193.60 mientras para el tratamiento con reguladores de crecimiento fue de 5220.49. Esta diferencia presenta una ventaja para el proceso de propagación de plántulas, pues en el caso de estevia los ápices son los explantes usados en el proceso de enraizamiento y aclimatización en condiciones *ex vitro*.

Tabla 5. Proyección estimada para la multiplicación de plántulas de *Stevia rebaudiana* en medio de cultivo MS durante ocho semanas de cultivo en un escalado comercial.

| Tratamiento | Semanas de cultivo | No. Ápices | No. Segmentos nodales | No. frascos | Litros de medio de cultivo requeridos en el subcultivo |
|--|--------------------|------------|-----------------------|-------------|--|
| Control | 0 | 160.00 | 0.00 | 16.00 | 1.00 |
| (sin reguladores de crecimiento) | 4 | 176.00 | 308.80 | 48.48 | 3.03 |
| | 8 | 193.60 | 595.98 | 78.96 | 4.93 |
| Medio de cultivo con reguladores de crecimiento | 0 | 160.00 | 0.00 | 16.00 | 1.00 |
| (6-BAP 0.1 mg l ⁻¹ + AIB 0.2 mg l ⁻¹) | 2 | 382.40 | 206.40 | 58.88 | 3.68 |
| | 4 | 913.94 | 493.30 | 140.72 | 8.80 |
| | 6 | 2184.31 | 1178.98 | 336.33 | 21.02 |
| | 8 | 5220.49 | 2817.76 | 803.82 | 50.24 |

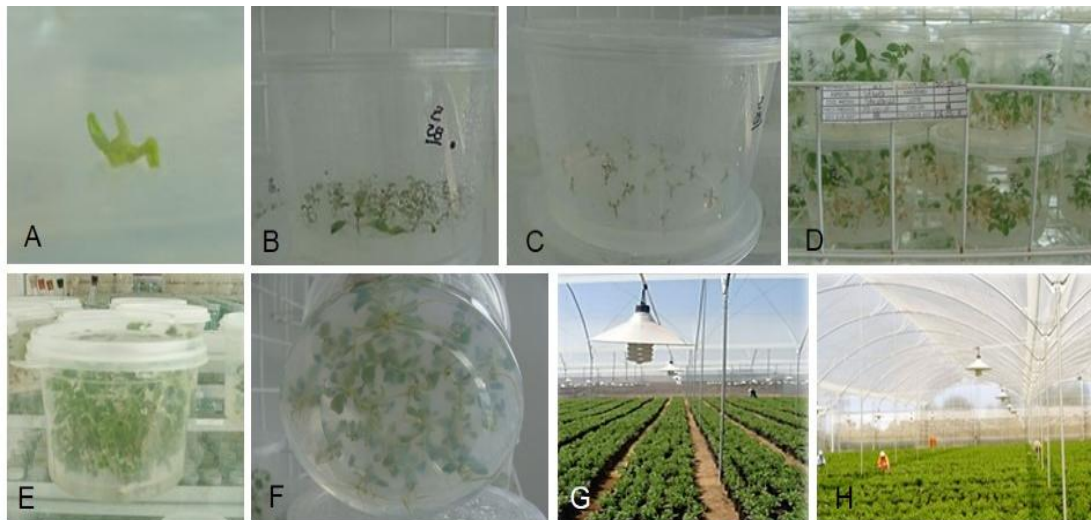


Figura 5. Propagación *in vitro* de plántulas de *Stevia rebaudiana* implementado en un sistema de producción comercial. A, establecimiento *in vitro*, ápice meristemático después de 21 días de cultivo. B-D, multiplicación *in vitro* en medio de cultivo con 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP y 0.2 mg l⁻¹ de AIB, ápices (B), segmentos nodales (C). E, plántulas después de 4 semanas de cultivo. F, ápices enraizados. G-H, aclimatización.

Los resultados y las estimaciones en cuanto al tiempo del proceso de producción descritos en este trabajo representan ventajas para un sistema productivo. Las proyecciones de producción de ápices que pueden potencialmente obtenerse al implementar el tratamiento con el uso de reguladores de crecimiento, permiten visualizar el impacto y los beneficios que pueden darse, para la producción comercial de plántulas de estevia en condiciones *in vitro*.

De esta manera, se propone un tiempo de dos semanas de permanencia en el medio cultivo MS con 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP y 0.2 mg l⁻¹ de AIB

antes de proceder al subcultivo. Posterior a ello, es posible subcultivar los explantes a medio de cultivo con igual composición. Es de considerar que en cada subcultivo es posible seleccionar los ápices para cultivarlos durante 4 semanas en medio de cultivo MS con 0.5 mg l⁻¹ de AIB, con el fin de inducir la formación de raíces y posteriormente continuar con su adaptación en condiciones *ex vitro*.

Este proceso fue implementado y aplicado en un sistema de producción comercial de plántulas (Figura 5). Fue posible proveer plántulas de estevia para la siembra de lotes de plantas madre, a partir de las cuales se

soportó la producción de dos millones de plántulas enraizadas semanales.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten proponer una estrategia que puede ser llevado a gran escala y emplearse en un proceso productivo para la propagación *in vitro* de plántulas de *Stevia rebaudiana*. Con la adición de reguladores de crecimiento 6-BAP y AIB al medio de cultivo empleado en la multiplicación se logra establecer diferencias significativas en el número de ápices obtenidos en comparación con el uso de medios de cultivos sin reguladores de crecimiento los cuales han sido empleados para la micropropagación de estevia.

REFERENCIAS

- Ali A, Gull I, Naz S, Afghan S (2010) Biochemical investigation during different stages of *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana*. Pakistan Journal of Botany 42(4):2827-2837
- Azcón-Bieto J, Talón M (2000) Fundamentos de Fisiología Vegetal. Interamericana McGraw-Hil de España, Barcelona; ISBN: 978-84-481-5168-3
- Carneiro JWP, Muniz AS, Guedes TA (1997) Greenhouse bedding plant production of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni. Canadian Journal of Plant Science 77:473-474
- Das A, Gantait S, Mandal N (2011) Micropropagation of an Elite Medicinal Plant: *Stevia rebaudiana* Bert. International Journal of Agricultural Research 6:40-48; doi: 10.3923/ijar.2011.40.48
- Giridhar P, Sowmya K (2010) Rapid clonal propagation and stevioside profiles of *Stevia rebaudiana* Bertoni. International Journal of Developmental Biology 4:47-52
- Ibrahim IA, Nasr MI, Mohammed BR, El-Zefzafi M (2008) Plant growth regulators affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. Sugar Tech 10(3):254-259; doi: 10.1007/s12355-008-0045-6.
- Junbi H, Amer A (2010) Biological properties of Stevia sweetener and egg replacers products on serum biochemical markers of diabetic rats International Journal of Nutrition and Metabolism 2(5):82-87
- Khalil SA, Zamir R, Ahmad N (2014) Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Saudi journal of biological sciences 21(6):566-573; doi: 10.1016/j.sjbs.2014.02.005
- Karimi M, Ahmadi A, Hashemi J, Abbasi A, Angelini LG (2014) Effect of two plant growth retardants on steviol glycosides content and antioxidant capacity in *Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni)*. Acta Physiologiae Plantarum 36(5):1211-1219; doi: 10.1007/s11738-014-1498-8
- Laribi B, Rouatbi N, Kouki K, Bettaieb T (2012) *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert.) - A non caloric sweetener and antidiabetic medicinal plant 2(2):333-339
- Lemus-Moncada R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, Kong AH (2012) *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry 132:1121-1132; doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140
- Millones C, Mori G, Bacalla J, Vásquez E, Tafur R (2014) Obtención de un filtrante de anís de monte (*Tagetes filifolia* Lag.) edulcorado con hojas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Scientia Agropecuaria 5:45-51
- Modi AR, Patil G, Kumar N, Singh AS, Subhash N (2012) A simple and efficient *in vitro* mass multiplication procedure for *Stevia rebaudiana* Bertoni and analysis of genetic fidelity of *in vitro* raised plants through RAPD. Sugar Tech 14(4):391-397; doi: 10.1007/s12355-012-0169-6
- Namdari N, Shooshtari L, Qaderi A (2015) *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Biological Forum 7(1):1750-1754
- Naidu C, Preethi D, Sridhar T (2011) Carbohydrate concentration influences on *in vitro* plant regeneration in *Stevia rebaudiana*. Journal of Phytology 3(5):61-64
- Noordin N, Ibrahim R, Sajahan NH, Nahar SMM, Nahar SHM, Rashid NRA (2012) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni through temporary immersion bioreactor system. Disponible en: http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/44/096/44096871.pdf. Consultado 25/02/16
- Pande S, Gupta P (2013) Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy 5(1):26-33
- Pedroza JW (2007) *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Stages of plant development. Canadian Journal of Plant Science 87(4):861-865
- Rangappa K, Aind DS (2013) High frequency multiplication of shoots using axillary buds for

- production of elite lines of *Stevia rebaudiana*. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4:781-784; doi: 10.4236/abb.2013.47102
- Sairkar P, Chandravanshi MK, Shukla NP, Mehrotra NN (2009) Mass production of an economically important medicinal plant *Stevia rebaudiana* using *in vitro* propagation techniques. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(4):266-270
- Shatnawi MA, Shibli RA, Abu-Romman SM, Al-Mazraawi MS, Al Ajlouni ZI, Shatanawi WA, Odeh WH (2011) Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 9(1):213-220
- Shende C, Manik S (2013) Direct regeneration from axillary bud explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni-A medicinal plant. *Journal of Agricultural Technology* 9(7):2015-2011
- Singh P, Dwivedi P, Atri N (2014) *In vitro* shoot multiplication of *Stevia* and assessment of stevioside content and genetic fidelity of the regenerants. *Sugar Tech* 16(4):430-439; doi: 10.1007/s12355-013-0292-z
- Sreedhar RV, Venkatachalam L, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Narayan MS, Ravishankar GA (2008) Direct organogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana* and cultivation in bioreactor. *Biologia Plantarum* 52(2):355-360; doi: 10.1007/s10535-008-0073-9
- Taware A (2010) Antimicrobial activity of different extracts of callus and tissue cultured plantlets of *Stevia Rebaudiana* (Bertoni). *Journal of Applied Sciences Research* 6(7):883
- Thiyagarajan M, Venkatachalam P (2012) Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. *Industrial Crops and Products* 37(1):111-117; doi:10.1016/j.indcrop.2011.10.037

Recibido: 26-05-2016

Aceptado: 23-06-2016