

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FCA
Facultad de
Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

TRABAJO DE DIPLOMA

Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de ápices de plantas cultivadas *ex vitro*

Autor: Dionys González Hernández

Tutores: Dra. C. Naivy Lisbet Pérez Alonso

Ms. C. Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz

Santa Clara, Mayo, 2018
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830
Teléfonos.: +53 01 42281503-1419



Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología



Tesis de Diploma

Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de ápices de plantas cultivadas *ex vitro*

Autor: Dionys González Hernández

Tutor: Dra. C. Naivy Lisbet Pérez Alonso

Ms. C. Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz

Santa Clara

2018



Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología



Tesis de Diploma

**Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de
ápices de plantas cultivadas *ex vitro***

Autor: Dionys González Hernández

Tutoras: Dra.C. Naivy Lisbet Pérez Alonso¹

Ms. C. Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz²

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. Dirección de correo electrónico: maivylisbet@gmail.com

² Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. Dirección de correo electrónico: kairuzhd@uclv.edu.cu

Santa Clara

2018

Fluctuat nec mergitur...

RESUMEN

Stevia rebaudiana Bertoni es una especie reconocida a nivel mundial por sus propiedades medicinales. Su cultivo y consumo se han incrementado, por el alto contenido de edulcorantes naturales no calóricos que presenta. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* a partir de explantes *ex vitro*. Se procedió a realizar el establecimiento *in vitro* de ápices, para lo cual se evaluó el efecto de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de desinfección. Los brotes establecidos fueron transferidos a medio de cultivo de multiplicación, donde se determinó el efecto de los reguladores de crecimiento y el número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación. Se evaluó la supervivencia de las plantas propagadas *in vitro* durante la fase de aclimatización *ex vitro*. Se compararon las plantas propagadas mediante corte de esquejes y las propagadas *in vitro*, empleando variables morfométricas y la técnica de RAPD. Se recomienda el empleo de hipoclorito de sodio al 1% durante 10-20 minutos para la desinfección de los explantes. La fase de multiplicación debe realizarse en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, durante cinco subcultivos cada 15 días. Es posible emplear diversas composiciones de sustrato durante la aclimatización *ex vitro* de las plantas propagadas *in vitro*. Estas desarrollaron mayor número de hojas y altura, que las propagadas convencionalmente. Ambos grupos mantienen la variabilidad genética intrínseca de la especie. El protocolo propuesto permite propagar *in vitro* plantas de *S. rebaudiana* en corto tiempo de manera sencilla.

Palabras clave: aclimatización, multiplicación, RAPD, reguladores de crecimiento

ABSTRACT

Stevia rebaudiana Bertoni is worldwide known specie for its medicinal properties. Its cultivation and consumption have increased, due to the high content of non-caloric natural sweeteners. The aim of this work was to develop an *in vitro* propagation protocol of *Stevia rebaudiana* Bertoni from *ex vitro* explants. To *in vitro* establishment, the effect of sodium hypochlorite concentration and disinfection time on the survival of the explant was evaluated. The established shoots were transferred to multiplication culture medium. In which growth regulators and number of subcultures effects over multiplication coefficient were determined. The survival of *in vitro* plants was evaluated using different substrates on acclimatization stage. Then, the response of the *in vitro* propagated plants during the acclimatization phase was evaluated, in comparison with plants propagated by conventional cuttings using morphologic variables. The variability of both was compared using the analysis of random amplification patterns of polymorphic DNA segments. The use of 1% sodium hypochlorite for 10-20 minutes is recommended for the disinfection process. The multiplication must be carried out in culture medium without growth regulators, during five subcultures every 15 days at the most. It is possible to employ various substrate compositions during the acclimatization of micropropagated plants. These developed a greater number of leaves and height, than those propagated conventionally. Both groups maintain the intrinsic genetic variability of the specie. The proposed protocol allows the *in vitro* propagation of *S. rebaudiana* plants, easily, in a short time.

Keywords: acclimatization, growth regulators, multiplication procedure, RAPD

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Stevia rebaudiana Bertoni. Clasificación taxonómica y características botánicas	4
2.1.1 Importancia económica	5
2.2 Métodos de propagación de Stevia rebaudiana.....	7
2.2.1 Propagación convencional	7
2.2.2 Propagación <i>in vitro</i>	8
2.2.3 Etapas de la propagación <i>in vitro</i>	9
2.2.4 Empleo de reguladores del crecimiento	10
2.2.5 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i>	11
2.2.6 Propagación vía organogénesis	14
2.3 Variaciones somaclonales	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Determinación de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición para el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices de <i>S. rebaudiana</i>	17
3.2 Determinación del efecto de los reguladores del crecimiento y del número de subcultivos en la multiplicación <i>in vitro</i> de Stevia rebaudiana	19
3.2.1 Determinación del efecto del 6-BAP y el AIA en la multiplicación de brotes <i>in vitro</i>	19
3.2.2 Determinación del efecto del número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación	20
3.3 Determinación de la influencia de diferentes sustratos sobre la supervivencia de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>S. rebaudiana</i> durante la fase de aclimatización <i>ex vitro</i>	20
3.4 Comparación de plantas de Stevia rebaudiana obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes	22
3.4.1 Evaluación de variables morfométricas de las plantas en aclimatización <i>ex vitro</i>	22
3.4.2 Comparación de los patrones de amplificación de ADN de las plantas obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes	22
4. RESULTADOS	26
4.1 Determinación de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición para el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices de <i>S. rebaudiana</i>	26

4.2 Determinación del efecto de los reguladores del crecimiento y del número de subcultivos en la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i>	29
4.2.1 Determinación del efecto del 6-BAP y el AIA en la multiplicación de brotes <i>in vitro</i>	29
4.2.2 Determinación del efecto del número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación	30
4.3 Determinación de la influencia de diferentes sustratos sobre la supervivencia de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>S. rebaudiana</i> durante la fase de aclimatización <i>ex vitro</i>	31
4.4 Comparación de plantas de <i>Stevia rebaudiana</i> obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes	32
4.4.1 Evaluación de variables morfológicas de las plantas en aclimatización <i>ex vitro</i>	32
4.4.2 Comparación de los patrones de amplificación de ADN de las plantas obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes	35
5. DISCUSIÓN.....	40
5.1 Determinación de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición para el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices de <i>S. rebaudiana</i>	40
5.2 Determinación del efecto de los reguladores del crecimiento y del número de subcultivos en la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i>	41
5.2.1 Determinación del efecto del 6-BAP y el AIA en la multiplicación de brotes <i>in vitro</i>	41
5.2.2 Determinación del efecto del número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación	43
5.3 Determinación de la influencia de diferentes sustratos sobre la supervivencia de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>S. rebaudiana</i> durante la fase de aclimatización <i>ex vitro</i>	45
5.4 Comparación de plantas de <i>Stevia rebaudiana</i> obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes	46
5.4.1 Evaluación de variables morfológicas de las plantas en aclimatización <i>ex vitro</i>	46
5.4.2 Comparación de los patrones de amplificación de ADN de las plantas obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes	47
CONCLUSIONES	50

RECOMENDACIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	52
Anexo 1: Protocolos de regeneración <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> vía organogénesis directa.....	59

1. INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni es una especie de la familia *Asteraceae*, nativa de la región tropical de Sudamérica. Por sus propiedades medicinales ha alcanzado gran importancia a nivel mundial. Su cultivo y consumo se han incrementado, por el alto contenido de edulcorantes naturales no calóricos (esteviósidos y rebaudiósidos) que presenta como metabolitos secundarios. Cuyo poder endulzante, es más de 300 veces mayor que el de la sacarosa (Flores y Cortés, 2011). Estos compuestos, además de presentar propiedades diuréticas y antimicrobianas, pueden ser ingeridos sin ningún tipo de peligro por pacientes con enfermedades que provocan trastornos del metabolismo de los carbohidratos como la diabetes mellitus.

La diabetes es una enfermedad cuya incidencia ha aumentado exponencialmente en las décadas pasadas, sobre todo en países con ingresos medios o bajos. La Organización Mundial de la Salud estimó en 2014 que cerca de 422 millones de personas adultas padecían diabetes en el mundo. Solo en 2012 se registró la muerte de 1,5 millones por causa directa de esta enfermedad, mientras que otros 2,2 millones murieron por causas asociadas al alto nivel de glucosa en sangre (WHO, 2016). En Cuba, a pesar del seguimiento médico y la atención social, este trastorno provoca la muerte de más de 2 200 personas al año (ONEI, 2016).

Las plantas de *Stevia* contienen una compleja mezcla de glucósidos naturales diterpénicos dulces (glucósidos de esteviol): esteviósido, esteviolbiosido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E y dulcosido A. El mayor contenido de esteviósidos se encuentra en las hojas, aunque son producidos por todas las partes verdes de la planta, lo que sugiere que estas sirven como el tejido principal para la síntesis y acumulación primaria de glucósidos de esteviol (Karimi *et al.*, 2014).

Aunque crezca preferiblemente en zonas subtropicales en Paraguay, Kenya, China y Estados Unidos, su progresiva demanda la ha convertido en un importante renglón comercial en Vietnam, Brasil, India, Argentina y Colombia entre otros (Soto y Del Val, 2002). Por sus propiedades medicinales es necesaria la domesticación, producción, estudios biotecnológicos y mejoramiento genético de esta planta. Sin embargo, varios autores enfocan sus estudios en el cultivo *in vitro* como método de propagación masiva. Esto se debe al hecho de que el rango de germinación de las semillas es bajo, que su floración esté condicionada por un descenso grande en la temperatura media y que la

reproducción asexual (por brotes o esquejes) limite la producción a un bajo número de individuos (Sivaram y Mukundan, 2003).

Dentro de las técnicas de cultivo *in vitro* empleadas en *Stevia*, se encuentran: la propagación *in vitro* por cultivo de hojas (Das *et al.*, 2011; Naidu *et al.*, 2011; Karimi *et al.*, 2014), de segmentos internodales (Laribi *et al.*, 2012; Shende y Manik, 2013; Singh *et al.*, 2014), de ápices (Miyagawa *et al.*, 1986; Anbazhagan *et al.*, 2010; Giridhar y Sowmya, 2010), de callos y suspensiones celulares (Sivaram y Mukundan, 2003), embriogénesis somática (Swanson *et al.*, 1992; Kornilova y Kalashnikova, 1996; Salim-Uddin *et al.*, 2006) y el cultivo de anteras (Flachslan *et al.*, 1996). Siendo los protocolos más eficientes y a la vez más extendidos aquellos que utilizan explantes vegetativos.

Otras investigaciones en esta especie se centraron en el estudio del metabolismo secundario y los genes involucrados en la biosíntesis de los mismos. Por otra parte, la biotecnología, y particularmente las técnicas de cultivo *in vitro*, tienen una aplicación potencial en la producción industrial de metabolitos bioactivos (Singh *et al.*, 2014).

En la literatura científica se hace referencia a problemas que son necesarios resolver. Los mismos se enmarcan en la formación de estructuras callosas en las plantas propagadas *in vitro* y períodos de subcultivos superiores a tres semanas con bajos coeficientes de multiplicación (Pande y Gupta, 2013). Por lo que continuar el desarrollo de protocolos más eficientes u optimizar los ya existentes, constituye una necesidad de primer orden en este tema. Además de que el desarrollo de un protocolo adaptado a las condiciones de Cuba, permitiría establecer una línea de producción y extracción de edulcorantes, que pudiera ayudar al proceso de sustitución de importaciones.

Otro problema en la propagación *in vitro* es la aparición de variaciones somaclonales durante el cultivo de células y tejidos. Entre las que se encuentran las influencias epigenéticas o cambios en la organización del crecimiento (Karp, 1995). La identificación de estas variaciones en etapas tempranas, así como la disminución de su frecuencia de aparición, son elementos primordiales para el control de la calidad durante el desarrollo de cualquier protocolo de propagación *in vitro*. La Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés), ha sido utilizada con mucho éxito para detectar polimorfismo genético y describir las variaciones somaclonales en individuos regenerados de diversas plantas, entre ellas varias especies de *Stevia* (Moktaduzzaman y Mahbubur-Rahman, 2009; Modi *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta la problemática planteada anteriormente se establece como **hipótesis**: Es posible obtener plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni vía organogénesis a partir de ápices de plantas *ex vitro* si se determinan las condiciones de establecimiento, multiplicación y aclimatización *ex vitro*.

Objetivo general:

- Obtener plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de ápices de plantas cultivadas *ex vitro*.

Objetivos Específicos:

1. Determinar la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición para el establecimiento *in vitro* de ápices de *S. rebaudiana*.
2. Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento y el número de subcultivos en la multiplicación *in vitro* de *S. rebaudiana*.
3. Determinar la influencia de diferentes sustratos sobre la supervivencia de plantas propagadas *in vitro* de *S. rebaudiana* durante la fase de aclimatización *ex vitro*.
4. Comparar las plantas de *S. rebaudiana* obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes, empleando variables morfométricas y patrones de amplificación aleatoria de segmentos polimórficos de ADN.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Stevia rebaudiana* Bertoni. Clasificación taxonómica y características botánicas

El primer investigador en ubicar taxonómicamente a *Stevia rebaudiana* fue Moisés S. Bertoni, quien la llamó *Eupatorium rebaudianum*. Su ubicación taxonómica actual se acepta de la siguiente forma, según NCBI *Taxonomy* (NCBI, 2017):

Reino: *Plantae*

Phylum: *Streptophyta*

División: *Magnoliophyta*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Tribu: *Eupatorieae*

Género: *Stevia*

Especie: *Stevia rebaudiana*.

Es conocida comúnmente en español como Stevia, Estevia, KaaHee, Caaje, hoja dulce de Paraguay, hoja de caramelo, hierba de miel, dulce hierba y planta de los diabéticos.

Stevia rebaudiana, es nativa de la región tropical de Sudamérica, específicamente de Paraguay, Brasil y el noreste de Argentina (Soto y Del Val, 2002). Aunque en la actualidad su rango geográfico abarca desde Estados Unidos a Argentina y el alto Brasil (Gantait *et al.*, 2017).

Es una planta perenne, herbácea, que alcanza generalmente entre 30 y 85 cm de altura, con tallos secundarios basales; aunque en estado salvaje suele ser rastrera y menos ramificada. Las raíces son fibrosas y filiformes, rara vez ramificadas. Presenta hojas simples, alternas, dentadas, lanceoladas a oblongas, de color verde oscuro brillante y superficie rugosa; a veces algo vellosas, de hasta 5 cm de largo por 2 cm de ancho (Gantait *et al.*, 2017).

Sus flores son pequeñas, tubulares y blancas, sin fragancia. Es mayormente polinizada por abejas. Es auto incompatible y requiere de fecundación cruzada. Para la inducción de la floración requiere de un período constante de bajas temperaturas, tras el cual, florecerá en la próxima primavera. El fruto es un aquenio que puede ser de coloración parda clara si es estéril u oscura si es fértil y es dispersado por el viento (Alhady, 2011).

La planta se favorece con la materia orgánica de los suelos y es capaz de adaptarse a un amplio rango de pH de los mismos. Su cultivo se realiza en una amplia gama de suelos, aunque de manera natural, crece tanto en suelos de baja fertilidad, ácidos, arenosos como en orgánicos y con alta humedad. El suelo ideal recomendado para su cultivo es el areno-arcilloso con regular proporción de humus (Aguirre-Dávila, 2008).

Además, requiere días largos, alta intensidad solar y encuentra su óptimo crecimiento a temperaturas entre los 20 y 26 °C (Jiménez Quesada, 2011). Generalmente, llega a rebrotar cada primavera desde debajo de las raíces, durante cuatro ó cinco años.

La planta es afectada por los períodos prolongados de sequía, por las características de su sistema radical. Su desarrollo se potencia en condiciones donde la estación de crecimiento es larga y la intensidad de luz es alta, con temperaturas medias sobre los 20-25 °C, riesgos mínimos de heladas luego de la brotación y sin períodos de larga sequía. Los fotoperíodos largos aumentan la longitud de los entrenudos, el área foliar, la masa seca y aceleran la aparición de hojas (Aguirre-Dávila, 2008).

2.1.1 Importancia económica

S. rebaudiana ha sido utilizada ancestralmente por los indios guaraníes para endulzar el Mate. En la actualidad, su cultivo y consumo se han incrementado extendiéndose a países como Canadá, Estados Unidos, México, Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay, Chile, Bolivia, Italia, Alemania, India, China, Malasia, Singapur, Corea del Sur, Taiwán, Tailandia y Japón, entre otros (Gantait *et al.*, 2014). Su característica más atractiva es el alto contenido de glucósidos de esteviol que produce (Figura 1). Entre los cuales destacan edulcorantes naturales no calóricos (*esteviósidos* y *rebaudiósidos*), cuyo poder es más de 300 veces mayor que el de la sacarosa (Flores y Cortés, 2011).

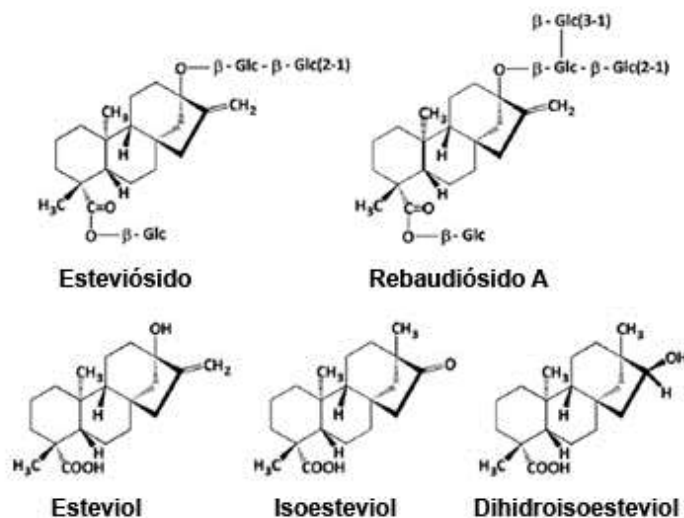


Figura 1. Estructura química del esteviol y algunos compuestos relacionados. Modificado de Chatsudthipong y Muanprasat (2009)

Cerca de 230 especies se agrupan dentro del género *Stevia*, de las cuales solo producen, glucósidos de esteviol: *S. phlebophylla* y *S. rebaudiana* (Ali *et al.*, 2010). La síntesis de estos compuestos está relegada únicamente a las zonas verdes de la planta (Tabla I), luego el mayor contenido se produce en las hojas; lo que sugiere que estas constituyen el principal órgano para la síntesis y acumulación primaria de glucósidos de esteviol. Estos compuestos, representan alternativas naturales para los alimentos endulzados sintéticamente y constituyen posibilidades esperanzadoras para pacientes con trastornos metabólicos relacionados con los carbohidratos.

Tabla I: Glucósidos naturales diterpénicos, presentes en *Stevia* a diferentes concentraciones (Karimi *et al.*, 2014)

Glucósidos	Concentración
esteviósido	(4-13%)
esteviolbósido	(trazas)
rebaudiósido A	(2-4%)
rebaudiósido B	(trazas)
rebaudiósido C	(1-2%)
rebaudiósido D	(trazas)
rebaudiósido E	(trazas)
dulcósido A	(0,4-0,7%)

Se estima que *S. rebaudiana* consta con más de 144 variedades a nivel mundial (Soto y Del Val, 2002). Además la planta, contiene carbohidratos, proteínas, fibra, hierro, fósforo, calcio, potasio, zinc y vitaminas A y C. No existen evidencias documentadas de efectos secundarios de ninguna clase (mutagénicos o negativos) (Aguirre-Dávila, 2008).

Además de su uso como edulcorantes y como sustituto para pacientes diabéticos, los glucósidos de esteviol se emplean en concentrados como suplemento alimenticio para animales y plantas, como tratamiento para suelos estériles, y como terapias medicinales por sus propiedades diuréticas, para regular la hipertensión y la mala circulación (Sivaram y Mukundan, 2003).

Incluso, otras investigaciones señalan una posible actividad antiácida, antioxidante, cicatrizante, cosmética, desintoxicante y digestiva (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009). Refieren también su capacidad de actuar como antibiótico contra las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y la levadura *Candida albicans* (Jiménez Quesada, 2011).

2.2 Métodos de propagación de *Stevia rebaudiana*

2.2.1 Propagación convencional

La reproducción sexual de *Stevia rebaudiana* es limitada, pues el rango de germinación de las semillas es generalmente pobre, menos del 10% (Yadav *et al.*, 2011). Este disminuye significativamente según aumente la salinidad del sustrato (Liopa-Tsakalidi *et al.*, 2012).

Es auto-incompatible, con presencia de agamospermia en algunos genotipos. La mayoría de los miembros del género *Stevia* son diploides, aunque se han informado varios ejemplos de tri- y tetraploidías. Debido a anomalías cromosómicas durante el proceso de gametogénesis, estos muestran un alto grado de esterilidad masculina (Gantait *et al.*, 2017). La reproducción por brotes presenta buenas tasas de supervivencia, pero está limitada, a su vez, al bajo número de brotes que produzca cada planta (de cuatro a seis en cada rebrote).

Por su parte, la reproducción vegetativa por esquejes de ramas secundarias, terciarias y cuaternarias, presenta elevados índices de eficacia. Se seleccionan preferentemente esquejes de ramas de más de cinco pares de hojas opuestas y de cerca de 10 cm de longitud; que serán sembrados durante los meses de inicio de las lluvias, con los dos primeros pares de hojas por debajo del suelo (Salgado-Cordero, 2013).

Sin embargo es el cultivo de tejidos, el método que por excelencia, presenta una posibilidad de extender la producción a escala industrial, manteniendo una uniformidad relativa y un incremento en la velocidad de la multiplicación clonal (Das *et al.*, 2011).

2.2.2 Propagación *in vitro*

El cultivo *in vitro* es, según George (2008), un conjunto de técnicas que permiten el desarrollo de células y fragmentos de tejidos hasta tejidos completos o pequeños brotes, en un ambiente reducido y controlado. Estos se desarrollan en condiciones asépticas, con tasas de multiplicación, rendimiento y uniformidad elevadas, y sin restricciones temporales.

La propagación *in vitro* permite alcanzar ciertas ventajas: Los cultivos iniciales se establecen a partir de pequeños segmentos de la planta (explantes), que se mantienen en condiciones de asepsia. Es posible ajustar y controlar la cantidad de nutrientes y reguladores de crecimiento disponibles para la planta, así como las condiciones de luz y temperatura. Se obtienen un gran número de plántulas en períodos cortos de tiempo en comparación con la macropropagación. Se pueden obtener clones de plantas de difícil propagación vegetativa o que poseen características de interés. El crecimiento es continuo a lo largo del año sin hacer diferenciación por las estaciones climáticas al crecer en cámaras de crecimiento con las condiciones controladas (temperatura, humedad). Se requiere menos espacio y mantenimiento para la propagación que en los métodos tradicionales. Por último, se puede diagnosticar y mantener la sanidad del cultivo (George y Debergh, 2008).

Cada tipo de plantas requiere variaciones en los medios de cultivo, tanto en su composición como en su consistencia. Cada especie tiene requerimientos nutricionales específicos, así como de factores físicos como luz, temperatura y fotoperiodo. También de factores químicos como el pH, compuestos orgánicos e inorgánicos, reguladores de crecimiento e incluso el estado físico del medio de cultivo (semisólidos o líquidos) (George, 2008; George y de Klerk, 2008).

Las principales reservas contra el cultivo *in vitro* están dadas por la similitud genética de las plantas obtenidas, que hace vulnerable a toda una producción contra un patógeno específico. Además de los recursos necesarios para su implementación, y de las especificidades de cada especie para una multiplicación óptima (Bespalhok-Filho *et al.*, 1992).

2.2.3 Etapas de la propagación *in vitro*

Generalmente la propagación *in vitro* se realiza en cinco fases (Jiménez, 1998; Orellana, 1998; Clemente, 1999):

Fase 0- Selección de las plantas donadoras de explantes

Fase 1- Desinfección y establecimiento del medio de cultivo con los explantes iniciales bajo condiciones de asepsia

Fase 2- Multiplicación, por yemas axilares o adventicias

Fase 3- Crecimiento de tallos y enraizamiento

Fase 4- Aclimatización a condiciones *ex vitro*, mediante progresivos cambios de la temperatura, luz y humedad

Fase de selección o Fase 0

Para la implementación de un sistema de propagación *in vitro* eficiente y repetible, es necesario, realizar correctamente esta fase. En esta fase se selecciona la planta donadora de los explantes y se determinan todas las condiciones para el posterior establecimiento (Gómez-García, 2013).

Según George y Debergh (2008) el objetivo es garantizar un banco de plantas donantes de alta calidad genética y disminuir los niveles de contaminación microbiana durante el establecimiento. Así como aumentar la eficiencia de todo el proceso y la repetibilidad del mismo.

Fase de establecimiento o Fase I

El objetivo de esta fase es establecer el explante (fisiológicamente vigoroso y libre de contaminación) para la posterior multiplicación. Los factores que más influyen en la efectividad del establecimiento son: el tejido vegetal seleccionado, el protocolo de desinfección a utilizar y el medio de cultivo (Gómez-García, 2013).

Los explantes jóvenes o procedentes de zonas de crecimiento activas presentan mayor desarrollo. Para desinfectar superficialmente los explantes se utilizan varios compuestos químicos: con mayor frecuencia el etanol 70% y el hipoclorito de sodio; con menor frecuencia el hipoclorito de calcio y el bicloruro de mercurio (Jiménez, 1998).

Fase de multiplicación o Fase II

La fase de multiplicación por yemas axilares o adventicias es una de las más importantes desde el punto de vista productivo. En esta fase se incrementa el número de brotes ya establecidos mediante subcultivos y resiembras periódicas; aumentando el número de plantas en cada subcultivo (Singh *et al.*, 2014).

La cantidad de plantas obtenidas, la frecuencia de los subcultivos y el número máximo de estos, así como el coeficiente de multiplicación, dependen de la especie vegetal y en menor medida, de las condiciones del medio de cultivo (Gómez-García, 2013).

Fase de enraizamiento o Fase III

En esta fase, los brotes deben ser cultivados y manipulados *in vitro* hasta alcanzar el desarrollo de un sistema radical funcional, que les permita comenzar la absorción de nutrientes al ser trasplantados a un sustrato enriquecido. Para ello, se transfieren a un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento, con auxinas o con elevadas concentraciones de sacarosa (Mroginski *et al.*, 2004).

Fase de aclimatización o Fase IV

Esta fase consiste en el traspaso de las plantas regeneradas de las condiciones aséptica *in vitro*, a suelo y posterior adaptación al ambiente. Los factores más importantes en este paso son precisamente el encuentro con los microorganismos y la presencia de un sistema radical bien desarrollado (Aguirre-Dávila, 2008).

Esta fase presenta una gran importancia ya que asegura el desempeño que tendrá la planta en campo, durante el resto de su vida. Una elevada humedad relativa y una baja intensidad luminosa benefician a las plantas especialmente en los días posteriores al trasplante (Cifuentes-Hidalgo, 2003).

2.2.4 Empleo de reguladores del crecimiento

Para el cultivo *in vitro*, se emplean diferentes tipos de sustancias que actúan como reguladores del crecimiento (auxinas, citoquininas). Aunque los brotes en crecimiento son capaces de sintetizar pequeñas cantidades de estos compuestos; estos son insuficientes para soportar el desarrollo y crecimiento en estas condiciones. Por lo que más del 85% de

los medios de cultivo empleados en la propagación *in vitro* incluyen como suplemento algún tipo de regulador del crecimiento (Quiala *et al.*, 2004).

Las funciones principales de estas sustancias según Nomberto (2001) son: la inducción o rompimiento de la dominancia apical, aumento del crecimiento de los tallos, promoción de la división celular en el *procambium* vascular, diferenciación del xilema secundario, estimulación de la formación de raíces adventicias. Así como el desarrollo de frutos (partenocárpicos en ocasiones), la inducción de fototropismo, la promoción de la floración en algunas especies; y por último, inducir la síntesis de etileno (favoreciendo el cuaje y la maduración de los frutos) y la inhibición de la abscisión o caída de estos.

Aunque estos compuestos son ampliamente utilizados en el cultivo *in vitro*, por su funcionalidad y capacidad de mejorar el crecimiento y desarrollo, también pueden resultar, en ocasiones, inhibitorios, según su concentración. Algunos pueden provocar malformaciones en los nuevos tejidos, inducir la aparición de variaciones somaclonales y otros pueden afectar la translocación de compuestos solubles nitrogenados (Aguirre-Dávila, 2008).

Según la literatura, el uso de estos compuestos favorece el proceso, a pesar de sus limitaciones. Aparece reflejado también que sus concentraciones resultan ser el punto crítico que define su rendimiento óptimo, su papel beneficioso, o su carácter tóxico. Por eso es necesario evaluar el papel de distintas concentraciones de reguladores de crecimiento, en solitario, y en acción conjunta.

2.2.5 Cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana*

Por su importancia, los investigadores han implementado diversas técnicas para la propagación de *Stevia* a través del cultivo *in vitro* de diferentes tipos de tejidos. Dentro de las más utilizadas, destacan: la propagación clonal por cultivo de ápices, la inducción de brotes múltiples a partir de explantes nodales, el cultivo de establecimiento de callos, el establecimiento de cultivos de suspensión, la embriogénesis somática y el cultivo de anteras.

La propagación clonal por cultivo de ápices ha sido abordada utilizando ápices con algunos primordios foliares en medio de cultivo con agar LS (Linsmaier y Skoog, 1967) con altas concentraciones de kinetina (10 mg.L^{-1}) (Tamura *et al.*, 1984). También se ha descrito la alternativa del cultivo de puntas de brotes en medio de cultivo MS (Murashige y

Skoog, 1962) compuesto por kinetina (2 mg.L^{-1}) (Das *et al.*, 2011). Se comprobó además que la inducción de raíces era posible solo con el empleo del medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento (Pande y Gupta, 2013).

El cultivo de fragmentos internodales ha sido implementado principalmente en medio de cultivo MS con varias concentraciones de auxinas y citoquininas (AIA (ácido índol-3-acético), 6-bencilaminopurina (6-BAP), kinetina y N6-(2-Isopentenil)-adenina)). En estos se obtuvieron los mejores resultados con combinaciones de kinetina ($0,5\text{-}10 \text{ mg.L}^{-1}$) y de AIA (2 mg.L^{-1}) o de 6-BAP ($1,5\text{-}2 \text{ mg.L}^{-1}$) (Yang *et al.*, 1981). Se ha informado que el tipo de citoquinina resulta ser el factor más importante que afecta la inducción de brotes múltiples (Alhady, 2011). Para el enraizamiento se ha empleado medio de cultivo MS con adiciones de ácido naftalenacético (ANA) ($1\text{-}10 \text{ mg.L}^{-1}$), AIA ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) o AIB (ácido indol-3-butírico) ($1\text{-}2 \text{ mg.L}^{-1}$) (Pande y Gupta, 2013). Otros trabajos que destacan en este tema son los de (Laribi *et al.* (2012); Shende y Manik (2013); Singh *et al.* (2014)).

También aparecen otras alternativas como: siembra en medio de cultivo MS líquido a la mitad de su concentración y kinetina (Delvalle-Báez, 2001); y el empleo de sistemas de inmersión temporal tipo RITA (Recipiente de Inmersión Temporal Automatizada) durante 5 minutos cada 8 horas (Jiménez Quesada, 2011). Estas investigaciones refieren haber alcanzado gran número de brotes por explante.

Diversos estudios (Handro *et al.*, 1977; Kornilova y Kalashnikova, 1996; Salim-Uddin *et al.*, 2006) con diferentes tipos de explantes y disímiles concentraciones de reguladores del crecimiento, determinaron que la materia prima ideal para la formación de callos son los explantes de hojas. Así como que el medio de cultivo óptimo debe estar compuesto por sales MS enriquecido con 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) ($1\text{-}3 \text{ mg.L}^{-1}$) y ANA ($0,75 \text{ mg.L}^{-1}$) (Pande y Gupta, 2013).

Estas especificidades permiten obtener gran número de callos en relativamente poco tiempo, además el crecimiento de las plantas y el contenido de esteviósidos son más uniformes que en las plantas obtenidas por semillas (Yadav *et al.*, 2011). A pesar de ello, la inducción y el crecimiento de callos está influenciado por varios factores externos e internos, de los cuales, los nutrientes minerales y los reguladores de crecimiento exógenos son los más importantes.

El cultivo de suspensiones celulares en *Stevia* (Ferreira y Handro, 1988; Sivaram y Mukundan, 2003), se ha obtenido a partir de callos óptimos en medio de cultivo líquido con 6-BAP ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) y 2,4-D ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Pande y Gupta (2013) sugieren que en esta área se requieren estudios de mayor profundidad, pues los existentes muestran que a pesar de ser una técnica ideal para la producción a gran escala, exhibe altos índices de inestabilidad genética.

En la embriogénesis somática, los trabajos se han dividido en dos grupos principales según el explante inicial utilizado: a partir de explantes vegetativos (principalmente hojas) (Bespalkhok-Filho *et al.*, 1993) y a partir de explantes reproductivos (flores) (Miyagawa *et al.*, 1984; Bespalkhok-Filho y Hattori, 1997). Ambos procedimientos, obtuvieron los mejores resultados en un medio de cultivo basal, con adiciones de 2,4-D ($2,21\text{-}5,52 \text{ mg.L}^{-1}$) y 6-BAP ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$) para las hojas y con 2,4-D (4 mg.L^{-1}) y kinetina ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) para las flores.

El callo con estructuras embriogénicas óptimo fue descrito con coloración verde brillante o amarillo brillante, de estructura compacta y con varios embriones somáticos globulares en la superficie (Yadav *et al.*, 2011). Aunque otras investigaciones se han desarrollado en estas líneas (Swanson *et al.*, 1992; Kornilova y Kalashnikova, 1996; Salim-Uddin *et al.*, 2006), la literatura especializada reconoce que es necesario continuar profundizando en el desarrollo de protocolos cada vez más eficientes para la regeneración de *Stevia* por esta vía.

El cultivo de anteras, por su parte, es un método mediante el cual se pueden desarrollar plantas homocigóticas con altos contenidos de glucósidos. Para ello son cultivadas anteras inmaduras procedentes de una población diferenciada, usualmente al inicio de un programa de reproducción (Yadav *et al.*, 2011).

Las anteras, según Flachslund *et al.* (1996), fueron inducidas a formar callos en medio de cultivo MS con $0,1\text{-}1 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP, luego estos regeneraron brotes tras su paso a un medio de cultivo fresco con iguales condiciones. Finalmente, los brotes formaron raíces al ser expuestos a un medio con ANA ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$). Yadav *et al.* (2011) y Pande y Gupta (2013) coinciden en que esta es otra de las áreas que requiere mayor profundidad de estudios.

Los trabajos realizados con *Stevia*, respecto al cultivo *in vitro* son numerosos y funcionales; ofreciendo alternativas plausibles para realizar una propagación *in vitro* efectiva de esta planta. Sin embargo, en función del ahorro de recursos y del tiempo, la propagación vía organogénesis directa, es la variante más práctica y eficiente, para la propagación *in vitro* de *S. rebaudiana*.

2.2.6 Propagación vía organogénesis

La propagación *in vitro* vía organogénesis, consiste en la multiplicación de brotes axilares, mediante el cultivo de ápices o meristemas (Gómez-García, 2013). Las ventajas de este sistema son varias: obtención de altos coeficientes de multiplicación, introducción rápida de nuevas variedades o clones, permite realizar una producción independiente de las condiciones ambientales, incremento en los rendimientos de las plantas regeneradas *in vitro* debido al rejuvenecimiento y al saneamiento. Además las plantas obtenidas pueden presentar alta estabilidad genética y gran uniformidad (Jiménez, 1998).

En *Stevia*, la regeneración vía organogénesis (Anexo 1) se ha obtenido a partir de diferentes explantes, como hojas (Yang y Chang, 1979; Sivaram y Mukundan, 2003; Anbazhagan *et al.*, 2010), segmentos de nodos (Laribi *et al.*, 2012; Modi *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2014), brotes axilares (Bespalkhok-Filho *et al.*, 1992; Anbazhagan *et al.*, 2010), puntas de ápices (Tamura *et al.*, 1984), cultivos de suspensiones (Ferreira y Handro, 1988), cultivos de anteras (Flachslan *et al.*, 1996) y cultivos de capas celulares delgadas (Ramírez-Mosqueda y Iglesias-Andreu, 2015).

2.3 Variaciones somaclonales

Las variaciones somaclonales aparecen durante el cultivo de tejidos, en forma de metilaciones de ADN, rearrreglos cromosómicos o mutaciones puntuales (Gantait *et al.*, 2014). Estas se manifiestan como resultado de influencias epigenéticas o cambios en la organización del crecimiento (Karp, 1995). La identificación de estas variaciones en estadíos tempranos, así como la disminución de su frecuencia de aparición son elementos primordiales para el control de la calidad durante el desarrollo de cualquier protocolo de multiplicación.

Existen diversas técnicas empleadas para determinar las variaciones somaclonales (Yadav *et al.*, 2017). Estas incluyen el uso de diversos marcadores moleculares para determinar polimorfismos genéticos como: los marcadores basados en hibridación de

ADN, los basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y los específicos basados en secuenciación de ADN. Los marcadores basados en hibridación de ADN son los Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs) y las huellas específicas de oligonucleótidos. Dentro de los marcadores basados en PCR se encuentran la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés), la Repetición de Secuencia Simple o microsatélites (SSRs) y los polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLPs). Mientras que el principal marcador específico basado en secuenciación de ADN es el análisis de polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs).

La Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico, es un procedimiento a base de PCR. Los marcadores RAPD son generalmente fragmentos dominantes que exhiben polimorfismos entre los individuos, indicándolo mediante la presencia o ausencia de un fragmento en particular. El análisis mediante RAPD ha sido utilizado extensivamente para varios propósitos que incluyen identificación y clasificación de antecesoros, identificación de híbridos y análisis de diversidad genética (Kumari y Thakur, 2014)

La técnica RAPD estándar utiliza como cebadores pequeños oligonucleótidos sintéticos (10 pb) de secuencias aleatorias, para amplificar cantidades pequeñas del ADN genómico total bajo las condiciones del PCR. Los productos amplificados, generalmente son separados en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio (Kumari y Thakur, 2014).

En *Stevia*, la técnica RAPD ha sido utilizada con mucho éxito para detectar polimorfismos genéticos y describir las variaciones somaclonales en individuos regenerados (Moktaduzzaman y Mahbubur-Rahman, 2009; Modi *et al.*, 2012). Así como para la construcción de mapas genéticos y análisis de parentesco (Yao *et al.*, 1999). Por sus resultados favorables ya demostrados con la especie en cuestión y la simplicidad y bajo costo de su implementación, es una técnica recomendable para determinar si existe estabilidad genética en las plantas propagadas *in vitro*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue realizada en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Este estudio se efectuó en el período comprendido entre septiembre del 2016 y febrero del 2018.

Procedimientos generales

Material vegetal

En esta investigación se utilizó como material vegetal inicial brotes de plantas de *S. rebaudiana*, provenientes del Banco de Germoplasma del IBP donadas por el Grupo Empresarial LABIOFAM y mantenidas en casa de cultivo a 30 ± 2 °C, con humedad relativa del 70%, un flujo de fotones fotosintéticos entre 224 y 457 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y frecuencia de riego de 3,0 min de duración dos veces al día. A dichas plantas se les realizaba manejo cultural basado en limpieza de malezas y aplicación de fungicida.

Para el establecimiento *in vitro* de *S. rebaudiana*, se seleccionaron las plantas más vigorosas teniendo en cuenta sus condiciones fisiológicas, coloración y sanidad. Luego se extrajeron los ápices caulinares con cortes de 5-7 cm por debajo de la punta de cada tallo, manteniendo las hojas. Posteriormente fueron llevados al laboratorio, donde se procedió a la desinfección.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo en estado semisólido se dosificaron a razón de 30 mL en frascos de vidrio con volumen total de 250 mL. El pH de los medios de cultivo fue de 5,7 y se ajustó antes de la esterilización en autoclave con NaOH 1,0 N y HCl 1,0 N. Los medios y frascos de cultivo utilizados en este trabajo fueron esterilizados en autoclave vertical a 121 °C y 1,2 kg cm^{-2} de presión por tiempos que variaron en dependencia del volumen de medio de cultivo a esterilizar. Los platos metálicos para el trabajo en la cabina de flujo laminar, fueron esterilizados en la estufa a 180 °C durante 2 h.

El instrumental (pinzas y bisturíes), se desinfectó en un esterilizador eléctrico modelo DENT-EQ (Alemania) que permaneció dentro de la cámara de flujo laminar horizontal, donde se realizó el manejo del material vegetal en condiciones de esterilidad.

Condiciones de cultivo *in vitro*

Los brotes *in vitro* se colocaron en cámara de crecimiento con luz solar, temperatura de 27 ± 2 °C con un período luminoso de aproximadamente 13/11 h de luz/oscuridad con un rango de densidad flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) entre 48,0 y 62,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medido con un Luxómetro Extech 401025 (Extech Instruments, EUA). Los experimentos fueron repetidos dos veces.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y la elaboración de los gráficos se empleó el software Statistica versión 10.0 (StatSoft, 2011) para Windows. Para contrastar la normalidad del conjunto de datos obtenidos para cada variable, se utilizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro Wilk con la corrección de Lilliefors. Para la comparación entre las medias se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y de ser necesario se realizó la comparación de medias *a posteriori*, la prueba de Mann Whitney o Tablas de Contingencia 2x2. En cada experimento se detallan las pruebas estadísticas que se realizaron. En todos los casos las diferencias fueron establecidas para $p \leq 0,05$.

3.1 Determinación de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición para el establecimiento *in vitro* de ápices de *S. rebaudiana*

Con el objetivo de determinar las diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio (NaClO) y el tiempo de exposición, en la desinfección de los ápices, se realizó el primer experimento. Para la desinfección del material vegetal en condiciones de laboratorio, se realizaron los diferentes pasos del procedimiento, según el protocolo propuesto por Alvarenga (2005) con modificaciones.

Primero, el material vegetal fue lavado con agua corriente durante 30 min. A continuación los explantes fueron sumergidos en una solución del fungicida Benomil 3 g.L^{-1} durante 20 min y se enjuagaron con agua corriente. Luego los mismos se colocaron en etanol 70% durante 5 s. Por último se realizó un lavado con agua desionizada estéril, para seguir con el experimento de desinfección. Se evaluaron cuatro concentraciones de hipoclorito de sodio: 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 (v/v); durante tres tiempos de exposición: 10, 15 y 20 min.

Posteriormente, y dentro de la cámara de flujo laminar, se realizaron tres enjuagues con agua desionizada estéril y los ápices fueron reducidos a un tamaño de 2,0-3,0 cm de altura (Figura 2). Se utilizaron 30 ápices por tratamiento, los cuales se colocaron en tubos de ensayo (100 x 125 mm) con 15 mL de medio de cultivo semisólido compuesto por las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100% de su concentración, 1 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 1 mg.L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y 2,6 g.L⁻¹ de Gelrite. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5,7 previo a la esterilización por autoclave.

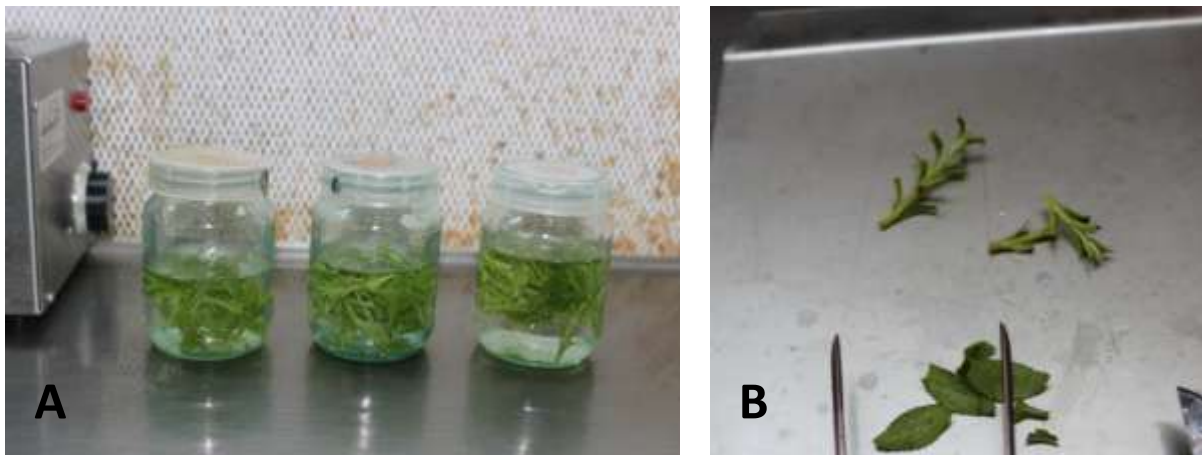


Figura 2. Desinfección de explantes de *Stevia rebaudiana* Bertoni (A) Tratamiento con Hipoclorito de Sodio. (B) Disección del material vegetal.

Se cuantificó el número de explantes contaminados por bacterias y hongos a partir de las 72 horas. Además a los 21 días después del establecimiento *in vitro*, se cuantificó el número de explantes con necrosis, los explantes viables y se calcularon los porcentajes correspondientes. El análisis estadístico de las variables se realizó mediante las pruebas de Spearman, Friedman y análisis de Tablas de contingencia 2x2, previa comparación de los supuestos de normalidad.

3.2 Determinación del efecto de los reguladores del crecimiento y del número de subcultivos en la multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*

3.2.1 Determinación del efecto del 6-BAP y el AIA en la multiplicación de brotes *in vitro*

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la citoquinina 6-bencilaminopurina (6-BAP) sola y en combinación con la auxina ácido indol-3-acético (AIA) sobre el coeficiente de multiplicación. Para ello, se evaluaron cuatro combinaciones de ambos reguladores del crecimiento (Tabla II) y un control sin reguladores del crecimiento, para un total de cinco tratamientos.

Tabla II. Combinaciones de concentraciones de reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido indolacético (AIA) añadidas al medio de cultivo de multiplicación de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

No. Tratamiento	6-BAP (mg.L ⁻¹)	AIA (mg.L ⁻¹)
1	0	0
2	2	1
3	4	1
4	2	0
5	4	0

Se utilizaron 25 explantes por tratamiento, que fueron obtenidos según las condiciones establecidas en el experimento anterior. Estos se distribuyeron a razón de cinco por frasco de cultivo con tapa de plástico transparente de polipropileno con un volumen total de 250 mL y 30 mL de medio de cultivo (igual composición que el medio de establecimiento, excepto las concentraciones de reguladores de crecimiento). A los 15 días se realizó el subcultivo y se cuantificó el número de brotes por explante y se determinó el coeficiente de multiplicación (CM= No. de segmentos de brotes totales/ No. brotes iniciales). Los datos fueron comparados utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación de medias *a posteriori*, previa comprobación de los supuestos de normalidad.

3.2.2 Determinación del efecto del número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación

Con el objetivo de determinar el efecto del número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación, se emplearon 32 brotes de *S. rebaudiana* establecidos según las condiciones seleccionadas en el acápite 3.1. Se utilizó la composición del medio de cultivo adecuada para la fase de multiplicación según los resultados del acápite anterior, con subcultivos cada 15 días. Se determinó en cada uno el número de segmentos viables en que era posible fragmentar cada planta *in vitro*, para calcular el coeficiente de multiplicación ($CM = \text{No. de segmentos de brotes totales} / \text{No. brotes iniciales}$). Los datos fueron comparados utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación de medias *a posteriori*, previa comprobación de los supuestos de normalidad.

3.3 Determinación de la influencia de diferentes sustratos sobre la supervivencia de plantas propagadas *in vitro* de *S. rebaudiana* durante la fase de aclimatización *ex vitro*

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del tipo de sustrato en la supervivencia de las plantas *in vitro* de *S. rebaudiana* en condiciones de aclimatización *ex vitro*. Se utilizaron 20 plantas por tratamiento que provenían del quinto subcultivo en la fase de multiplicación con una altura entre 15 y 20 cm, con entre cinco y 10 pares de hojas y raíces que podían ser de una hasta cinco.

Previo a la plantación en sustrato las plantas *in vitro* fueron separadas del medio de cultivo, lavadas con agua corriente e individualizadas. Posteriormente se plantaron según su tratamiento en bandejas de polipropileno negras de 28 alvéolos con una capacidad de 200 cm³ cada uno. Se estudiaron distintas combinaciones de sustratos con diferentes porcentajes de zeolita y compost de cachaza (25-75, 50-50, 75-25, 100-0, 0-100, respectivamente).

Estas fueron llevadas a casa de cultivo (temperatura promedio durante el día de 30 ± 2 °C, humedad relativa del 70%, DFFF entre 224 y 457 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, frecuencia de riego de 3,0 min de duración dos veces al día) para su aclimatización *ex vitro*. Luego, según su crecimiento y presencia de un sistema radical bien desarrollado fueron pasadas a bolsas de cultivo y mantenidas en las condiciones anteriormente descritas.

La zeolita utilizada fue producida por la Empresa GEOMINERA de Villa Clara y el compost de cachaza fue obtenido del Complejo Agroindustrial Azucarero “Ifraín Alfonso” del Municipio Ranchuelo, Villa Clara. Las características físico-químicas de ambos sustratos se muestran en las Tablas III y IV.

Tabla III. Características físico-química de la zeolita. Tomado de Gómez-García (2013)

Composición química	%
Silicio (SiO ₂)	70,10
Aluminio (Al ₂ O ₃)	11,20
Hierro (Fe ₂ O ₃)	2,20
Hierro (FeO)	0,30
Magnesio (MgO)	0,60
Calcio (CaO)	4,50
Sodio (Na ₂ O)	1,50
Potasio (K ₂ O)	1,30
Fósforo (P ₂ O ₅)	0,07
Agua (H ₂ O)	4,70
Composición mineral	%
Clinoptilolita	40,00
Modernita	40,00
Otros (Calcita, cuarzo, feldespato)	20,00
Propiedades físicas	Valor
Tamaño de la partícula	0,01-1,0 mm
Densidad (δ)	0,37 g.cm ⁻³
Densidad de la fase sólida (γ)	1,77 g.cm ⁻³
Porosidad total (PT)	80,59 % vol.

Tabla IV. Composición química de la cachaza. Tomado de Gómez-García (2013)

Composición química	Valor
Calcio (CaO)	231,23 mg.L ⁻¹
Potasio (K ₂ O)	125,2 mg.L ⁻¹
Fósforo (P ₂ O ₅)	1008,80 mg.L ⁻¹
Materia orgánica	41,3 %
C. E	1,14 mol.cm ⁻³
pH	7,6

A los 15 días se contó el número de plantas que sobrevivieron y se determinó el porcentaje de supervivencia. La comparación entre tratamientos se realizó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, previa comprobación de los supuestos de normalidad.

3.4 Comparación de plantas de *Stevia rebaudiana* obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes

3.4.1 Evaluación de variables morfológicas de las plantas en aclimatización *ex vitro*

Con el objetivo de validar el protocolo propuesto, se realizaron comparaciones entre las plantas propagadas *in vitro* y las plantas multiplicadas mediante corte de esquejes. Primero se comparó la respuesta de las plantas *in vitro* en casa de cultivo con las plantas multiplicadas por esquejes empleando variables morfológicas.

Del banco de germoplasma establecido en fase cultivo, se seleccionaron plantas y se realizó el corte de esquejes a una altura de 15-20 cm, según las técnicas tradicionales. Paralelamente se transfirieron las plantas *in vitro* a bolsas con el sustrato seleccionado en el acápite anterior. En ambos casos se eligieron plantas con alturas similares y se mantuvieron en las condiciones de cultivo previamente descritas.

Luego de transcurridos 60 días se evaluaron las variables: altura, número de hojas y número de tallos por planta. Para ello se utilizó una regla graduada de 1,0 m. Los datos obtenidos fueron comparados mediante la prueba de Kruskal-Wallis/ U de Mann-Whitney y comparación de medias *a posteriori*.

3.4.2 Comparación de los patrones de amplificación de ADN de las plantas obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes

Con el objetivo de determinar el nivel de variabilidad genética asociada al proceso de clonación mediante ápices de plantas cultivadas *ex vitro* y corte de esquejes, se efectuó una comparación de patrones moleculares de las mismas. Esta se realizó mediante el uso de marcadores moleculares tipo RAPD. Para ello se seleccionaron hojas jóvenes procedentes de cinco plantas *in vitro* y de cinco plantas propagadas por esquejes.

Las muestras fueron lavadas con agua corriente, limpiadas con etanol y agua destilada. Seguidamente se trituraron con nitrógeno líquido en morteros de porcelana con ayuda del pistilo, luego fueron almacenadas en tubos *Eppendorf* (2,0 mL). Para la extracción del

ADN, se evaluaron dos protocolos de aislamiento de ADN: uno presentado por Khayat *et al.* (2004) y otro propuesto por Doyle y Doyle (1990). El primer protocolo empleado se basó en el propuesto por Khayat *et al.* (2004) con algunas modificaciones descritas a continuación.

Se tomaron 100 mg de tejido vegetal de plantas cultivadas *in vitro* y se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, que se distribuyó en tubos *Eppendorf*. Se adicionó 1 mL de buffer de extracción [4% (m/v) CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio); 10 mM Tris-HCl/pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA (ácido etilén-diamino-tetracético); 2% (m/v) PVP 10 000; 10 mM mercaptoetanol] y se homogenizó empleando el agitador tipo MISTRAL® (LAB-LINE INSTRUMENTS, 1190-1CE) durante unos segundos.

Las muestras fueron incubadas a 55 °C durante 30 min y posteriormente centrifugadas (*Eppendorf*, Alemania, Lot: 5415D) a 2 800 g y 4 °C, durante 5 min. Se colectó el sobrenadante y se le adicionó RNAsa (200 µg/mL de concentración final) por 15 min a 37 °C. El extracto fue mezclado con igual volumen de cloroformo y luego centrifugado en iguales condiciones. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se adicionaron 700 µL de 2-isopropanol helado.

Las muestras se mantuvieron toda la noche a -20 °C y posteriormente se centrifugaron a 13 500 g y 4 °C, durante 15 min. El precipitado resultante se lavó con 500 µL de etanol 70% (v/v), se centrifugó según las condiciones anteriormente mencionadas y fue secado en campana por 15 min. El precipitado se resuspendió en 30 µL de agua desionizada.

El otro protocolo empleado fue propuesto por Doyle y Doyle (1990) también, con ligeras modificaciones como se describe a continuación. A 200 mg del material se adicionó 1 mL de buffer de extracción [2% (m/v) CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio), 10 mM Tris-HCl/pH 8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA (ácido etilén-diamino-tetracético), 0,2% 2-mercaptoetanol] previamente calentado a 65 °C.

Las muestras fueron incubadas a 65 °C durante 30 min y mezcladas frecuentemente utilizando un vórtex. Luego se adicionó RNAsa (10 µg/mL de concentración final) y se incubaron por 15 min a 37 °C. Posteriormente se añadió 700 µL de cloroformo, se mezcló y se procedió a centrifugar las muestras a 5 480 g durante 10 min a temperatura ambiente en una centrífuga *Centrifuge 5415D Eppendorf*. Se transfirió la fase acuosa a tubos

limpios de igual volumen y se repitió el paso anterior. Luego se le adicionó 700 µL de isopropanol helado, y tras mezclarlo se mantuvo a -20 °C por 1h.

A continuación, se centrifugó a 11 180 g a temperatura ambiente, durante 15 min. El precipitado resultante se lavó con 1 mL de buffer de lavado [etanol 76%, 10 mM acetato de amonio] durante 20 min con agitación frecuente. Luego se centrifugó según las condiciones anteriormente mencionadas y se dejó secar al vacío por 20 min. El precipitado final, se resuspendió en 50 µL de agua estéril.

En ambos casos, se comprobó la integridad del ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) con tampón TBE para la separación de los productos de amplificación, a 100 V durante 40 min, luego se observaron en un transiluminador *MacroVue* mediante la incidencia de luz ultravioleta (UV). Como criterio de pureza se determinaron las razones de Absorbancia a 260/230 nm y a 260/280 nm y la concentración de ADN doble cadena, empleando un espectrofotómetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemania).

Para realizar la técnica de RAPD se utilizó un equipo *PCR Thermocycler epgradient* (Alemania). Las reacciones se prepararon empleando micropipetas 2P, 20P y 200P, con puntas desechables estériles.

Todos los cebadores empleados tenían amplitud de 10 pb. Estos fueron seleccionados del repositorio de cebadores del Laboratorio de Biología molecular del IBP. Las secuencias de los seis cebadores utilizados fueron:

- R1: 5'-CGACCGCAGT-3'
- R2: 5'-CCCTCTGCGG-3'
- R4: 5'-AGCCATTGTC-3'
- R5: 5'-GCTCAGGACG-3'
- R6: 5'-GCCGTGCGGC-3'
- R14: 5'-CTAAGCCATG-3'

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con cada cebador, 100 ng de ADN genómico en un volumen final de 20 µL. Se empleó un Kit de PCR Core con Taq polimerasa (*Sigma*), de acuerdo a las recomendaciones del productor. El programa empleado fue el siguiente: 4 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 36 °C, y 90 segundos a 72 °C; seguido de 10 min a 72 °C.

Una vez terminado se procedió a realizar una electroforesis en gel de Agarosa al 1,5% (p/v), con tampón TBE para la separación de los productos de amplificación. Los productos de PCR y el marcador de masa molecular *GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus*, *ready-to-use* se mezclaron con el colorante *EZVision (Biotechnology)* y se aplicaron en los pocillos. Las corridas se realizaron a 60 V durante 120 min, luego se observaron en un transiluminador *MacroVue* mediante la incidencia de luz ultravioleta (UV).

Las bandas resultantes del RAPD fueron interpretadas según la presencia/ausencia de polimorfismos como valores binarios (1/0 respectivamente), con ellos se confeccionó una matriz de datos. La similitud y la distancia genética entre las diferentes muestras se calculó de acuerdo a la metodología de Nei (1972), utilizando el servidor web *DendroUPGMA* (Garcia-Vallvé y Puigbò, 2002).

4. RESULTADOS

4.1 Determinación de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición para el establecimiento *in vitro* de ápices de *S. rebaudiana*

De los 360 explantes totales, 62 mostraron contaminación microbiana y 93 resultaron severamente dañados por el proceso de desinfección. Estos últimos se necrosaron y en ocasiones causaron fenolización del medio de cultivo. Los 205 ápices restantes (56,9% del total) fueron positivamente establecidos y se desarrollaron hasta una longitud entre 10-15 cm y formaron brotes (Figura 3).

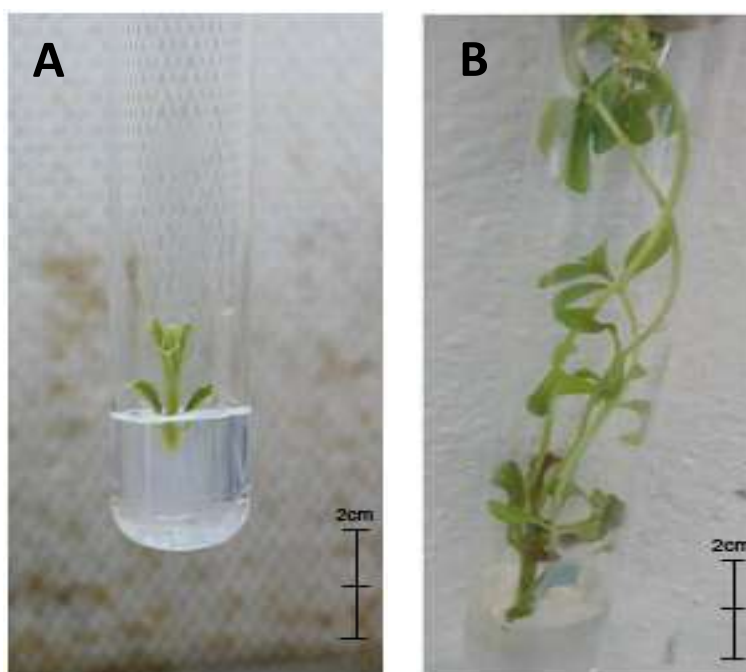


Figura 3. Ápice y brote de *Stevia rebaudiana* Bertoni en medio de cultivo para el establecimiento. (A) luego del proceso de desinfección y (B) a los de 21 días de cultivo.

Al comparar el efecto del tiempo de desinfección sobre el número de explantes necrosados y contaminados, no se encontraron diferencias significativas (Figura 4). No existieron correlaciones entre el número de explantes necrosados o contaminados y el tiempo de desinfección. Por lo que es posible realizar la desinfección con hipoclorito de sodio entre 10 y 20 minutos, sin afectar la viabilidad de los explantes.

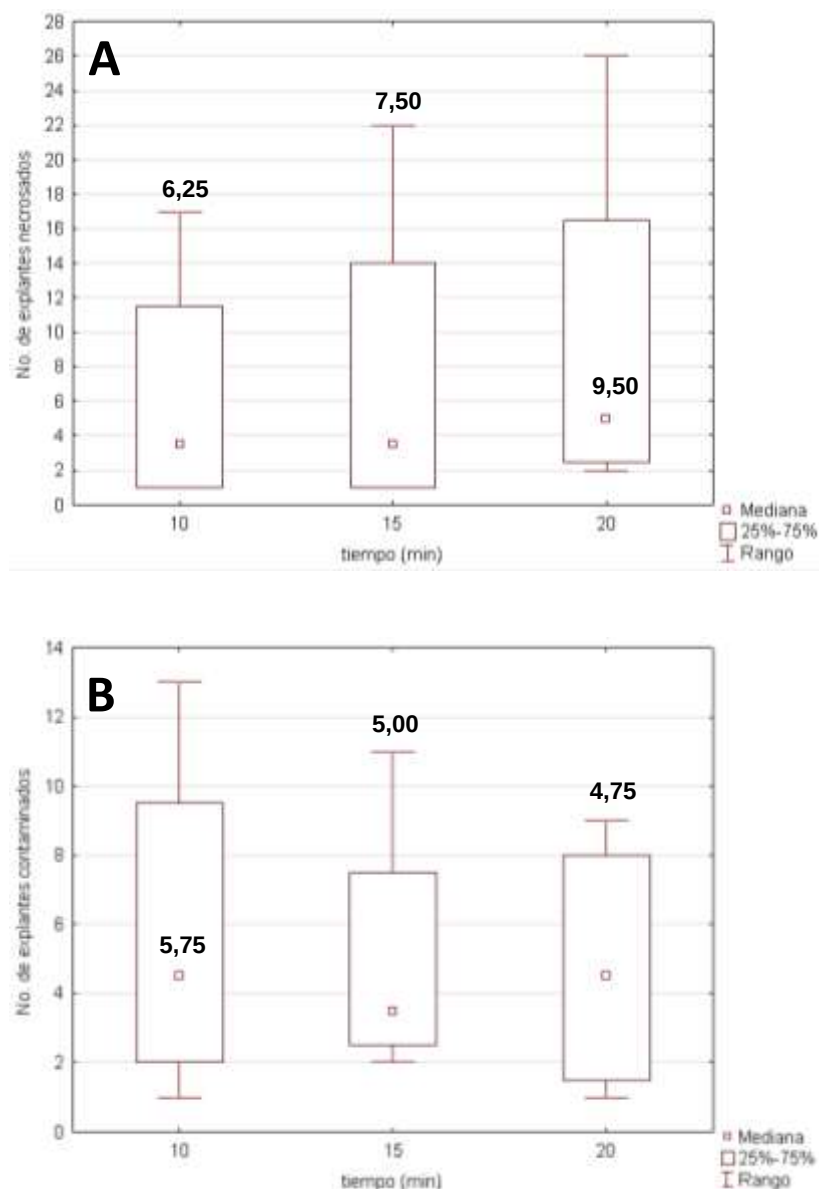


Figura 4. Efecto del tiempo de desinfección con hipoclorito de sodio sobre el número de explantes necrosados (A) y contaminados (B). Los valores medios por tratamiento no fueron significativamente diferentes, de acuerdo a la prueba de Kruskal Wallis $p>0,05$.

En contraste, la concentración de hipoclorito de sodio provocó diferencias significativas sobre el número de explantes necrosados y contaminados, de acuerdo a la prueba de Friedman (Figura 5). Existe una correlación positiva entre el número de explantes necrosados y la concentración de hipoclorito de sodio (R de Spearman 0,927, $p<0.01$). Por lo que al aumentar la concentración del desinfectante, se aumenta el daño producido al tejido.

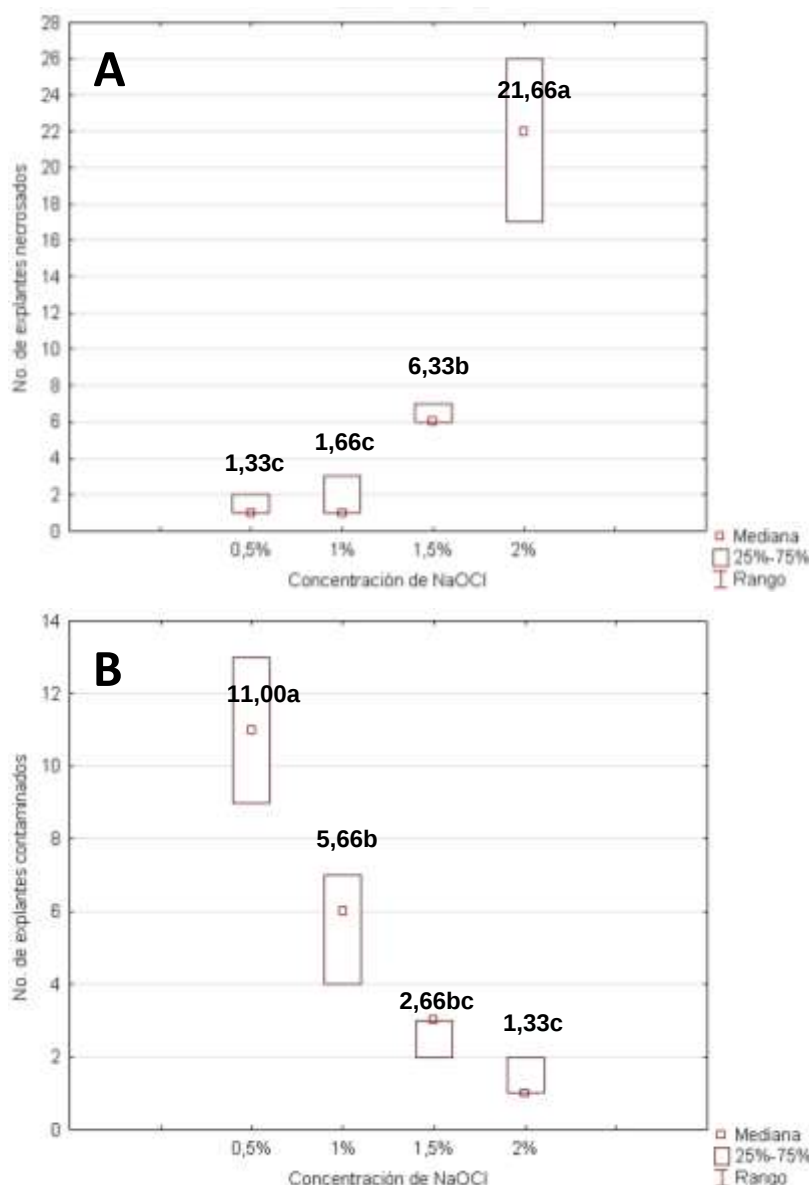


Figura 5. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio sobre el número de explantes necrosados (A) y contaminados (B). Medias con letras desiguales difieren según Tablas de contingencia 2x2, $p < 0,05$.

La concentración de hipoclorito de sodio al 1% es la mayor donde se produce una menor mortalidad de los explantes. Este efecto se invierte al analizar el número de explantes contaminados, donde al incrementar las concentraciones de hipoclorito de sodio, se minimiza significativamente la contaminación (R de Spearman $-0,9659$, $p < 0,01$).

El tratamiento desinfectado con hipoclorito de sodio al 0,5% mostró porcentajes de supervivencia entre 93,33 y 96,67% y de desinfección entre 55,17 y 67,86%. Mientras que

cuando se empleó al 1% la supervivencia fue entre 90 y 96,67% y un rango de desinfección entre 74,07 y 79,31%. Para el 1,5%, los porcentajes oscilaron entre 76,67 y 80% para la supervivencia y entre 87,50 y 91,30% para la desinfección. Por último con la concentración de NaClO 2% la supervivencia fue menor (13,33 y 43,33%), mas en cambio la desinfección estuvo entre 75 y 92,31%. De acuerdo a los porcentajes de supervivencia y desinfección anteriormente analizados, se recomienda emplear el hipoclorito de sodio al 1% como agente desinfectante.

4.2 Determinación del efecto de los reguladores del crecimiento y del número de subcultivos en la multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*

4.2.1 Determinación del efecto del 6-BAP y el AIA en la multiplicación de brotes *in vitro*

En la Figura 6, se muestran los coeficientes de multiplicación determinados, para las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento añadidas al medio de cultivo de multiplicación. En los tratamientos donde no se empleó reguladores de crecimiento (1) o se adicionó solo uno de ellos (4 y 5), fue posible obtener de uno a tres segmentos viables por brote, con una media de dos. Mientras que cuando se adicionó al medio de cultivo 2 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 1 mg.L⁻¹ de AIA, los coeficientes adoptaron valores entre 1 y 4, con una media de 2,40.

En el tratamiento donde se emplearon 4 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 1 mg.L⁻¹ de AIA, la media fue numéricamente superior (2,60), con valores entre dos y cuatro. Al analizar estadísticamente estos datos, no se encontraron diferencias significativas entre los coeficientes de multiplicación por tratamiento. Por lo que el empleo de las combinaciones de reguladores de crecimiento evaluadas, no modificó el coeficiente de multiplicación de esta especie.

Durante el segundo subcultivo de los explantes evaluados, los segmentos en medio de multiplicación con reguladores de crecimiento (Tratamientos del 2-5), se tornaron delgados, hiperhídricos y en algunos casos despigmentados. Mientras que en el medio de cultivo donde no se añadieron los mismos (Tratamiento 1), no se produjo afectación en el desarrollo de los brotes. Por lo que se recomienda no emplear reguladores de crecimiento en la composición del medio de cultivo para la multiplicación de *S. rebaudiana*.

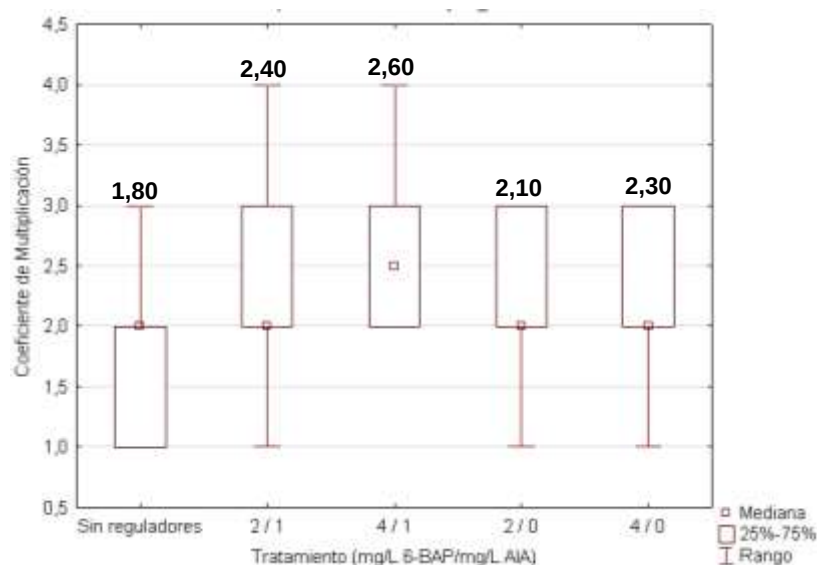


Figura 6. Efecto de la concentración de los reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido indolacético (AIA) sobre el coeficiente de multiplicación de brotes de *Stevia rebaudiana*, luego de 15 días en medio de multiplicación. Los valores medios no fueron significativamente diferentes, según prueba de Kruskal Wallis, $p > 0,05$.

4.2.2 Determinación del efecto del número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación

En la Figura 7 se relacionan los coeficientes de multiplicación calculados en cada subcultivo. El número de segmentos viables obtenidos de cada brote no fue significativamente diferente durante los subcultivos 1, 2, 4 y 5. Mientras que en el tercer subcultivo se produjo un incremento considerable de este coeficiente.

No fue posible prolongar más de 15 días el periodo entre cada subcultivo, pues se producían afectaciones en los explantes, debido al agotamiento del medio de cultivo. Si se prolongaba este tiempo, los brotes mostraban signos de delgadez general y marchitez en las hojas y en los brotes nuevos.

Las plantas obtenidas, luego del quinto subcultivo, presentaron características óptimas para ser trasladadas a la fase de aclimatización *ex vitro*, sin ser transferidas a la fase de enraizamiento. Pues durante la fase de multiplicación fueron capaces de regenerar un sistema radical funcional.

No fue posible mantener las plantas de *S. rebaudiana* más de cinco subcultivos en el medio de cultivo de multiplicación. Pues luego de este tiempo se incrementa notablemente la pérdida del material vegetal, que evidencia síntomas de marchitez, comienza a perder hojas y muestra una disminución general del crecimiento.

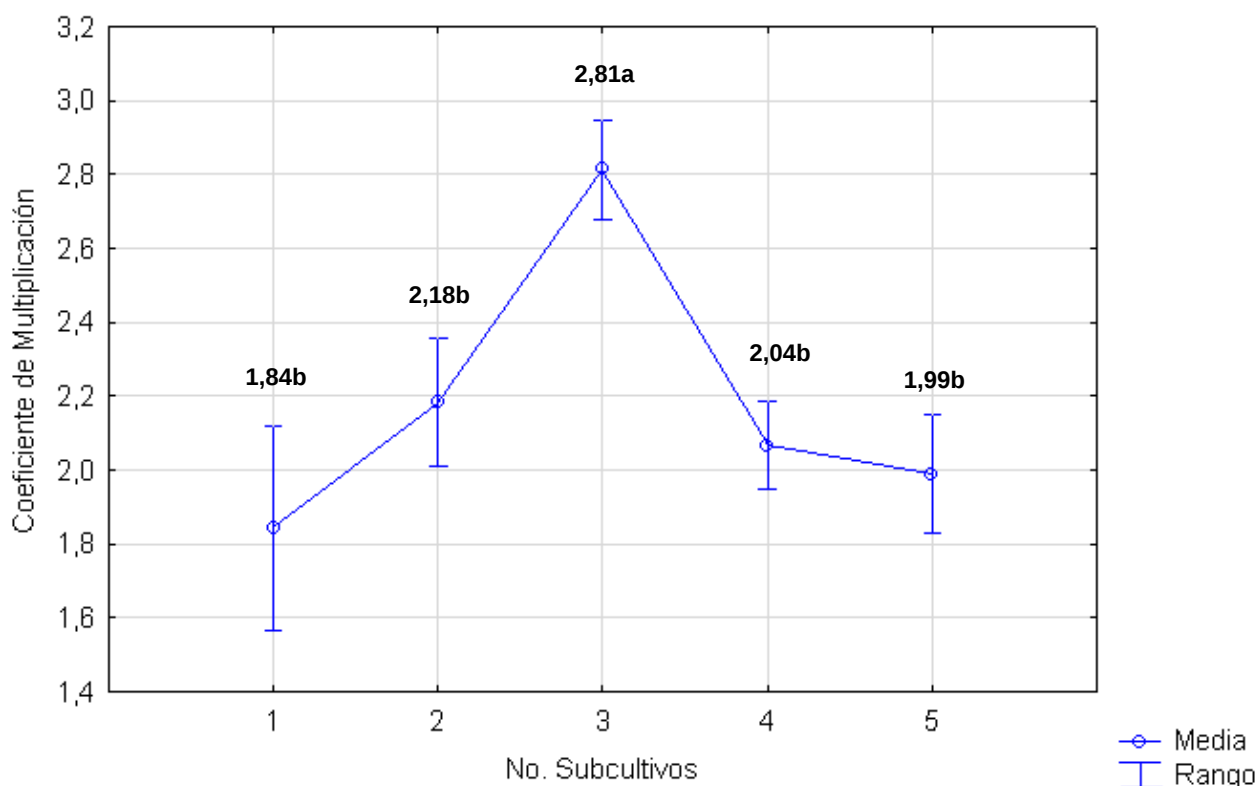


Figura 7. Efecto del número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Medias con letras desiguales difieren según las pruebas de Kruskal-Wallis y comparación de medias *a posteriori*, $p < 0,05$.

4.3 Determinación de la influencia de diferentes sustratos sobre la supervivencia de plantas propagadas *in vitro* de *S. rebaudiana* durante la fase de aclimatización *ex vitro*

El éxito del proceso de aclimatización *ex vitro* de las plantas propagadas *in vitro*, se debe en parte a la correcta selección de la composición del sustrato. Las condiciones de cultivo, garantizaron una alta supervivencia de las plantas propagadas *in vitro*, entre un 80-90%, sin diferencias significativas entre los tratamientos, según prueba de Kruskal Wallis, $p > 0,05$. (Tabla V). Luego, es posible emplear todas las combinaciones valoradas en este trabajo, durante la fase de aclimatización *ex vitro*.

De acuerdo a la disponibilidad, se seleccionó el sustrato conformado por compost de cachaza (100%), para alojar las plantas propagadas *in vitro* en casa de cultivo. Este mismo sustrato se seleccionó para realizar también el cultivo de las plantas propagadas por cortes de esquejes.

Tabla V. Porcentajes de supervivencia según la composición del sustrato de las plantas de *S. rebaudiana* a los 15 días de plantadas. Los valores medios no fueron significativamente diferentes, según prueba de Kruskal Wallis, $p>0,05$.

Tratamiento	Zeolita	Cachaza	% Supervivencia
1	25	75	80
2	75	25	85
3	50	50	80
4	0	100	90
5	100	0	90

4.4 Comparación de plantas de *Stevia rebaudiana* obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes

4.4.1 Evaluación de variables morfométricas de las plantas en aclimatización *ex vitro*

Una vez en casa de cultivo se evaluó la existencia de diferencias morfométricas entre las plantas propagadas *in vitro* y las que se propagaron mediante corte de esquejes. Ambos grupos se mantuvieron en iguales condiciones ambientales durante la fase de aclimatización en casa de cultivo. Para su comparación, se evaluaron las variables altura (Figura 8), número de hojas (Figura 9) y número de tallos (Figura 10).

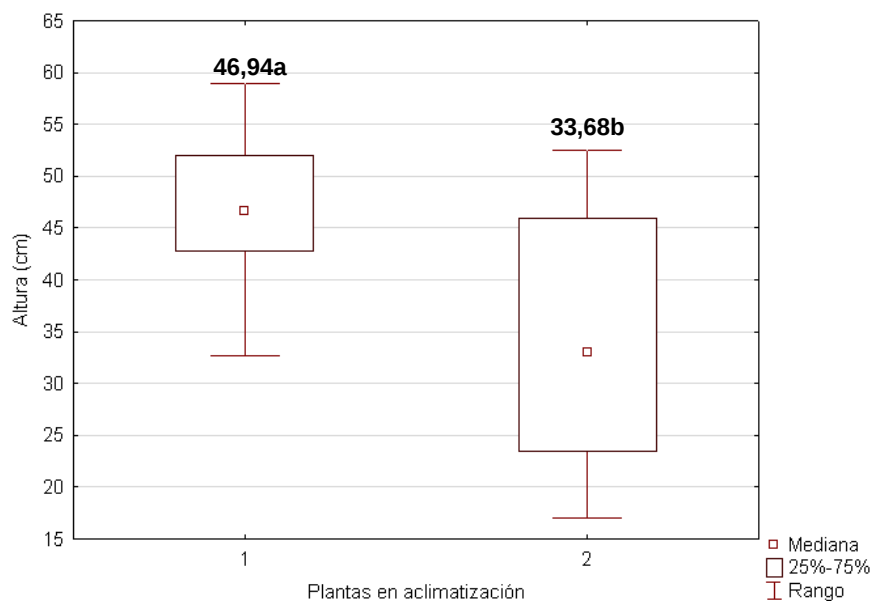


Figura 8. Altura en cm de las plantas propagadas *in vitro* (1) y propagadas por cortes de esquejes (2) a los 60 días en casa de cultivo. Medias con letras desiguales difieren según prueba de Mann Whitney, $p < 0,05$.

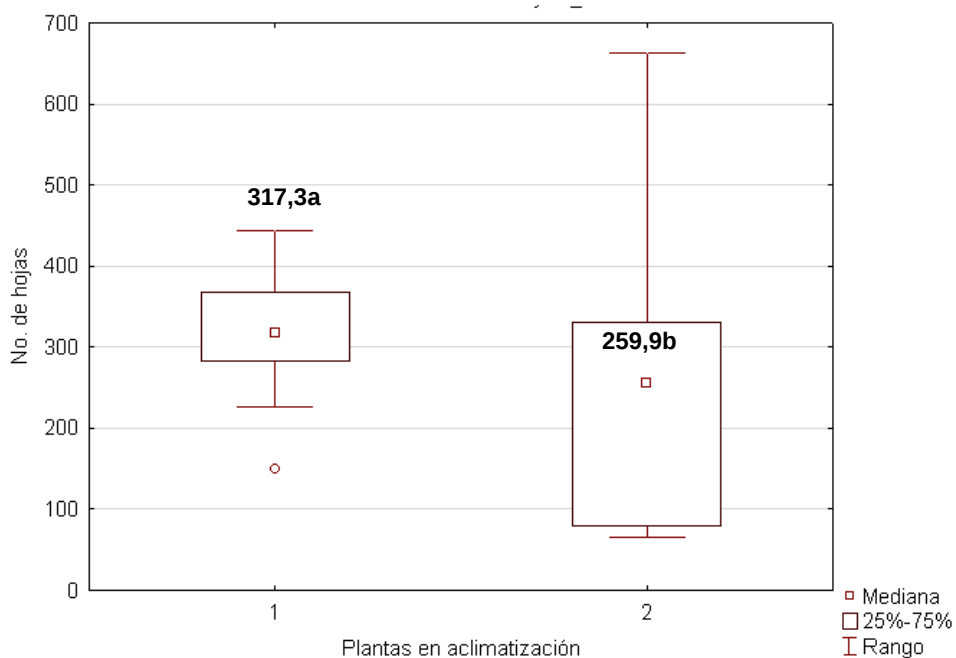


Figura 9. Número de hojas de plantas propagadas *in vitro* (1) y propagadas por cortes de esquejes (2) a los 60 días en casa de cultivo. Medias con letras desiguales difieren según prueba de Mann Whitney, $p < 0,05$

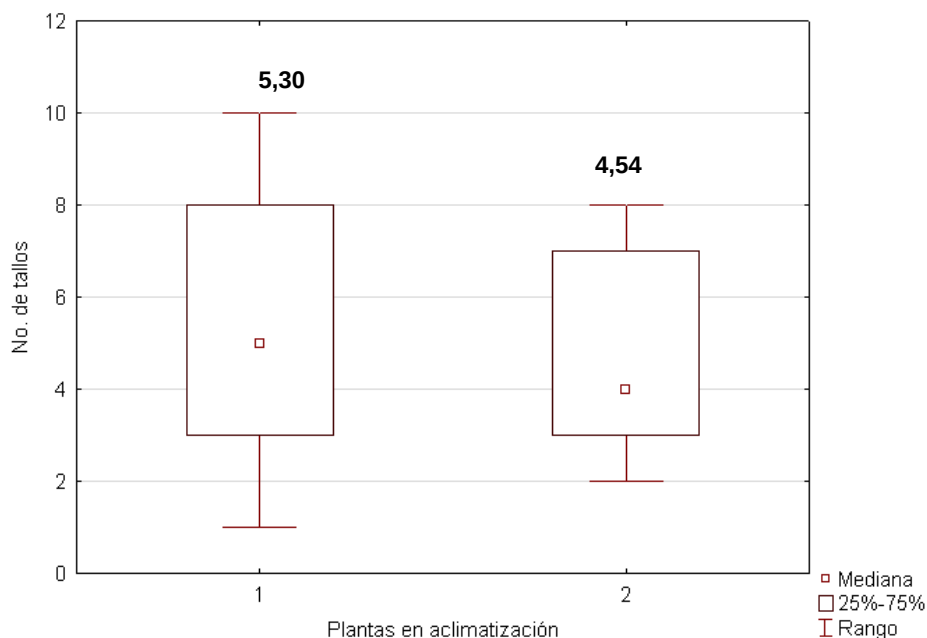


Figura 10. Número de tallos de plantas *in vitro* (1) y por cortes de esquejes (2) a los 60 días en casa de cultivo. Los valores no fueron significativamente diferentes, según prueba de Kruskal Wallis, $p > 0,05$.

La altura y el número de hojas de las plantas propagadas *in vitro*, fueron significativamente superiores a los determinados en las plantas propagadas por esquejes (Figura 11). No se encontraron diferencias significativas entre ambos para el número de tallos. Las plantas propagadas *in vitro* mantuvieron un crecimiento homogéneo y fueron morfológicamente similares a las plantas propagadas por esquejes.



Figura 11. Plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, a los 60 días en casa de cultivo. Propagadas *in vitro* (A y B). Propagadas por cortes de esquejes (C y D)

4.4.2 Comparación de los patrones de amplificación de ADN de las plantas obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes

El empleo del protocolo propuesto por Khayat *et al.* (2004) no fue efectivo en *S. rebaudiana*. Mientras que si fue posible aislar ADN genómico de esta planta, empleando el protocolo de CTAB con modificaciones. En la Tabla VI, se relacionan los valores referentes a algunas de las muestras aisladas.

Tabla VI. Concentración de ADN y densidad óptica (DO) de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Aislados de hojas de (a) Plantas *in vitro*. (b) Plantas por corte de esquejes

Muestras	[ADN]ng/μL	DO 260/280	DO 260/230
1 ^a	251,1	1,70	0,67
2 ^a	738,7	1,67	1,06
3 ^a	524,5	1,63	1,09
4 ^a	231,9	1,76	1,03
5 ^a	504,8	1,84	1,83
1 ^b	413,4	1,82	0,68
2 ^b	501,8	1,64	1,05
3 ^b	417,1	2,04	1,21
4 ^b	438,5	1,64	0,87
5 ^b	873,6	1,79	1,12

Las muestras de ADN genómico purificadas, fueron empleadas para el análisis de la estabilidad genética de las líneas propagadas *in vitro*, mediante RAPD. De los seis cebadores empleados en las reacciones de amplificación, solo en uno fue posible observar la presencia de bandas (Figura 12). Los cebadores R2, R4, R5, R6 y R14 no produjeron ninguna amplificación.

En el patrón de amplificación RAPD obtenido utilizando el cebador R1: 5'-CGACCGCAGT-3', se produjeron 63 bandas totales para las 10 muestras analizadas. Estas se encontraron distribuidas en 12 líneas de bandas, de las cuales solo dos fueron comunes para todas las muestras (monomórficas). El resto de las bandas resultaron polimórficas variando en número entre una y siete para cada muestra. Esto resultó en un polimorfismo del 83,3%.

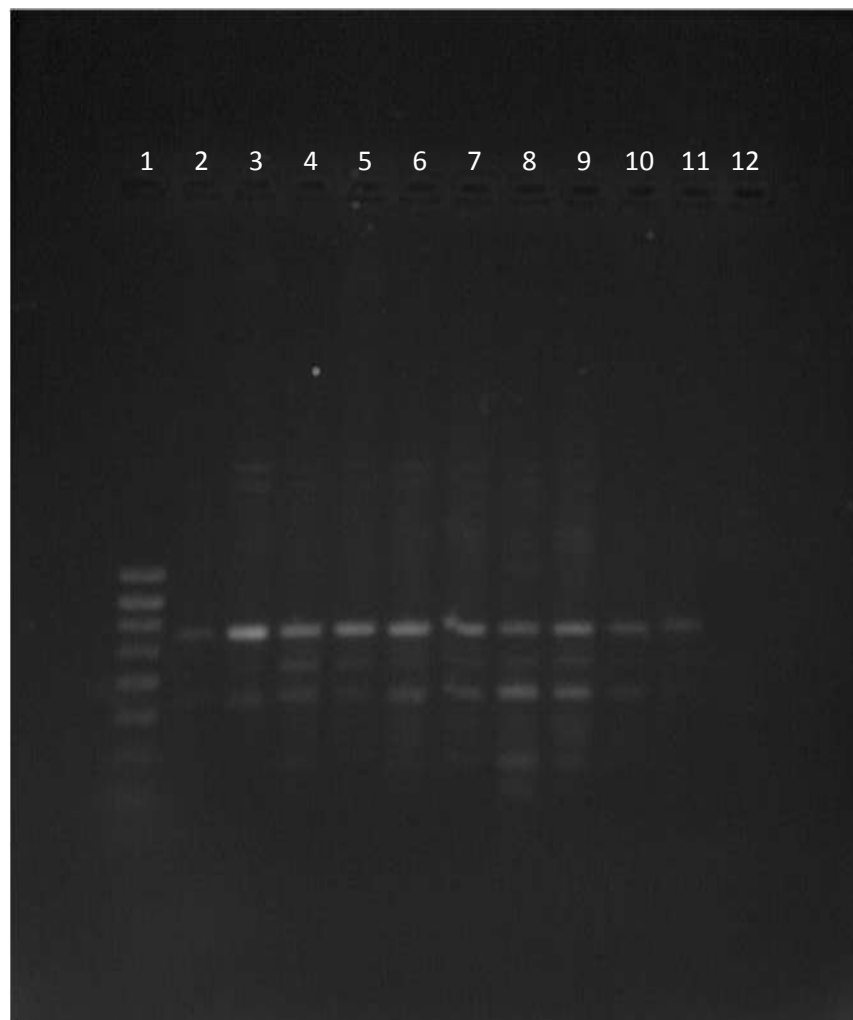


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% del patrón de amplificación RAPD obtenido utilizando el cebador R1. Carriles 1: Marcador de peso molecular *GeneRuler* 100 pb DNA *Ladder Plus, ready-to-use*; 2-6: muestras de plantas propagadas *in vitro*; 7-11: muestras de plantas propagadas por cortes de esquejes; 12: control negativo.

La similitud y la distancia genética entre las muestras, se calculó utilizando el método UPGMA con el coeficiente de Dice. Los valores de similitud se encontraron entre 0,33 y 1,00; mientras que los de diferencia oscilaron entre 0 y 0,66 (Tabla VII). Con esos datos se confeccionó un dendograma que muestra la relación entre las muestras analizadas según la distancia genética (Figura 13).

Tabla VII. Matriz de similitud genética entre las muestras analizadas (a) plantas propagadas *in vitro* y (b) plantas propagadas por cortes de esquejes de *S. rebaudiana*.

Muestras	1a	2a	3 ^a	4 ^a	5a	1b	2b	3b	4b	5b
1a	1	0.500	0.444	0.571	0.364	0.364	0.333	0.333	0.800	1.000
2a		1	0.769	0.909	0.667	0.800	0.750	0.750	0.667	0.500
3a			1	0.833	0.750	0.750	0.824	0.706	0.400	0.444
4a				1	0.714	0.714	0.667	0.667	0.500	0.571
5a					1	0.889	0.737	0.947	0.333	0.364
1b						1	0.737	0.947	0.500	0.364
2b							1	0.800	0.462	0.333
3b								1	0.462	0.333
4b									1	0.800
5b										1

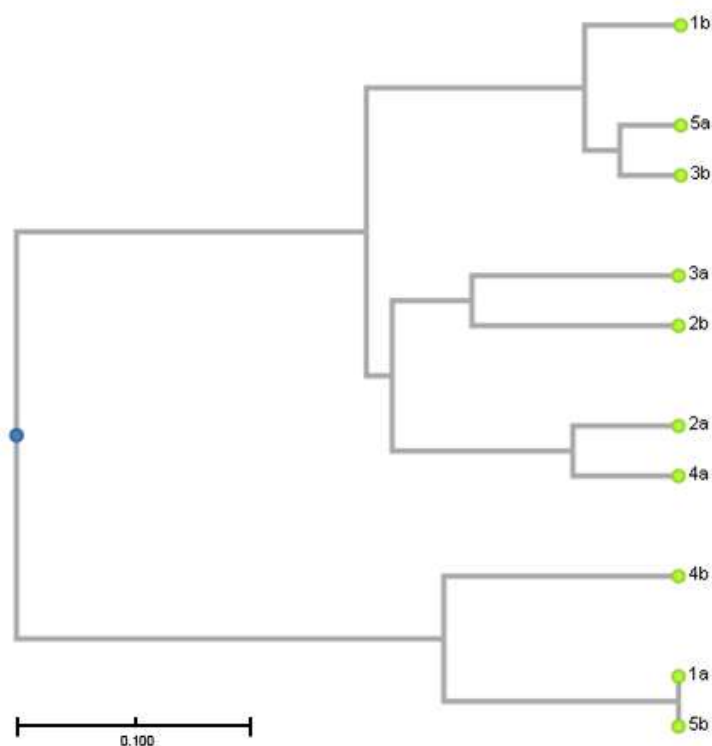


Figura 13. Dendrograma UPGMA de distancia genética calculado de acuerdo al perfil electroforético obtenido con el cebador R1, en (a) plantas propagadas *in vitro* y (b) plantas propagadas por cortes de esquejes.

Con todos los resultados obtenidos se confeccionó un protocolo de propagación *in vitro* para *Stevia rebaudiana* (Figura 14), que permite propagar 45 plantas a partir de cada ápice establecido en tres meses. Luego, con su aplicación se pueden obtener 4 500 plantas adultas en casa de cultivo a partir de 100 ápices establecidos en un período de cinco meses aproximadamente. El protocolo se explica a continuación:

1. Extraer ápices caulinares de plantas adultas de *Stevia rebaudiana* Bertoni con cortes de 5-7 cm por debajo de la punta de cada tallo y llevar al laboratorio. Lavar tres veces con agua corriente alternando con la acción de detergentes. Aplicar fungicida (*Benomil*) a 3 g.L^{-1} durante 20 minutos.
2. Desinfectar con etanol al 70% durante 5 segundos. Tratar con NaClO al 1% durante un 10, 15 o 20 minutos. Efectuar tres enjuagues con agua destilada estéril.
3. Fragmentar en cabina de flujo laminar hasta obtener ápices caulinares de alrededor de 3 cm de longitud.
4. Establecer en medio de cultivo compuesto por sales MS al 100%, $0,10 \text{ g.L}^{-1}$ de tiamina, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, 30 g.L^{-1} de sacarosa, 1 mg.L^{-1} de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), pH 5,7 y $2,6 \text{ g.L}^{-1}$ de *Gelrite*. Colocar en cámara de crecimiento por 21 días, a temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 13/11h de luz/oscuridad con intensidad luminosa entre $48,0$ y $62,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.
5. Multiplicar los explantes, fragmentándolos en segmentos viables, y colocarlos en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento compuesto por: $4,3 \text{ g.L}^{-1}$ de sales MS, $0,10 \text{ g.L}^{-1}$ de tiamina, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, 30 g.L^{-1} de sacarosa, pH 5,7 y $2,6 \text{ g.L}^{-1}$ de *Gelrite*. Colocar en cámara de luz natural, a temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 13/11h de luz/oscuridad con intensidad luminosa entre $48,0$ y $62,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Realizar subcultivos cada dos semanas, con un máximo de cinco subcultivos.
6. Llevar a aclimatización en casa de cultivo, plantas con presencia de un sistema radical desarrollado y al menos cinco pares de hojas. Colocar en bolsas de cultivo que contengan como sustrato zeolita, compost de cachaza, o combinaciones de ambos y aplicar riego por micro-aspersión dos veces al día por 3,0 min. Temperatura promedio durante el día de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa del 70% e intensidad luminosa entre 224 y $457 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Mantenerlas en estas condiciones por al menos 60 días.

Protocolo de propagación *in vitro* de ápices de *Stevia rebaudiana*

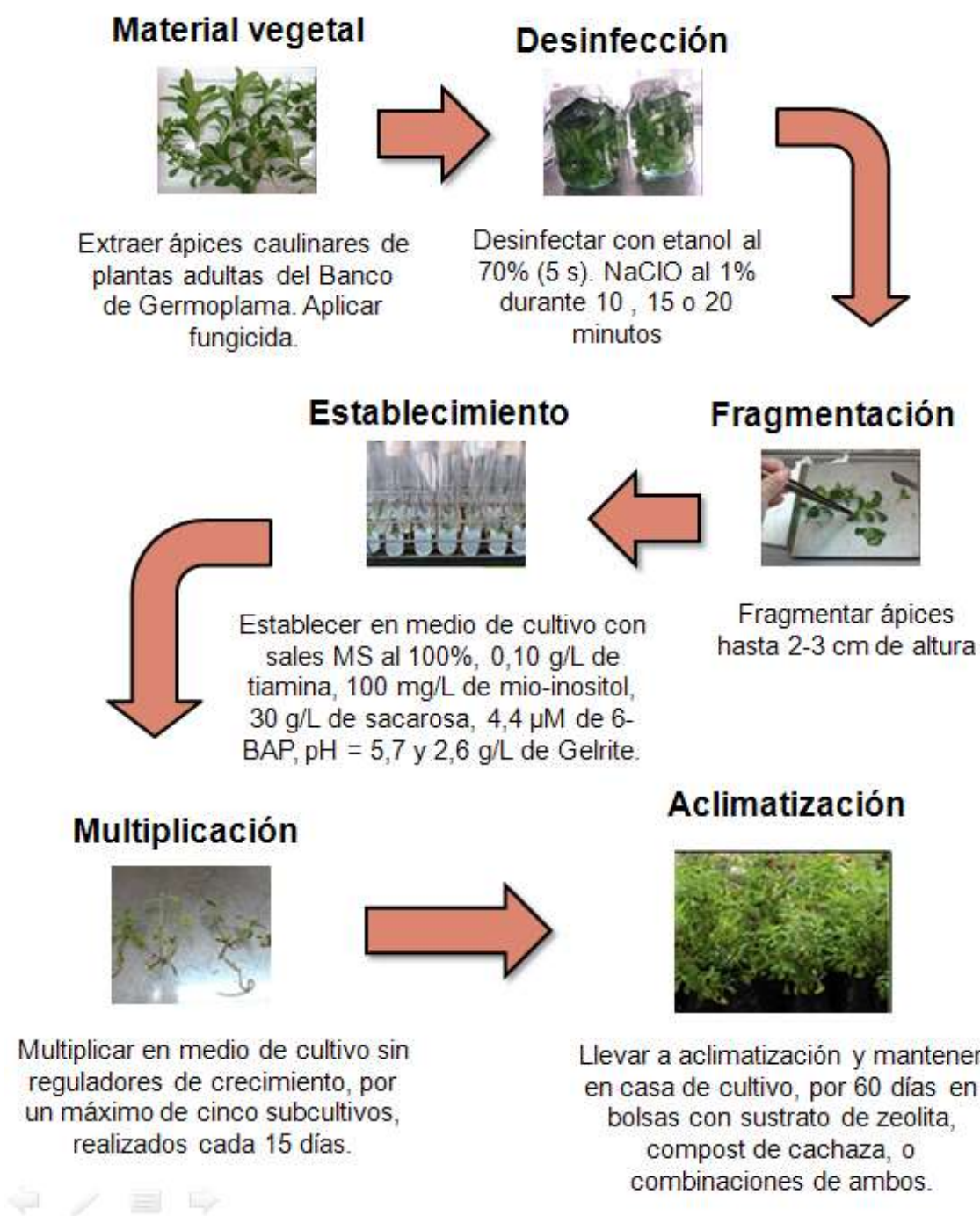


Figura 14. Propuesta de esquema de trabajo para la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de ápices de plantas cultivadas *ex vitro*.

5. DISCUSIÓN

5.1 Determinación de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición para el establecimiento *in vitro* de ápices de *S. rebaudiana*

El establecimiento es una etapa determinante dentro del cultivo *in vitro*, pues de ella depende el posterior estado de las características sanitarias, fisiológicas y genéticas del explante. La contaminación microbiana es uno de los principales problemas de esta fase, y su fuente primaria generalmente es la propia planta donadora (Gómez-García, 2013). Para disminuir dicha contaminación se han utilizado diferentes estrategias que incluyen tanto los tratamientos a las plantas madres, como a los explantes.

El tiempo de exposición, contrario a lo esperado, a la evidencia empírica y a lo referido en la literatura, no mostró tener influencias significativas sobre las variables analizadas; tampoco la interacción entre ambos factores. La concentración de NaClO, que resultó el factor determinante, mostró correlaciones con el número de explantes muertos y con el porcentaje de contaminación, como se esperaba.

Se observó que mientras aumentaba la concentración del agente desinfectante, también se incrementó el daño a los explantes (resultaron dañados solo cuatro de los 90 sometidos a la mínima concentración y 65 de los sometidos a la máxima). De manera contraria, bajas concentraciones produjeron mayor número de explantes contaminados (33 con la menor concentración y solo cuatro con la mayor). Se seleccionó la concentración donde que permitiera obtener el máximo porcentaje de supervivencia con el mínimo de contaminación. Según los resultados la concentración de NaClO al 1% fue el tratamiento donde se produjo menor afectación del explante y mayor desinfección.

En la literatura científica, se ha descrito el uso de NaClO al 1% como agente de desinfección y diferentes tiempos de exposición en varios trabajos (Shatnawi *et al.*, 2011; Namdari *et al.*, 2015; Martínez-Rivillas *et al.*, 2016), en contraposición al uso de bicloruro de mercurio (HgCl₂) (Modi *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2014). Estos últimos han referido haber alcanzado muy bajos índices de contaminación, pero es necesario destacar que el HgCl₂ es un producto altamente tóxico y difícil de eliminar de los explantes (Gómez-García, 2013).

Específicamente Martínez-Rivillas *et al.* (2016), obtuvieron con igual concentración de NaClO, pero menos tiempo (5 min), una supervivencia de 83,33% y una desinfección del

66,67%, utilizando como explantes brotes jóvenes. Los resultados del presente trabajo en este aspecto son superiores (supervivencia: 90-96,67% y desinfección: 74,07-79,31%). Lo cual implica que el proceso de desinfección propuesto es más ventajoso.

El uso de ápices de tallos adultos como explantes para la multiplicación *in vitro* ha sido poco difundido, destacando investigaciones como las de Tamura *et al.* (1984) y Das *et al.* (2011). Ambas utilizaron medios de cultivo basales compuestos con bajas concentraciones de algún regulador de crecimiento (como kinetina), para el establecimiento. Condiciones estas, similares a las empleadas en el presente estudio.

Por eso se recomienda durante el proceso de desinfección tratar los explantes, luego de someterlos a la acción de detergentes, de fungicidas y de etanol al 70%, con NaClO al 1% durante un tiempo de exposición no menor a 10 minutos y no mayor a 20 minutos. Luego, fragmentar los explantes y establecerlos en medio de cultivo basal y llevarlos a cámara de luz natural.

5.2 Determinación del efecto de los reguladores del crecimiento y del número de subcultivos en la multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*

5.2.1 Determinación del efecto del 6-BAP y el AIA en la multiplicación de brotes *in vitro*

Un balance apropiado entre los reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas) en el medio de cultivo es necesario para la multiplicación de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas (Jiménez, 1998). Según Nomberto (2001), el efecto de los reguladores de crecimiento depende, en gran medida de los valores endógenos que presente el explante, por lo que se evaluaron diferentes concentraciones de los mismos.

En este trabajo, los coeficientes de multiplicación obtenidos de los tratamientos que contenían medios de cultivo con reguladores de crecimiento no fueron significativamente diferentes entre ellos, o respecto al control sin reguladores. Los resultados obtenidos por la literatura científica conforman dos grupos: uno donde los reguladores de crecimiento inciden definitivamente en el crecimiento, desarrollo, y producción de brotes de los explantes; y otro donde no muestran acción alguna en el proceso (Gantait *et al.*, 2014).

Canchignia-Martínez *et al.* (2008) en la propagación vegetativa de dos variedades de banano y una de plátano utilizaron diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento, para evaluar el número, la longitud y el diámetro de los brotes. En esta

investigación, no se encontraron diferencias entre las concentraciones de 6-BAP y AIA utilizadas. Mientras que Pratibha *et al.* (2010) evaluaron varias concentraciones de diferentes reguladores del crecimiento: kinetina, 6-BAP y la combinación de 6-BAP y ANA sobre la inducción de brotes a partir de explantes nodales. Alcanzando los mejores resultados en los aspectos evaluados con la concentración de 4 mg.L⁻¹ de kinetina. Este regulador del crecimiento ha sido ampliamente usado en los trabajos referentes a *Stevia*, aunque la literatura informa resultados tanto positivos como negativos de su uso. Para futuras investigaciones podría evaluarse el efecto de este regulador de crecimiento dentro del protocolo propuesto.

La investigación de Condori-Laurente (2013) mostró que la adición de reguladores de crecimiento no influyó significativamente en la supervivencia, ritmo de crecimiento ni en el número de hojas por planta. Asimismo, en el estudio efectuado por Modi *et al.* (2012), se empleó positivamente para la multiplicación, un medio de cultivo MS modificado compuesto con sacarosa, agar y sin ningún regulador del crecimiento. En ese estudio, el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, como en la presente investigación, fue capaz de inducir la formación de raíces.

El propio trabajo de Modi *et al.* (2012), al que se hace referencia, expone que la utilización de diversos medios de cultivo con la adición de los reguladores del crecimiento 6-BAP y kinetina, indujo la aparición de hiperhidricidad y otras deformaciones en los explantes después de algunos subcultivos. Mientras que Martínez-Rivillas *et al.* (2016) informaron una disminución del área foliar y un acortamiento de los tallos de los explantes tras el tercer subcultivo en medio de cultivo con reguladores de crecimiento. Características que desaparecerían tras subcultivar los explantes en medio de cultivo sin reguladores del crecimiento. Quiala *et al.* (2004) advirtieron que la presencia de algunas concentraciones de 6-BAP en el medio de cultivo pueden inducir hiperhidricidad en los explantes, lo cual se corresponde con este estudio.

Los síntomas que caracterizan el fenómeno de hiperhidricidad difieren entre los tipos de plantas. Los síntomas visuales aparecen solo después de cierto período de tiempo bajo condiciones específicas de cultivo y de acuerdo a la naturaleza de los explantes. Varios factores se han informado como causantes de hiperhidricidad, sin embargo estos solo inducen o evocan este fenómeno cuando otras condiciones del sistema de cultivo (el medio de cultivo, el recipiente, el ambiente o el explante) no son los óptimos (Debergh *et al.*, 1992). Ese trabajo, también pone como ejemplo que la adición de 6-BAP provoca

hiperhidricidad cuando los cultivos se encuentran además bajo otros factores de estrés, como la alta capacidad de retención de agua en la parte superior del recipiente.

La utilización del medio de cultivo de multiplicación libre de reguladores de crecimiento, puede llegar a representar una situación ventajosa. Pues, además de hacer más barato el proceso de propagación *in vitro*, permite obtener coeficientes de multiplicación relativamente cercanos a los alcanzados mediante la utilización de medios de cultivo con reguladores, pero sin el peligro de inducir deformaciones morfológicas, o incluso genéticas.

5.2.2 Determinación del efecto del número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación

Durante el cultivo *in vitro* de *S. rebaudiana*, se realizaron un total de cinco subcultivos en medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento. De ellos, el tercer subcultivo mostró el mayor coeficiente de multiplicación. No fue posible continuar con el proceso de propagación luego del quinto subcultivo, debido al estado del material vegetal. Por lo que bajo las condiciones propuestas, no se puede extender el proceso de multiplicación por más de tres meses.

En la literatura, algunos trabajos han evaluado el efecto del número de subcultivos sobre la propagación *in vitro*, al determinar esta relación como negativa. Gómez *et al.* (2007) estudiaron el efecto de subcultivos sucesivos sobre la producción de microtallos de líneas organogénicas de *Eucalyptus globulus* Labill. Los resultados indicaron una disminución en la cantidad de microtallos desde el 3ro al 6to subcultivo, que fue acompañada por una compactación general de los macizos de proliferación.

Los resultados de Villafranca *et al.* (1998) mostraron que el número de subcultivos tuvo un efecto adverso en el vigor de las plántulas. La masa seca de las plántulas y la tasa de crecimiento, decrecieron continuamente al incrementarse los subcultivos. También se perdió progresivamente el estímulo tuberizante presentado por la planta madre. Ríos *et al.* (2005) determinaron el número de subcultivos y el diámetro basal en el cual se obtiene la mayor tasa de enraizamiento *ex vitro* para microtallos de castaño. Sus resultados mostraron una disminución de la capacidad de enraizamiento a medida que aumentó el número de subcultivos.

En *Stevia* poco se ha estudiado el efecto de un número máximo de subcultivos. Sin embargo, Lyakhovkin *et al.* (1993) coinciden con el presente trabajo, en un número promedio recomendado de cinco subcultivos. Aun así, más importante parece ser, el período en que se realizan los mismos: 30 días (Preethi *et al.*, 2011), 30-45 (Jiménez Quesada, 2011), 28 días (Modi *et al.*, 2012) etc. Cabe destacar que todos estos utilizan medios de cultivo con reguladores de crecimiento (6-BAP-kinetina/6-BAP + ANA, AIA, AIB).

Laribi *et al.* (2012) y Martínez-Rivillas *et al.* (2016) coinciden con el presente estudio en la implementación de períodos de subcultivos de 2 semanas, sin embargo refieren que esto solo es posible gracias a la adición de reguladores de crecimiento. En ese sentido, los resultados alcanzados son evidentemente diferentes, pues se obtuvieron intervalos similares de multiplicación sin el empleo de dichos reguladores de crecimiento.

La imposibilidad de mantener períodos de subcultivos superiores a dos semanas y de prolongar el proceso de multiplicación por más de cinco subcultivos, podría estar relacionada con las condiciones de cultivo *in vitro*, la cantidad del medio de cultivo y el tipo de recipiente utilizado. Es probable que variando estas condiciones se puedan determinar los valores óptimos que permitan extender los períodos alcanzados.

Los coeficientes de multiplicación que se obtuvieron en el presente trabajo resultaron inferiores respecto a otros reflejados en la literatura. Debido a que generalmente los protocolos de propagación *in vitro* se auxilian de los reguladores del crecimiento para inducir la formación de brotes múltiples. Tamura *et al.* (1984) consiguieron la formación de 40 brotes múltiples por explante al adicionar al medio de cultivo 10 mg.L⁻¹ de kinetina. Por su parte, Das *et al.* (2011) lograron la formación de 11 brotes a partir de cada explante al emplear 2 mg.L⁻¹ de este mismo regulador. Sin embargo, el empleo de concentraciones elevadas del regulador de crecimiento kinetina, según Pratibha *et al.* (2010) puede provocar una alta incidencia de variaciones morfológicas y genéticas.

Laribi *et al.* (2012) obtuvieron 4,25 brotes por explante al utilizar 1 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 0,25 mg.L⁻¹ de AIA. Mientras que Martínez-Rivillas *et al.* (2016) alcanzaron para el tratamiento control (medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento) 1,01 brotes por ápice inicial y para el tratamiento con mejor desempeño (0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 0.5 mg.L⁻¹ de AIB) obtuvieron tres brotes por explante. Los resultados de la presente investigación se acercan a estos últimos (coeficiente de multiplicación mínimo de 1,84 y máximo de 2,81)

para el mismo tipo de explante, pero sin el empleo de reguladores del crecimiento. Esto implica que se minimizan los efectos negativos de la adición de los reguladores de crecimiento y la continuidad del proceso de multiplicación, sobre la planta. Pero provoca una disminución del número de plantas propagadas *in vitro*. Como ventaja, es posible ejecutar la multiplicación en corto tiempo.

5.3 Determinación de la influencia de diferentes sustratos sobre la supervivencia de plantas propagadas *in vitro* de *S. rebaudiana* durante la fase de aclimatización *ex vitro*

La composición del sustrato es uno de los elementos imprescindibles a tener en cuenta durante la fase de aclimatización *ex vitro*, debido a que de este depende la adecuada retención de humedad y los componentes químicos necesarios. Además influye significativamente en la arquitectura del sistema radical, influenciando el estado nutricional y el transporte de agua en la planta (Gómez-García, 2013).

Según Aguirre-Dávila (2008), *Stevia* ha sido cultivada en una amplia gama de suelos, con diferentes características fisicoquímicas (tanto arenosos como orgánicos). En el presente trabajo se arribó a la misma conclusión, pues no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las plantas cultivadas en medio orgánico (compost de cachaza) y las cultivadas en zeolita.

De forma similar, la literatura científica refiere una amplísima gama de sustratos utilizados: Cifuentes-Hidalgo (2003) alcanzó un promedio de 13% de supervivencia con un sustrato de 25% Promix y 75% Arena. Aguirre-Dávila (2008) utilizó un sustrato compuesto por humus de lombriz, pomina y fibra de coco con una relación de 2:1:1, mostrando una supervivencia del 96% y un 25% de contaminación. Khan *et al.* (2014) evaluaron varias combinaciones de tierra, *Soilrite* y vermiculita, siendo la mejor proporción 2:1:1 que alcanzó una supervivencia de 75%. Las condiciones de manejo y las combinaciones de sustrato evaluadas en este trabajo, permitieron alcanzar entre 80 y 85% de supervivencia en los sustratos compuestos, y 90% en los sustratos puros.

Es una gran ventaja que la especie en cuestión cuente con tanta plasticidad de sustrato y mantenga, según los resultados alcanzados, altas tasas de supervivencia en medios tan diferentes. Esto permite transferir a las plantas hacia la fase de aclimatización exitosamente, con independencia del sustrato. Es posible utilizar el sustrato más

económico, o de mayor disponibilidad, indistintamente sin afectar la productividad y de acuerdo con las condiciones del lugar donde se ejecute.

5.4 Comparación de plantas de *Stevia rebaudiana* obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes

5.4.1 Evaluación de variables morfológicas de las plantas en aclimatización *ex vitro*

El cultivo *in vitro* presenta entre sus ventajas la producción de plantas más vigorosas, uniformes y sanas (George y Debergh, 2008). Por lo que es de esperar que al comparar morfológicamente plantas reproducidas *in vitro*, con otras propagadas mediante técnicas convencionales, las primeras alcancen mejores indicadores. Los resultados del presente estudio avalaron esta hipótesis. Aunque el número de tallos no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, sí fueron estadísticamente diferentes el número de hojas y la altura.

En la literatura no existen muchas referencias a este tipo de comparación para la especie (entre plantas reproducidas *in* y *ex vitro*). Pues el desarrollo de protocolos de propagación *in vitro* solo comprende, generalmente, hasta la evaluación de la supervivencia en la transferencia a fase de aclimatización. Las evaluaciones de desempeño una vez en esta fase solo son reflejadas por algunos trabajos de reproducción vegetativa por esquejes o de producción y extracción de los metabolitos secundarios.

Sin embargo algunos trabajos analizan el desempeño de plantas provenientes de explantes apicales como superior respecto a otras fuentes. Araujo *et al.* (2016) determinaron la longitud promedio, tamaño de raíces y peso seco de plantas en sustrato estéril con potasio, calcio, fósforo, magnesio y materia orgánica. En ese trabajo las plantas fueron propagadas a partir de yemas apicales y laterales, en varios tipos de envases y con diferentes dosis del enraizador comercial Razormín. Donde los pesos secos y la longitud de las raíces fueron mayores en los esquejes con yemas apicales a los provenientes de segmentos internodales. Debido posiblemente a las características meristemáticas del tipo de tejido que presentan estos explantes.

Aguirre-Dávila (2008) también evaluó las variables altura, supervivencia y enraizamiento de diferentes fuentes (apicales y uninodales) en varios sustratos: fibra de coco y sustrato compuesto por humus de lombriz, pomina y fibra de coco (2:1:1). Este estudio determinó

que las plantas propagadas a partir de ápices se adaptan mejor a la fibra de coco y pueden desarrollar más hojas, pero que no había influencia alguna del tipo de explante o el sustrato sobre la altura de la planta.

En este aspecto el presente estudio ofrece una información novedosa para esta especie, pues no se han realizado con anterioridad este tipo de comparaciones que ofrecen evidencia de la superioridad cualitativa y cuantitativa de las plantas reproducidas *in vitro* sobre las reproducidas por esquejes.

5.4.2 Comparación de los patrones de amplificación de ADN de las plantas obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes

Para la extracción de ADN genómico de *Stevia rebaudiana*, se refieren en la literatura diversos protocolos empleados, casi todos a base de CTAB. Por ello se decidió evaluar dos protocolos diferentes que incluyen este producto, propuestos por Doyle y Doyle (1990) y Khayat *et al.* (2004), ambos con las modificaciones explicadas en el acápite 3.4.2

El protocolo de Khayat *et al.* (2004), no funcionó en las condiciones establecidas. No fue posible aislar y observar el ADN genómico de esta especie mediante electroforesis, aunque el protocolo se repitió en tres ocasiones. Mientras que el protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990) funcionó a la perfección permitiendo obtener aislados de ADN genómico de todas las muestras analizadas.

La relación entre los valores de densidad óptica 260/280 permite inferir si existe contaminación de la muestra con proteínas y aminoácidos aromáticos y su valor ideal es dos. Mientras que la relación de absorbancia 260/230 está asociada a la contaminación por fenoles y debe ser superior a uno. Al analizar las muestras de ADN purificadas por el protocolo de CTAB, mediante espectrofotometría, se obtuvieron altas concentraciones de ADN genómico y valores de densidad óptica cercanos a los recomendables.

Los marcadores moleculares RAPD proveen una manera rápida y eficiente de observar y registrar secuencias polimórficas de ADN en un gran número de *loci*. La mayor ventaja de esta técnica radica en que no requiere una pre-secuenciación del ADN. El gran rango de cebadores potenciales que pueden ser utilizados, le dan a la técnica un gran poder de diagnóstico (Kumari y Thakur, 2014).

En *Stevia*, la técnica RAPD se ha utilizado para analizar variaciones somaclonales con anterioridad (Moktaduzzaman y Mahbubur-Rahman, 2009; Modi *et al.*, 2012). En estos trabajos se perseguía principalmente obtener similitudes (monomorfismos) entre una planta madre y varias plantas propagadas *in vitro* a partir de esta. El presente estudio, se enfoca en realizar una comparación de perfiles polimórficos, para comprobar que se mantiene la variabilidad introducida y la estabilidad genética de la especie.

De los seis cebadores empleados en las reacciones de amplificación, solo uno (R1: 5'-CGACCGCAGT- 3') fue capaz de amplificar. Este produjo 63 bandas totales para las 10 muestras analizadas. En la literatura se refiere con frecuencia que solo una parte de los cebadores totales utilizados llega a aportar productos de amplificación. Tal es el caso del trabajo de Modi *et al.* (2012), donde del total de 80 cebadores probados, solo seis mostraron bandas. Mientras que Moktaduzzaman y Mahbubur-Rahman (2009) probaron dos cebadores y solo uno amplificó.

Los datos de la amplificación de un solo cebador no son suficientes para establecer un perfil genético. Pues la presencia de bandas iguales puede ser producto del peso molecular de los fragmentos y no de su secuencia. Mientras que la ausencia de bandas no puede ser atribuida exclusivamente a la falta de la secuencia esperada, pues puede deberse simplemente a la no amplificación por otros motivos como degradación o poca cantidad de ADN (Kumari y Thakur, 2014). Sin embargo la literatura científica asegura que el producto de amplificación de un solo cebador con muchas bandas permite inferir un perfil genético preliminar, y es suficiente para tener una idea general sobre el grado de similitud y distancia genética (Moktaduzzaman y Mahbubur-Rahman, 2009). Aún así, se recomienda la utilización de un mayor número de cebadores para asegurar varias amplificaciones y poder contar con datos suficientes para realizar un análisis más completo, sobre la incidencia de variaciones somaclonales como consecuencia del cultivo *in vitro*.

El dendograma UPGMA de distancia genética confeccionado con los datos obtenidos mostró que la variabilidad genética entre ambos grupos de plantas es similar. La distancia genética se mantuvo entre 0 y 0,66 (similitud entre 0,33 y 1), valores correspondientes a la variabilidad genética individual dentro de una misma especie. Por lo que es posible afirmar que el protocolo permite conservar la variabilidad intrínseca de la especie, evitando plantaciones monoclonales que pudieran ser susceptibles a un mismo patógeno o a una condición física específica (Murillo-Gamboa *et al.*, 2016).

De acuerdo a las comparaciones realizadas, se evidencia que las plantas propagadas *in vitro* muestran un mejor desarrollo morfológico en condiciones de casa de cultivo, en comparación con las propagadas mediante técnicas tradicionales de corte de esquejes. Además, muestran la gran ventaja de mantener relativamente estable el nivel de variabilidad genética introducida. Estos elementos apoyan la validación del protocolo.

De manera general el protocolo propuesto en esta investigación es simple y de fácil implementación. Esto se debe primeramente al tipo de explante utilizado (ápices), que permite mantener la variabilidad genética de la especie, además de ser un tipo de explante con grandes capacidades de regeneración y crecimiento. Luego, al proceso de desinfección que garantiza el máximo de supervivencia/desinfección de los mismos, evitando pérdidas excesivas.

La multiplicación sin reguladores de crecimiento implica una disminución del costo asociado a la compra de este compuesto, a la vez que elimina posibles efectos adversos como malformaciones y minimiza las variaciones somaclonales. Mientras que el corto período de tiempo entre los subcultivos agiliza considerablemente el proceso, sin contar que no es necesario el paso de los explantes a la fase de enraizamiento. El uso de cualquier tipo de sustrato (mineral u orgánico) brinda una versatilidad de disposición y abarata la implementación de la fase de aclimatización.

Con el protocolo propuesto sería posible mantener una línea de producción que posibilite la extracción de los metabolitos secundarios (esteviósidos y rebaudiósidos) de manera continua. De esa manera se podría disponer de grandes cantidades de ese edulcorante natural para ser comercializado entre la población y dirigido además específicamente al tratamiento de los pacientes diabéticos y prediabéticos. Así como para ser utilizado en la industria nacional sustituyendo edulcorantes artificiales de obligada importación comercial.

CONCLUSIONES

1. Se establecieron explantes de *S. rebaudiana* en condiciones *in vitro*, determinando que la concentración de NaClO más efectiva para el proceso de desinfección fue de 1% y puede ser aplicado durante el rango de tiempo evaluado.
2. La multiplicación *in vitro* de brotes de *S. rebaudiana* debe ser realizada sin reguladores de crecimiento durante cinco subcultivos cada 15 días de cultivo.
3. Se comprobó que el sustrato de zeolita, el compost de cachaza o sus combinaciones, pueden ser empleados durante la aclimatización de *S. rebaudiana*.
4. Las plantas propagadas *in vitro* fueron genéticamente similares y desarrollaron mayor altura y número de hojas, en comparación a las propagadas mediante corte de esquejes.
5. Se obtuvieron plantas propagadas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de ápices de plantas cultivadas *ex vitro*, mediante el desarrollo y la implementación de un protocolo de propagación *in vitro*.

RECOMENDACIONES

1. Analizar si existen variaciones somaclonales como consecuencia del proceso de propagación *in vitro*, empleando la técnica RAPD con otros cebadores específicos.
2. Perfeccionar las condiciones de cultivo *in vitro* del protocolo propuesto, para aumentar el número de subcutivos y el coeficiente de multiplicación de los brotes de *S. rebaudiana*.
3. Comparar los perfiles metabólicos de las plantas propagadas *in vitro* y las propagadas por corte de esquejes, con el objetivo de establecer una línea de producción y extracción de edulcorantes naturales.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. Aguirre-Dávila, X. D. (2008) Evaluación de un sistema de producción in vitro y en invernadero de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. In: *Departamento de Ciencias de la Vida*. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.
2. Alhady, M. R. A. A. (2011) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni.: A New Sweetening Crop in Egypt. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 6: 178-182.
3. Ali, A.; Gul, I. I.; Naz, S. y Afghan, S. (2010) Biochemical investigation during different stages of in vitro propagation of *Stevia rebaudiana*. *Pakistan Journal of Botany*. 42: 2827-2837.
4. Alvarenga, S. (2005) Optimización del cultivo y procesamiento de *Stevia rebaudiana* para la obtención de un edulcorante natural. In: *CONICIT*. San José, Costa Rica.
5. Anbazhagan, M.; Kalpana, M. y Rajendran, R. (2010) In vitro production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 22: 216–222.
6. Araujo, Y.; Lugo, Z.; Rosales, M. C.; Monroy, J.; Sánchez, R. y González, L. (2016) Propagación vegetativa de la stevia en el estado Mérida, Venezuela. *Agronomía de la producción*.
7. Besspalhok-Filho, J. C.; Vieira, L. G. E. y Hashimoto, J. M. (1992) Factors influencing the in vitro micropropagation of axillary shoots of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 4: 59-61.
8. Besspalhok-Filho, J. C.; Hashimoto, J. M. y Vieira, L. G. E. (1993) Induction of somatic embryogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 5: 51-53.
9. Besspalhok-Filho, J. C. y Hattori, K. (1997) Embryogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni floret explants. . *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 9: 185-188.
10. Canchignia-Martínez, H. F.; Espinoza-Roca, M. D.; Benavides-Velasquez, G. R.; Saucedo-Aguiar, S. G.; Carranza-Patiño, M. S. y Cevallos-Falquez, O. F. (2008) Propagación Vegetativa de Plátano y Banano con la Aplicación de Benzilaminopurina (6-BAP) y Acido Indolacetico (AIA). *Ciencia y Tecnología*. 1: 11-15.

11. Cifuentes-Hidalgo, E. M. (2003) Enraizamiento in vitro y aclimatación de *Stevia rebaudiana* B. In: *Carrera de ciencia y producción agropecuaria*. Zamorano, Honduras: Zamorano.
12. Clemente, M. (1999) In vitro Culture (IVC) and Plant Conservation. *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. pp. 77-86. London: Manson Publishing.
13. Condori-Laurente, K. (2013) Efecto de dosis de Bencilaminopurina (BAP) y el Ácido naftalemacético (ANA) en la producción in vitro de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) en Acobamba. In: *Facultad de Ciencias Agrarias*. Acobamba, Huancavelica: Universidad Nacional de Huancavelica.
14. Chatsudthipong, V. y Muanprasat, C. (2009) Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*. 121: 41–54.
15. Das, A.; Gantait, S. y Mandal, N. (2011) Micropropagation of an Elite Medicinal Plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Agricultural Research*. 6: 40-48.
16. Debergh, P.; Aitken-Christie, J.; Cohen, D.; Grout, B.; von Arnold, S.; Zimmerman, R. y Ziv, M. (1992) Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 30: 135-140.
17. Delvalle-Báez, W. E. (2001) Propagación in vitro de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. In: *Carrera de Ciencia y Produccion Agropecuaria*. Honduras: ZAMORANO.
18. Doyle, J. J. y Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13–15.
19. Ferreira, C. M. y Handro, W. (1988) Production, maintenance and plant regeneration from cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Plant Cell Reports*. 7: 123-126.
20. Flachsland, E.; Mroginski, L. y Davina, J. (1996) Regeneration of plants from anthers of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Compositae) cultivated in vitro. *Biocell*. 20: 87-90.
21. Flores, M. y Cortés, R. (2011) *Stevia rebaudiana*: Propuesta para la Producción de Esteviósido en Biorreactor. *ITCR. Cartago, Costa Rica*. 1-7.
22. Gantait, S.; Das, A. y Mandal, N. (2014) *Stevia*: A Comprehensive Review on Ethnopharmacological Properties and In Vitro Regeneration. *Sugar Tech*.

23. Gantait, S.; Das, A. y Banerjee, J. (2017) Geographical Distribution, Botanical Description and Self-Incompatibility Mechanism of Genus *Stevia*. *Sugar Tech*.
24. Garcia-Vallvé, S. y Puigbò, P. (2002) *DendroUPGMA: A dendrogram construction utility*. [En línea] Disponible desde: <http://genomes.urv.es/UPGMA/>. [Consultado: 14-2].
25. George, E. F. (2008) Plant Tissue Culture Procedure-Background. *Plant Propagation by Tissue Culture*. pp. 1-28: The Background. Springer. Dordrecht.
26. George, E. F. y de Klerk, G. J. (2008) The components of Plant Tissue Culture Media Macro- and Micro- Nutrients. *Plant Propagation by Tissue Culture: The Background*. Springer. Dordrecht.
27. George, E. F. y Debergh, P. (2008) Micropropagation: Uses and Methods. En: George, E. F. *et al.* (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. pp. 29-64. Países Bajos, Springer.
28. Giridhar, P. y Sowmya, K. (2010) Rapid clonal propagation and stevioside profiles of *Stevia rebaudiana* Bertoni. . *International Journal of Developmental Biology*. 4: 47-52.
29. Gómez-García, L. (2013) Propagación in vitro de *Aloe vera* L. In: *Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Biología*. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
30. Gómez, C.; Ríos, D. y Sánchez-Olate, M. (2007) Efecto del subcultivo sucesivo sobre la caulogénesis adventicia de *Eucalyptus globulus*. *BOSQUE*. 28: 13-17.
31. Handro, W.; Hell, K. G. y Kerbauy, G. B. (1977) Tissue culture of *Stevia rebaudiana*, a sweetening plant. *Ciencia E Cultura*. 29: 1240-1248.
32. Jiménez, E. (1998) Cultivo de ápices y meristemas. *Biotecnología Vegetal*. 5: 45-46.
33. Jiménez Quesada, K. M. (2011) Evaluación del desarrollo in vitro de *Stevia rebaudiana* bertoni con el empleo de sistemas de micropropagación semi-sólido, inmersión temporal ritaò y biorreactor de burbujeo. In: *Escuela de Biología*. Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica.
34. Karimi, M.; Ahmadi, A.; Hashemi, J.; Abbasi, A. y Angelini, L. (2014) Effect of two plant growth retardants on steviol glycosides content and antioxidant capacity in *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni). . *Acta Physiologiae Plantarum*. 36: 1211-1219.
35. Karp, A. (1995) Somaclonal variation as a tool for crop improvment. *Euphytica*. 85: 295-302.

36. Khan, M. K.; Misra, P.; Sharma, T.; Shukla, P. K. y Ramteke, P. W. (2014) Effect of adenine sulphate on in vitro mass propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Medicinal Plant Research*. 8: 543-549.
37. Khayat, E.; Duvdevani, A.; Lehav, E. y Ballesteros, B. A. (2004) Somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine). Genetic mechanism, frequency, and application as a tool for clonal selection. En: Jain, S. y Swennen, R. (eds.). *Banana improvement: Cellular, molecular biology, and induced mutation*. pp. 99–109. Plymouth, UK: Science Publishers Inc.
38. Kornilova, O. V. y Kalashnikova, E. A. (1996) Clonal micropropagation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Izvestiya Timiryazevskoi-Sel Skokhozyaistvennoi Adademi Russia*. 1: 99-104.
39. Kumari, N. y Thakur, S. K. (2014) Randomly Amplified Polymorphic DNA-a brief review. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 9: 6-13.
40. Laribi, B.; Rouatbi, N.; Kouki, K. y Bettaieb, T. (2012) In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *A non caloric sweetener and antidiabetic medicinal plant*. 2: 333-339.
41. Linsmaier, E. M. y Skoog, F. (1967) Organic growth factor requirements of tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 51: 100-127.
42. Liopa-Tsakalidi, A.; Kaspiris, G.; Salahas, G. y Barouchas, P. (2012) Effect of salicylic acid (SA) and gibberellic acid (GA3) pre-soaking on seed germination of stevia (*Stevia rebaudiana*) under salt stress. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6: pp. 416-423.
43. Lyakhovkin, A. G.; Tran, D. L.; Titov, D. A. y Mai, P. A. (1993) Cultivation and utilization of *Stevia*. *Agricultural Publishing House. (Vietnam)*. 5-43.
44. Martínez-Rivillas, D.; Urrea, A.; Jiménez, E. y Atehortua, L. (2016) Estrategia para la propagación in vitro de *Stevia rebaudiana* Bertoni *Biotechnología Vegetal*. 16: 131 - 142.
45. Miyagawa, H.; Fujita, Y.; Fujioka, N.; Kohda, H. y Yamasaki, K. (1984) Studies on tissue culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni and its components *Shoyakugaku Zashi*. 38: 12-18.
46. Miyagawa, H.; Fujikowa, N.; Kohda, H.; Yamasaki, K.; Taniguchi, K. y Tanaka, R. (1986) Studies on the tissue culture of *Stevia rebaudiana* and its components: (II). Induction of shoot primordia. *Planta Med*. 4: 321-324.

47. Modi, A. R.; Patil, G.; Kumar, N.; Singh, A. S. y 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.*
48. Moktaduzzaman, M. y Mahbubur-Rahman, S. M. (2009) Regeneration of *Stevia rebaudiana* and Analysis of Somaclonal Variation by RAPD. *Biotechnology.*
49. Mroginski, L.; Sansberro, P. y Flasxhland, E. (2004) Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Parte V Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: Echenique, V. et al. (eds.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. pp. 35-42. Buenos Aires: editorial INTA.
50. Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A revised medium of rapid growth and essays within tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 573-497.
51. Murillo-Gamboa, O.; Salas-Rodríguez, A.; Murillo-Cruz, R. y Ávila-Arias, C. (2016) Tasa de avance de la pudrición del tronco en melina *Gmelina arborea* Roxb. y posibilidades de manejo. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*. 40-50.
52. Naidu, C.; Preethi, D. y Sridhar, T. (2011) Effect of bavistin and silver thiosulphate on in vitro plant regeneration of *Stevia rebaudiana*. . *Journal of Phytology*. 3: 74-77.
53. Namdari, N.; Shooshtari, L. y Qaderi, A. (2015) In vitro micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Biological Forum*. 7: 1750-1754
54. NCBI (2017) NCBI Taxonomy. In: *National Center for Biotechnology Information*, U.S. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: National Library of Medicine
55. Nei, M. (1972) Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist*. 106: 283-292.
56. Nomberto, C. (2001) Efecto de las Auxinas y Citocininas en la inducción de callos y regeneración, in vitro. (UNT, O. G. d. P. y. D. d. I. I. O.-. ed.).
57. ONEI (2016) Salud pública y Asistencia social. *Anuario estadístico de Cuba*. La Habana, Cuba.
58. Orellana, P. (1998) Introducción a la propagación masiva. *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*. pp. 151-178: Santa Clara: IBP.
59. Pande, S. S. y Gupta, P. (2013) Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 5: 26-33.
60. Pratibha, G.; Satyawati, S. y Sanjay, S. (2010) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* (natural sweetener) using Kinetin for Steviol Glycoside Production. *Research Journal of Biotechnology*. 5: 63-37.

61. Preethi, D.; Sridhar, T. y Naidu, C. (2011) Direct Shoot Organogenesis from Leaf Explants of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Phytology*. 3: 69-73.
62. Quiala, E.; Montalvo, G. y Matos, J. (2004) Empleo de la Biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Biotecnología Vegetal*. 4: 195-199.
63. Ramírez-Mosqueda, M. A. y Iglesias-Andreu, L. G. (2015) Direct Organogenesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni Using Thin Cell Layer (TCL) Method. *Sugar Tech*.
64. Ríos, D. L.; F., A.; Sánchez-Olate, M.; Escoba, r. R. y Pereira, G. (2005) Variación de la Tasa de Enraizamiento Asociada al Número de Subcultivo y Diámetro de Microtallos de Castaño *Castanea sativa* Mill. *Agricultura Técnica*. 65.
65. Salgado-Cordero, L. E. (2013) Requerimientos de Nitrógeno en la producción de *Stevia* en hidroponía e invernadero. Montecillo, Edo. de Mexico: Institucion de enseñanza e investigacion en ciencias agricolas.
66. Salim-Uddin, M.; Chowdhury, M. S. H.; Khan, M. M. M. H.; Uddin, M. B.; Ahmed, R. y Baten, M. A. (2006) In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bert in Bangladesh. *African Journal of Biotechnology*. 5: 1238-1240.
67. Shatnawi, M. A.; Shibli, R. A.; Abu-Romman, S. M.; Al-Mazraawi, M. S.; Al Ajlouni, Z. I.; Shatanawi, W. A. y Odeh, W. H. (2011) Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 9: 213-220.
68. Shende, C. y Manik, S. (2013) Direct regeneration from axillary bud explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni-A medicinal plant. *Journal of Agricultural Technology*. 9: 2015-2011.
69. Singh, P.; Dwivedi, P. y Atri, N. (2014) In vitro shoot multiplication of *Stevia* and assessment of stevioside content and genetic fidelity of the regenerants. . *Sugar Tech*. 16: 430-439.
70. Sivaram, L. y Mukundan, U. (2003) In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant- Mumbai, India*. 39: 520-523.
71. Soto, A. y Del Val, A. (2002) Extracción de los principios edulcorantes de la *Stevia rebaudiana*.
72. StatSoft, I. (2011) STATISTICA. pp. (data analysis software system).
73. Swanson, S. M.; Mahady, G. B. y Beecher, C. W. W. (1992) Stevioside biosynthesis by callus, root, shoot and rooted-shoot cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 28: 151-157.

74. Tamura, Y.; Nakamura, S.; Fukui, H. y Tabata, M. (1984) Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. *Plant Cell Reports Japan*. 3: 183-185.
75. Villafranca, M. J.; Veramendi, J.; Sota, V. y Mingo-Castel, A. M. (1998) Effect of physiological age of mother tuber and number of subcultures on in vitro tuberisation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports*. 17: 787–790.
76. WHO (2016) Global report on diabetes. In: *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*. Switzerland: WHO Press.
77. Yadav, A. K.; Singh, S.; Dhyani, D. y Ahuja, P. S. (2011) A review on the improvement of *Stevia* [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*. 91: 1-27.
78. Yadav, A. K.; Tomar, S. S.; Jha, A. K. y Singh, J. (2017) Importance of Molecular Markers in Livestock Improvement: A Review. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 5: 614-622.
79. Yang, Y. W. y Chang, C. W. (1979) In vitro plant regeneration from leaf explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Z. Pflanzenphysiol*. 93: 337-343.
80. Yang, Y. W.; Hsing, Y. y Chang, W. (1981) Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni through axillary shoot proliferation in vitro. . *Botanic Bulletin Academia Sinica*. 22: 57-62.
81. Yao, Y.; Ban, M. y Brandle, J. (1999) A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. *Genome*. 42: 657–661.

Anexo 1: Protocolos de regeneración *in vitro* de *Stevia rebaudiana* vía organogénesis directa

Referencia	Tipo de explante	Multiplicación					Enraiz (mg.L ⁻¹)	Superv <i>ex vitro</i>
		RC (mg.L ⁻¹)	brotos	Sbc.	Características	Deficiencias		
Yang <i>et al.</i> (1981)	Brotos axilares	2 6-BAP 10 Kin 10 2iP	15 mx	50 d	Medio semisólido	Formación de callos	0,1 ANA	---
Tamura <i>et al.</i> (1984)	Ápices	10 Kin	40 mx	30-50 d	Frascos de vidrio, medio semisólido	Altos niveles de Kin	0,1 ANA	83%
Sivaram y Mukundan (2003)	Ápices, segmentos nodales y hojas	8,87 6-BAP + 5,71 IAA	---	---	---	---	4,90 AIB	---
Debnath (2008)	Segmentos nodales y yemas axilares	2 6-BAP + 1,13 AIA	39 mx	30 d	Frascos de vidrio, medio semisólido	Formación de callos	2 AIB	---
Anbazhagan <i>et al.</i> (2010)	Ápices, segmentos nodales y hojas	1 6-BAP + 0,5 AIA	---	---	---	---	1 AIA	---
Preethi <i>et al.</i> (2011)	Hojas	2 6-BAP + 0,5 Kin + 0,1 AIA	28.7	30 d	Frascos de vidrio, medio semisólido	Malformaciones en brotes	2 AIB	100%

Das <i>et al.</i> (2011)	Ápices, segmentos nodales y yemas axilares	2 Kin	11	---	Frascos de vidrio, medio semisólido	---	No RC	93,09%
Laribi <i>et al.</i> (2012)	Segmentos nodales	1 6-BAP + 0,25 AIA	4,25	---	Tubos de ensayo	---	0,5 AIA	67%
Modi <i>et al.</i> (2012)	Segmentos nodales	No RC	9,56	28 d	Contenedores plásticos, medio líquido	---	No RC	80%
Martínez- Rivillas <i>et al.</i> (2016)	Ápices y segmentos nodales	0,5 6-BAP + 0,2 AIB	3	15 d	Contenedores plásticos, medio semisólido	Hiperhidricidad	0,5 AIB	---

Kin: Kinetina; 6-BAP: 6-bencilaminopurina; 2iP: N6-(2-isopentil)-adenina; ANA: ácido naftalenacético; AIA: ácido indol-3-acético; AIB: ácido indol-3-butírico