

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS – I.A.S.A.
“GRAD. CARLOMAGNO ANDRADE PAREDES”

EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN *in vitro* Y EN INVERNADERO DE PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni.

previa a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

XAVIER DAVID AGUIRRE DÁVILA

Sangolquí, Enero de 2008.

II

I.A.S.A.

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN *in vitro* Y EN
INVERNADERO DE PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni.**

2008

CERTIFICACIÓN

Certificado que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sr. XAVIER DAVID AGUIRRE DÁVILA. Como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO AGROPECUARIO.

Lunes 28 de Enero, 2008

Ing. Juan Tigrero M.Sc.
DIRECTOR

Dr. Darwin Rueda M.Sc.
CODIRECTOR

Ing. Jaime Villacís M.Sc.
BIOMETRISTA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD

Xavier David Aguirre Dávila

DECLARO QUE:

El proyecto de grado denominado "Evaluación de un Sistema de Producción *in vitro* y en Invernadero de plantas de *Stevia Rebaudiana* Bertoni", ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 28 de enero del 2008.

Xavier David Aguirre Dávila

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

CERTIFICADO

In. Juan Tigrero y Dr. Darwin Rueda

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado "Evaluación de un Sistema de Producción *in vitro* y en Invernadero de plantas de *Stevia Rebaudiana* Bertoni", realizado por Xavier David Aguirre Dávila, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido al avance técnico y científico de este trabajo si se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo consta de (un) documento empastado y (un) disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat(pdf). Autorizan a Xavier David Aguirre Dávila que lo entregue al Ing. Álvaro Yépez, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 28 de enero del 2008.

Ing. Juan Tigrero
DIRECTOR

Dr. Darwin Rueda
CODIRECTOR

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

AUTORIZACIÓN

Yo, Xavier David Aguirre Dávila

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo "Evaluación de un Sistema de Producción *in vitro* y en Invernadero de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni", cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

El Prado, 28 de Enero del 2008

Xavier David Aguirre Dávila

DEDICATORIA

Dedico esta obra y toda mi carrera a mi abuelo César Aguirre, mi mentor y ángel de la guarda.

Xavier David Aguirre Dávila

AGRADECIMIENTO

Agradezco la culminación de éste capítulo de mi vida a mi familia: mi padre Xavier Aguirre, mi madre Nora Dávila, mis hermanas Fernanda y Claudia y a mi sobrino Adrián.

A mis amigos Hugo Landázuri, Lucía Jiménez, Belén Negrete, David Sánchez, Belén Ortiz, Anita Dávila, Lisseth Salazar, Denisse Espín, Juan Merino, Gina Cruz, Mónica Molina, Patricia Betancourt, Fernanda Tufiño, Anita Proaño, Carolina Corral, Trinidad Chaguaro.

A mis maestros amigos: Ing. Patricia Falconí, Ing. Lucía Jiménez, Ing. Elizabeth Urbano e Ing. Marco Luna.

Al excelente equipo de amigos del laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias IASA que me apoyó y ayudó a lo largo de este estudio: Ing. Juan Tigrero, Dr. Darwin Rueda, Ing. Pablo Landázuri, Dra. Viviana Yáñez, Ing. Jaime Villacís, Ing. Abraham Oleas, Lic. Marco Taco, Srta. Adriana Terán y muy especialmente a mi amiga incondicional Ivonne Vaca.

De corazón gracias a todos, por haber creído en mi y por darme su apoyo incondicional.

Xavier David Aguirre Dávila

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:

XAVIER DAVID AGUIRRE DÁVILA

COORDINADOR DE LA CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ING. ÁLVARO YÉPEZ REGALADO

AB. CARLOS OROZCO
SECRETARIO ABOGADO
DELEGADO UNIDAD ADMISIÓN Y REGISTRO

XI

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS – I.A.S.A.

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN *in vitro* Y EN INVERNADERO
DE PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni.**

XAVIER DAVID AGUIRRE DÁVILA

2008

XII

I.A.S.A.

EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN *in vitro* Y EN INVERNADERO DE PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni.

2008

EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN *in vitro* Y EN
INVERNADERO DE PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni.

XAVIER DAVID AGUIRRE DÁVILA

REVISADO Y APROBADO:

Sr. Ing. Álvaro Yépez

Coordinador de la Carrera de Ciencias Agropecuarias – IASA I

Ing. Juan Tigrero M.Sc
DIRECTOR

Dr. Darwin Rueda M.Sc
CODIRECTOR

Ing. Jaime Villacís M.Sc
BIOMETRISTA

Abg. Carlos Orozco
Delegado de la Unidad de Admisión y Registro – IASA I

EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN *in vitro* Y EN
INVERNADERO DE PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni.

XAVIER DAVID AGUIRRE DÁVILA

Aprobado por los señores miembros del tribunal de calificación del informe técnico.

	CALIFICACIÓN	FECHA
DIRECTOR		
Ing. Juan Tigrero M.Sc
CODIRECTOR		
Dr. Darwin Rueda M.Sc

Certifico que estas calificaciones fueron presentadas en esta secretaría.

Abg. Carlos Orozco

Delegado de la Unidad de Admisión y Registro – IASA I

El Prado, 28 de Enero de 2008

CERTIFICADO

Los infraescritos Director y Codirector de la tesis del alumno XAVIER DAVID AGUIRRE DÁVILA, titulada “EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN *in vitro* Y EN INVERNADERO DE PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni” certificamos que fueron presentados los discos compactos que contienen el documento completo de la defensa del proyecto de investigación.

Ing. Juan Tigrero M.Sc

DIRECTOR

Dr. Darwin Rueda M.Sc

CODIRECTOR

El Prado, 28 de Enero de 2008

AUTORIZACIÓN

Por medio de la presente autorizo publicar mi proyecto de tesis titulado “EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN *in vitro* Y EN INVERNADERO DE PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni” en la página web de la ESPE.

XAVIER DAVID AGUIRRE DÁVILA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
III. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. STEVIA REBAUDIANA Bertoni.....	4
3.1.1. Origen y Distribución.....	4
3.1.2. Descripción botánica.....	5
3.1.3. Condiciones Climáticas de desarrollo de la planta.....	6
3.1.4. Características agronómicas.....	7
3.1.5. Edulcorantes presentes en <i>Stevia rebaudiana</i>	7
3.1.6. El consumo de Edulcorantes.....	9
3.1.7. Importancia de la Stevia sobre la Salud Humana.....	10
3.1.8. Propagación de Stevia.....	11
3.1.9. Propagación <i>in vitro</i> y Cultivo de Tejidos.....	12
3.1.9.1. Tiamina.....	13
3.1.9.2. Kinetina.....	15
3.2. SISTEMA AUTOTRÓFICO HIDROPÓNICO (SAH).....	16
3.3. EXTRACCIÓN DE LOS PRINCIPIOS EDULCORANTES DE LA STEVIA.....	17
3.4. CONTAJE CROMOSÓMICO.....	19
3.4.1. Cromosomas.....	19
3.4.2. Meristemo Radicular.....	20
3.4.3. Cariotipo.....	20
3.4.3.1. Orceína Acética.....	21
3.4.3.2. 8-Hidroxiquinoleína.....	21
IV. METODOLOGÍA.....	22
4.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....	22
4.2. NIVEL ÓPTIMO DE TIAMINA PARA STEVIA.....	22
4.2.1. Materiales y Equipos.....	22
4.2.2. Metodología.....	23

4.3. SELECCIÓN DEL SUSTRATO PARA LA PRODUCCIÓN DE STEVIA.....	28
4.3.1. Materiales y Equipos.....	28
4.3.2. Metodología.....	28
4.4. PORCENTAJE DE PRENDIMIENTO DE LAS PLANTAS OBTENIDAS EN EL LABORATORIO BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO.....	32
4.5. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO PORCENTUAL DE ESTEVIÓSIDO.....	33
4.6. DETERMINACIÓN DE LA CARGA GENÉTICA DE LAS PLANTAS DE STEVIA.....	33
4.6.1. Materiales y Equipos.....	33
4.6.2. Metodología.....	33
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
5.1. Nivel óptimo de Tiamina en los medios <i>in vitro</i>.....	35
5.1.1. Primer Ciclo de Propagación.....	35
5.1.2. Segundo Ciclo de Propagación.....	50
5.2. Sustrato más adecuado dentro del Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH).....	64
5.3. Porcentaje de prendimiento de las plantas bajo condiciones de invernadero.....	71
5.4. Extracción y cuantificación de esteviósido.....	72
5.5. Carga genética de las plantas de Stevia.....	76
5.6. Costos del Sistema de Propagación.....	78
5.6.1. Costos de los tratamientos de la fase <i>in vitro</i>.....	78
5.6.2. Costos de los tratamientos de la fase <i>ex vitro</i> 1, Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH).....	79
5.6.3. Costos de los tratamientos de la fase <i>ex vitro</i> 2, Micro invernadero y plantas para venta.....	79
VI. CONCLUSIONES.....	80
VII. RECOMENDACIONES.....	81
VIII. RESUMEN.....	83
IX. SUMMARY.....	85
X. BIBLIOGRAFÍA.....	87
XI. ANEXOS.....	99

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 4.2.2.1.: Medios de Cultivo para <i>Stevia rebaudiana</i>; Solución M&S con cuatro niveles de Tiamina y diferentes fuentes de propagación.....	24
Cuadro 4.2.2.2.: Disposición en el laboratorio de los tratamientos del nivel óptimo de tiamina en bloques al azar, IASA I, Ecuador, 2007.....	25
Cuadro 4.2.2.3.: Escala arbitraria utilizada para evaluar el color del follaje de la <i>Stevia</i>.....	25
Cuadro 4.3.2.1.: Sustratos usados para la producción <i>ex vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i>.....	28
Cuadro 4.3.2.2.: Disposición en el laboratorio de los tratamientos del mejor sustrato en bloques al azar, IASA I, Ecuador, 2007.....	30
Cuadro 5.1.1.1.: Análisis de varianza del porcentaje de prendimiento, altura de planta, número de hojas, color de la planta, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.....	35
Cuadro 5.1.1.2.: Promedio \pm error estándar del porcentaje de prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto de 2 fuentes de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	35

Cuadro 5.1.1.3.: Promedio \pm error estándar del porcentaje de prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto diferentes dosis de tiamina IASA I, Ecuador, 2007.....	36
Cuadro 5.1.1.4.: Promedio \pm error estándar del porcentaje de prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto de 2 dosis de Kinetina, IASA I, Ecuador, 2007.....	37
Cuadro 5.1.1.5.: Promedio \pm error estándar del porcentaje de prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto los tratamientos, IASA I, Ecuador, 2007.....	37
Cuadro 5.1.1.6.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de 2 fuentes de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	44
Cuadro 5.1.1.7.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de diferentes dosis de tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.....	44
Cuadro 5.1.1.8.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de 2 dosis de kinetina, IASA I, Ecuador, 2007.....	44
Cuadro 5.1.1.9.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de los tratamientos, IASA I, Ecuador, 2007.....	45

Cuadro 5.1.2.1.: Análisis de Varianza del prendimiento, altura, número de hojas, color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.....	50
Cuadro 5.1.2.2.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto de 2 fuentes de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	50
Cuadro 5.1.2.3.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto de diferentes dosis de tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.....	51
Cuadro 5.1.2.4.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto de 2 dosis de Kinetina, IASA I, Ecuador, 2007.....	51
Cuadro 5.1.2.5.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto de los diferentes tratamientos, IASA I, Ecuador, 2007.....	51
Cuadro 5.1.2.6.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de 2 fuentes de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	57

Cuadro 5.1.2.7.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de diferentes dosis de tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.....	58
Cuadro 5.1.2.8.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de 2 dosis de Kinetina, IASA I, Ecuador, 2007.....	58
Cuadro 5.1.2.9.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de los diferentes tratamientos, IASA I, Ecuador, 2007.....	59
Cuadro 5.2.1.: Análisis de Varianza para contaminación, prendimiento, altura, número de hojas y enraizamiento bajo el efecto de diferentes sustratos, IASA I, Ecuador, 2007.....	64
Cuadro 5.2.2.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura, hojas y enraizamiento bajo el efecto de 2 fuentes de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	64
Cuadro 5.2.3.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura, hojas y enraizamiento bajo el efecto de 2 sustratos para propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	64
Cuadro 5.2.4.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura, hojas y enraizamiento bajo el efecto de los tratamientos, IASA I, Ecuador, 2007.....	65

Cuadro 5.6.1.1.: Costos de la fase de producción *in vitro* de todos los tratamientos (costo por planta, por tratamientos y costo promedio), IASA I, Ecuador, 2007.....78

Cuadro 5.6.2.1.: Costos de la fase de producción *ex vitro* 1 de todos los tratamientos (costo por planta, por tratamientos y costo promedio), IASA I, Ecuador, 2007.....79

Cuadro 5.6.3.1.: Costos de la fase de producción *ex vitro* 2 (costo por planta y por bandeja), IASA I, Ecuador, 2007.....79

LISTADO DE GRAFICOS

Gráfico 3.1.5.1.: Fórmula química del Steviósido, Wiquipedia, 2007.....	8
Gráfico 3.1.5.2.: Fórmula química del Rebaudiósido, Facultad de Ciencias Agrarias, Argentina, 2002.....	8
Gráfico 3.1.9.1.1.: Fórmula química de la Tiamina y la Tiaminpirofosfato, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica, Chile, 2001.....	14
Gráfico 3.1.9.2.1.: Fórmula química de la Kinetina, Takahashi, EEUU, 1986.....	15
Gráfico 3.3.1.: Diagrama de Flujo de las etapas generales de la extracción de Steviósido de hojas de Stevia, Instituto de Biotecnología - La Molina, Perú, 2005.....	17
Gráfico 3.4.1.1.: Representación de la clasificación de los cromosomas según su forma, Summa Gallicana, Italia, 2007.....	19
Gráfico 3.4.3.2.1.: Fórmula química de la 8-hidroxiquinoleína, MERCK, 2007.....	21
Gráfico 4.2.2.1.: Esquema de propagación <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, IASA I, Ecuador, 2007.....	27

Gráfico 4.3.2.1.: Esquema de propagación <i>ex vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, IASA I, Ecuador, 2007.....	31
Gráfico 5.1.1.1.1.: Número de plantas prendidas de stevia según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	38
Gráfico 5.1.1.1.2.: Relación entre el número de plantas prendidas y la dosis de tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.....	39
Gráfico 5.1.1.2.: Promedio de la altura de planta de stevia según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	41
Gráfico 5.1.1.3.: Promedio del número de hojas de stevia según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	43
Gráfico 5.1.1.4.: Coloración del follaje de stevia (escala 1-4) según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	45
Gráfico 5.1.1.5.: Número de plantas fenolizadas de stevia según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	47
Gráfico 5.1.1.6.: Número de plantas enraizadas de stevia según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	49

Gráfico 5.1.2.1.: Contaminación de los medios de cultivo según el tratamiento en el segundo ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	52
Gráfico 5.1.2.2.: Número de plantas prendidas de stevia según el tratamiento en el segundo ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	53
Gráfico 5.1.2.3.: Promedio de la altura de planta de stevia según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	55
Gráfico 5.1.2.4.: Promedio del número de hojas de stevia según el tratamiento en el segundo ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	57
Gráfico 5.1.2.5.: Coloración del follaje de stevia (escala 1-4) según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	59
Gráfico 5.1.2.6.: Número de plantas fenolizadas según el tratamiento en el segundo ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	61
Gráfico 5.1.2.7.: Número de plantas enraizadas de stevia según el tratamiento en el segundo ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.....	63
Gráfico 5.2.1.: Contaminación de los sustratos según el tratamiento, IASA I, Ecuador, 2007.....	65

Gráfico 5.2.2.: Prendimiento de plantas de stevia en el SAH, IASA I, Ecuador, 2007.....	67
Gráfico 5.2.3.: Altura de plantas de stevia según el tratamiento en el SAH, IASA I, Ecuador, 2007.....	68
Gráfico 5.2.4.: Promedio del número de hojas según el tratamiento en el SAH, IASA I, Ecuador, 2007.....	69
Gráfico 5.2.5.: Número de plantas enraizadas según el tratamiento en el SAH, IASA I, Ecuador, 2007.....	70
Gráfico 5.4.1.: Cromatogramas de hojas de Stevia del IASA I hechos con detector UV (línea roja) y detector ELSD (línea verde), Laboratorios ANAGALIDE, España, 2007.....	72
Gráfico 5.5.1.: Cariotipo de Stevia rebaudiana Bertoni, IASA I, Ecuador, 2007.....	76

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Representación gráfica del ápice de una raíz y su zona meristemática, Naturenotes Cuaderno de Biología, 2006.....	99
Anexo 2. Tabla de evaluación de los niveles óptimos de Tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.....	99
Anexo 3. Dosis para la solución Hidropónica Ajustada para Stevia, IASA I, Ecuador, 2007.....	100
Anexo 4. Análisis Foliar de <i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni, INIAP, Ecuador, 2007.....	100
Anexo 5. Fotografías de Plantas de Stevia <i>in vitro</i>. A. Planta <i>in vitro</i> de Stevia en tubo de ensayo. B. Cajas Magenta de cultivo <i>in vitro</i> de Stevia. IASA I, Ecuador, 2007.....	100
Anexo 6. Cajas del SAH con plantas de Stevia en el Cuarto de Crecimiento, IASA I, Ecuador, 2007.....	101
Anexo 7. Tabla de evaluación del mejor sustrato de enraizamiento en el Sistema autotrófico Hidropónico, IASA I, Ecuador, 2007.....	101
Anexo 8. Plantas de Stevia en microinvernadero, IASA I, Ecuador, 2007.....	102

Anexo 9. Evaluación de plantas de Stevia en invernadero, IASA I, Ecuador, 2007.....	102
Anexo 10. Fotografía de raíces en pretratamiento con 8-hidroxiquinoleína para conteo cromosómico, IASA I, Ecuador, 2007.....	103
Anexo 11. Fotografía de las placas de raíces de Stevia en tinción con orceína acética, IASA I, Ecuador, 2007.....	103
Anexo 12. Fotografía de cromosomas mitóticos de Stevia ($2n = 22$) bajo el microscopio con un aumento de 100X, IASA I, Ecuador, 2007.....	104
Anexo 13. Fotografías del tejido floral de Stevia. A. Planta de Stevia en floración. B. Flor de Stevia bajo el Microscopio (aumento 10X). C. Polen de Stevia bajo el microscopio (aumento 40X). D. Cromosomas meióticos de Stevia ($n = 11$) bajo el microscopio con un aumento de 100X. IASA I, Ecuador, 2007.....	104

NOMENCLATURA UTILIZADA

ADN	Ácido Desoxi ribonucleico
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
C.C.N.	Central Cooperativa Nacional - Paraguay
CIP	Centro Internacional de la Papa
CO ₂	Anhídrido Carbónico
EEUU	Estados Unidos de Norteamérica
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
FDA	Food and Drug Agency
g	Gramo
GSC	Global Stevia Corporation
Ha	Hectárea
HCl	Ácido Clorhídrico
Kg	Kilogramo
mg	Miligramo
nm	Nanómetro
M&S	Soluciones de Murashigue & Skoog
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por millón
PSI	Libras por pulgada cuadrada
SAH	Sistema Autotrófico Hidropónico
TPP	Tiamina Pirofosfaro o Carboxilasa
UV	Ultra Violeta (Luz)
°C	Grados Centígrados

I. INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta originaria del Paraguay que fue usada ancestralmente por sus aborígenes como edulcorante y medicina (Shock, 1982). La sustancia dulce que caracteriza a esta planta se denomina esteviósido y se encuentra en todo el vegetal, a excepción de la raíz (De Vargas, 1980). La hoja es el órgano con mayor contenido del edulcorante (C.C.N., 1980; Grashoff, 1972). Actualmente Japón, China, Brasil y Paraguay son los principales productores (Jordán, 1984).

La propagación sexual de la *Stevia* no es recomendable por la heterogeneidad que presenta la floración y las plantas resultantes de este método. Las semillas obtenidas de la polinización tienen un bajo porcentaje de germinación, entre el 10 y 38 % (Felippe *et. al.*, 1971; De Vargas, 1980; Sagakuchi *et. al.*, 1982; Jordán, 1984 *in* Taiariol D.). La *Stevia* se puede propagar vegetativamente con hijuelos (Jordán, 1984), pero es recomendable sólo en plantaciones pequeñas porque ocurre escasamente.

También se puede propagar a través de estacas apicales o subapicales usando sustratos diversos en épocas diferentes del año, con posible uso de enraizadores (Felippe, 1977; De Vargas, 1980; Sumida, 1980; Shock, 1982; Jordán, 1983 y 1984). Marcavillaca *et. al.* (1993) proponen la combinación de la macro y micropropagación; con este sistema de multiplicación, de una planta madre en sólo 3 ciclos de multiplicación (1 de micro y 2 de macropropagación), se lograría a partir de una sola planta, material para cultivar 3 ha (225.000 plantas).

Algunos experimentos demostraron que las plantas de *Stevia* propagadas asexualmente *in vitro* con Kinetina (10 mg l^{-1}) en el medio mostraron ser muy uniformes en su calidad

de crecimiento y composición química. La propagación clonal de Stevia puede ser aplicada no solo para la preservación genética de un stock selecto superior, sino también para la propagación en masa de plantas clonadas con uniformes características. Aparentemente las plantas de Stevia propagadas a partir de tallos *in vitro* crecieron normalmente en el campo (Tamura *et. al.* 1984).

Tamura *et. al.* (1984) demostraron con diferentes métodos de propagación, que no hay diferencias significativas entre la supervivencia de plantas sembradas por semilla o propagadas *in vitro*. Las colecciones *in vitro* son renovadas continuamente y duran un tiempo indefinido, en tanto que las semillas de Stevia preservadas en condiciones ideales no duran más allá de 8 meses (Felippe *et. al.*, 1971; De Vargas, 1980; Sagakuchi *et. al.*, 1982; Jordán, 1984 *in Taiariol*).

Adicionalmente una forma de propagación usada es el Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH) que emplea contenedores desechables, turba y soluciones hidropónicas (sin usar sucrosa ni reguladores de crecimiento), obteniéndose plántulas que rinden un 25 % más que el método *in vitro* en rendimiento total, por planta. Estos estudios se han realizado principalmente en papa (Benítez *et. al.*, 2002).

Desde mediados del año 2006, en los laboratorios de la Carrera de Ciencias Agropecuarias - IASA, se han realizado varias pruebas para el cultivo *in vitro* y propagación de Stevia, obteniendo resultados prometedores. Al momento ya se tienen plantas de Stevia listas para su uso (Com. Pers. Landázuri, P.).

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Evaluar un Sistema de propagación *in vitro* y en invernadero para la producción de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni bajo condiciones controladas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir el nivel óptimo de Tiamina en los medios *in vitro* bajo el efecto de dos fuentes de propagación (Apicales o Uninodales), para la obtención de plantas madre y/o plantas productivas.
- Establecer el sustrato más adecuado, entre Fibra de coco y Sustrato Compuesto, dentro de un Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH), para la producción de plantas *ex vitro*.
- Determinar el porcentaje de prendimiento de las plantas obtenidas en el laboratorio bajo condiciones de invernadero (plantas en sombra).
- Cuantificar el contenido porcentual de esteviósido en las plantas obtenidas del invernadero.
- Determinar la carga genética de las plantas de Stevia estudiando su conformación cromosómica.
- Establecer los costos del Sistema de Propagación de plantas de Stevia considerando la optimización de recursos económicos.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. *STEVIA REBAUDIANA* Bertoni

3.1.1. Origen y Distribución

La Stevia es originaria de la región Oriental de Paraguay y fue usada ancestralmente por los aborígenes como edulcorante de sus comidas e incluso con fines medicinales (Shock, 1982). Actualmente Japón, China, Brasil y Paraguay son los principales productores. Del Japón se ha extendido a todo el sudeste asiático (Jordán, 1984).

El género Stevia tiene más de 100 especies en el continente americano, de donde es originaria; pero *Stevia rebaudiana* Bertoni es la única especie con principios edulcorantes en las hojas (Grashoff, 1972).

Esta planta cuenta con más de 144 variedades a nivel mundial, destacando a Morita 2; además esta especie presenta numerosos ecotipos. Mitsuhashi (1975), seleccionó 28 ecotipos diferentes y para distarlos se basó principalmente en sus características morfológicas. Al determinar el contenido de esteviósidos estos variaron entre 2,07 y 18,34 %.

Sumida (1980) describe una serie de experimentos para relacionar varias características de la planta con la heredabilidad en 22 variedades de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Se observaron 11 características morfológicas y seis características de contenido; de éstas 17 características, solamente el peso seco de hojas mostró una baja correlación con la

heredabilidad. Sumida (1980), concluyó, que características morfológicas y de contenido, principalmente de principios activos, tienen efecto seleccionador evidente.

3.1.2. Descripción botánica:

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta arbustiva, de la familia Asteraceae. La raíz es fibrosa, filiforme, perenne y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie (De Vargas, 1980). El tallo es anual, subleñoso, pubescente; durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo llegando a producir hasta 20 tallos en tres a cuatro años. En condiciones óptimas, el tallo puede llegar hasta un metro y medio de altura (Sagakuchi, 1982).

Las hojas son elípticas oval o lanceoladas, pequeñas, simples; borde dentado; a veces en verticilos; algo pubescentes (C.C.N., 1980). Se clasifica como una planta de día corto, situando el fotoperíodo crítico en 12 - 13 horas según el ecotipo. La flor es hermafrodita pequeña y blanquecina, en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas (Shock, 1982).

La planta es autoincompatible (protandria) por lo que la polinización es entomófila; se dice que es de tipo esporofítico y clasificada como apomíctica obligatoria (Monteiro, 1982). El fruto es un aquenio que puede ser claro (estéril) u oscuro (fértil) y es diseminado por el viento (Gattoni, 1945).

3.1.3. Condiciones Climáticas de desarrollo de la planta:

La Stevia crece en la región subtropical, semihúmeda, con 1.400 a 1.800 mm. de lluvia, que se distribuyen regularmente durante todo el año y temperaturas extremas de -6° a 43°C, con promedio de 24°C. Según Sakaguchi (1982), la temperatura más apropiada para Stevia es de 15 a 30°C con un límite inferior de -3°C. Soporta medias mínimas de 5°C.

La planta no resiste períodos prolongados de sequía, por la morfología de su sistema radicular. Desarrolla mejor donde la estación de crecimiento es larga y la intensidad de luz es alta, con temperaturas tibias, riesgos mínimos de heladas luego de la brotación y sin períodos de larga sequía. Los fotoperíodos largos aumentan la longitud de los entrenudos, área foliar, peso seco y aceleran la aparición de hojas. La materia seca se reduce a la mitad con fotoperíodos de días cortos. Azúcares, proteínas y esteviósidos aumentan tanto en valores absolutos como relativos en días largos (Sagakuchi, 1982). Para la producción de plántulas (propagación) es necesario temperaturas por sobre los 15°C.

La planta crece y se puede adaptar a gran variedad de terrenos y climas. La información y ayuda para los agricultores se está generando de forma oficial en varios países sudamericanos, Japón y Canadá (Jordán, 1984).

Se la cultiva en suelos muy variados. En su estado natural, la planta crece en suelos tanto de baja fertilidad, ácidos, de tipo arenoso como en orgánicos y con alta humedad (Shock, 1982). Algunos autores recomiendan tierras areno-arcillo-humífera-ferruginosa

o simplemente arena húmida. La tierra ideal es la areno-arcillosa con regular proporción de humus. Se adapta bien a suelos arcillosos con buen drenaje, no así a lugares con exceso de humedad (C.C.N., 1980). La planta crece naturalmente en suelos de pH 4-5, pero puede crecer bien en pH 6.5-7.5 en terrenos que no sean salinos (Shock, 1982).

3.1.4. Características agronómicas:

Cultivo semiperenne que puede durar entre cinco y seis años, con dos o tres cortes anuales. En Japón, en 1 o 2 cosechas por año, el rendimiento de hoja seca varía entre 3000 y 3500 kg ha⁻¹ en el primer año, 4000 a 4500 kg ha⁻¹ en el segundo, 4000 a 6000 kg ha⁻¹ en el tercero, disminuyendo a 4000 kg ha⁻¹ en el cuarto (Sumida, 1980). Se estima que la densidad óptima de 88000 pl ha⁻¹, se da a distancias de 75 cm entre hileras y 15 cm entre plantas (Jordán, 1984).

3.1.5. Edulcorantes presentes en *Stevia rebaudiana*

Las sustancias edulcorantes que se encuentran en la stevia son: el esteviósido (Gráfico 3.1.5.1.) y rebaudiósido (Gráfico 3.1.5.2.) que están dentro del grupo de edulcorantes no nutritivos, ya que con su ingesta, se provee al organismo de poca energía o respuesta glucémica (Chan, 2007).

Los edulcorantes no nutritivos pueden contribuir al control del peso o de la glucosa en la sangre así como la prevención de caries dentales. La industria de la alimentación valora estos edulcorantes por sus cualidades sensoriales, entre las que se encuentra:

sabor dulce, ausencia de sabor amargo u olor, seguridad, compatibilidad con otros ingredientes alimentarios y estabilidad en diferentes entornos alimentarios (Chan, 2007).

En la Stevia el esteviósido se encuentra distribuido en todo el vegetal, a excepción de su raíz (De Vargas, 1980). Las hojas son el órgano con mayor contenido del edulcorante (C.C.N., 1980).

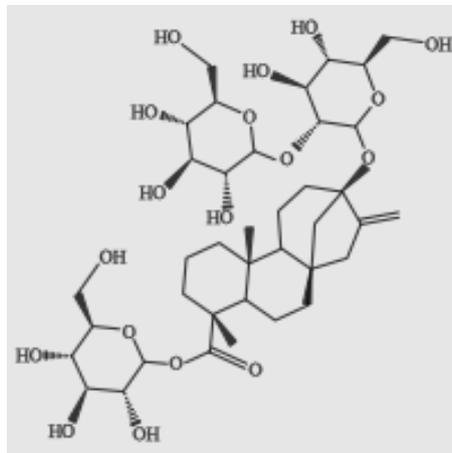


Gráfico 3.1.5.1.: Fórmula química del esteviósido, Wiquipedia, 2007.

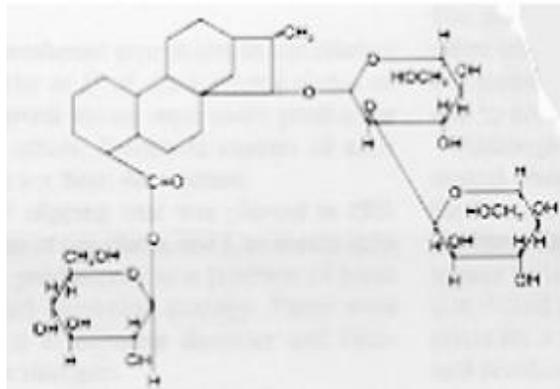


Gráfico 3.1.5.2.: Fórmula química del Rebaudiósido, Facultad de Ciencias Agrarias, Argentina, 2002.

Japón tiene más de 40 años de usar esta planta con fines comerciales y hoy en día supone el 41 % de los endulzantes consumidos. Se le ha dado diversos usos como:

alimento para ganado, elaboración de té, abono orgánico, edulcorante de mesa, bebidas, pastelería, dulces, confituras, mermeladas, yogures, chicles, pasta dental, helados. Esta planta puede ser cultivada comercialmente y con el tiempo podría ser la fuente edulcorante más importante en el mundo (Herbotecnia, 1997; Diario La Prensa, 2005).

3.1.6. El consumo de Edulcorantes:

Los efectos que puede tener un consumo regular de edulcorantes en la salud humana lleva a investigar alternativas naturales. El consumo de edulcorantes, aditivos alimentarios empleados para endulzar alimentos, ha experimentado un notable auge en los últimos años. Esto ha contribuido el desarrollo de productos bajos en calorías (light), con un aporte calórico muy inferior pero igual nivel de dulzura (Chan, 2000).

Uno de los grupos de productos que más se han desarrollado en los últimos años son los llamados edulcorantes artificiales, aditivos alimentarios que persiguen imitar la capacidad de endulzar del azúcar sin aportar las calorías de éste (Rodríguez, 2007).

Para su uso en la industria alimentaria, los edulcorantes deben cumplir con determinados requisitos. Entre otros, deben ser absolutamente inocuos, su sabor dulce debe percibirse rápidamente y desaparecer de la misma manera, su sabor tiene que ser muy parecido al del azúcar común, y resistir las condiciones del alimento en el que se va a utilizar, así como los tratamientos a los que se vaya a someter (Chan, 2000).

3.1.7. Importancia de la Stevia sobre la Salud Humana

En EEUU, la FDA aprobó en septiembre de 1995 a la stevia como endulzante, aunque con restricciones: sólo podría venderse en tiendas naturistas. En el año 2002 el mercado de la stevia en EEUU experimentó un incremento de más del 400 % y continúa actualmente con esta tendencia (Rodríguez, 2007). Su importancia económica radica en que el edulcorante llamado esteviósido no se fermenta, no posee sabor metálico, ni es cancerígeno y es muchas veces más dulce que la caña de azúcar o la remolacha (que actualmente son las más cultivadas) (Baquero, 2005).

Algunas de sus propiedades son las siguientes: las hojas son alrededor de 20-30 veces más dulces que el azúcar, el concentrado lo es 300 veces más y el *rebaudósido A* 450 veces, previene caries y enfermedades de encías; muy soluble en agua fría o caliente, resistente a las altas temperaturas; no tiene calorías; no eleva la glucosa en la sangre, no cristaliza ni forma caramelo (Herbotecnia, 1997).

El esteviósido es recomendado para diabéticos y ha sido aceptado por la Liga Argentina de Protección al Diabético (Herbotecnia, 1997). Yépez, *et. al.* (1996), afirma que la diabetes mellitus en el Ecuador, es considerada una de las cuatro enfermedades crónicas no transmisibles más importantes relacionadas con la dieta: 9,4 por cada 100.000 habitantes. La diabetes es una enfermedad que tiene efectos perjudiciales sobre el páncreas, por lo que estudios recientes demuestran el efecto benéfico de consumir esta planta para controlar de manera importante los niveles de azúcar en la sangre, sin que esto quiera decir que se reemplace las prácticas normales de un diabético (Global Stevia Corporation, 2006).

En el 6° Congreso de Farmacología, celebrado en Buenos Aires (1976), se presentaron dos trabajos por el “Centro de Investigación de la Stevia” de la ciudad de San Paulo, que demostraron la acción de Ka’a He’ê contra la obesidad y el valor benéfico para el funcionamiento regular del corazón. En el 7° Congreso Internacional de diabetes se dio a conocer su posible acción hipoglucemiante.

La stevia tiene efectos beneficiosos en la absorción de la grasa y la presión arterial. Contiene carbohidratos, proteínas, fibra, hierro, fósforo, calcio, potasio, zinc y vitaminas A y C. No se reportan efectos secundarios de ninguna clase, como efectos mutagénicos u otros efectos que dañen la salud (Global Stevia Corporation, 2005; Rodríguez, 2007).

3.1.8. Propagación de Stevia

La Stevia se reproduce sexualmente por aquenios, observándose alta heterogeneidad en las poblaciones resultantes. La planta es de polinización cruzada y gran parte de sus aquenios son estériles, livianos y de fácil dispersión por el viento. La floración no es uniforme, lo mismo que la maduración de la semilla, siendo la recolección lenta y difícil. Las semillas deben guardarse en condiciones de baja humedad, baja temperatura, preferentemente en la oscuridad y en envases herméticos (Felippe *et. al.*, 1971; De Vargas, 1980; Sagakuchi *et. al.*, 1982; Jordán, 1984).

Esta especie puede propagarse vegetativamente por separación de hijuelos. Este método sólo puede utilizarse para pequeñas plantaciones, ya que el número de hijuelos

producidos es reducido. En la base del tallo, o bajo tierra, en la primavera temprana aparecen pequeños vástagos, muchos con sus respectivas raíces que pueden separarse y plantarse en el lugar definitivo (Jordán, 1984).

Otra forma de propagación vegetativa es a través de estacas; método que convenientemente ajustado podría ser usado a escala comercial. El cultivo de tejidos es otro método de propagación vegetativa que permite obtener plantaciones más uniformes, además de la rápida multiplicación clonal (Yang, 1979 y 1981; Marcavillaca, 1985).

3.1.9. Propagación *in vitro* y Cultivo de Tejidos

La propagación *in vitro* o micropropagación se define como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en las plantas de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas “limpias”, contrario a la propagación vegetativa no aséptica o convencional (Ayerbe, 1990).

Las ventajas de la micropropagación en comparación con sistemas convencionales son: el incremento acelerado del número de plantas, reducción del tiempo de multiplicación, necesita superficie reducida para muchas plantas, mayor control de la sanidad, fácil transporte para intercambio internacional de materiales y la posibilidad de multiplicar rápidamente especies en peligro de extinción (Ayerbe, 1990).

La propagación *in vitro* consta de cinco etapas: la etapa 0 o inicial para seleccionar una planta madre; la etapa I de iniciación o establecimiento para el cultivo inicial o

primario; la etapa II de multiplicación de brotes; la etapa III de enraizamiento o pretransplante para producir una planta autotrófica que sobreviva en las condiciones de transplante del suelo y la etapa IV de transferencia final al medio ambiente (Ayerbe, 1990).

Existen varias vías generales para realizar la multiplicación clonal como son: la multiplicación de brotes de yemas terminales o laterales; la organogénesis directa e indirecta; embriogénesis somática; el microinjerto; cultivo de embriones y esporas (Ayerbe, 1990).

Los factores que determinan el éxito del sistema de micropropagación depende de la planta que dona el explante (mientras más joven y menos diferenciado el tejido, mejor será la respuesta *in vitro*), el explante (partes embrionarias, brotes jóvenes y ápices meristemáticos), los factores físicos (luz y temperatura) y el medio de cultivo por su composición química y forma física (Ayerbe, 1990).

3.1.9.1. Tiamina

Las vitaminas tienen funciones catalíticas en reacciones enzimáticas; la tiamina o B1 es importante para las células de las plantas (Smith, 2000). Se encuentra generalmente en dos formas, una forma “libre” la cual es tiamina y en la forma “enlazada” llamada pirofosfato de tiamina (Devlin, 1975; Gráfico 3.1.9.1.1.).

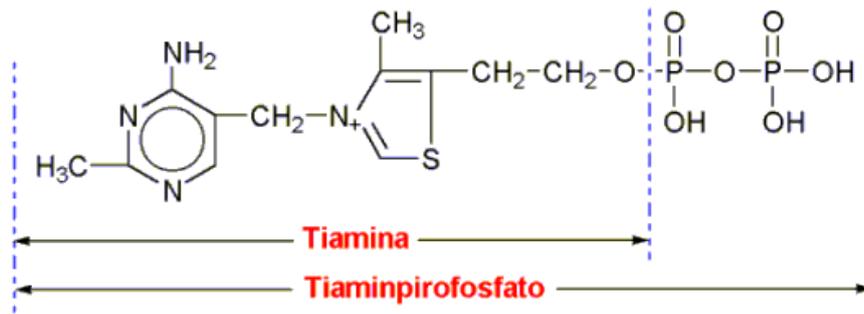


Gráfico 3.1.9.1.1.: Fórmula química de la Tiamina y la Tiaminpirofosfato, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica, Chile, 2001

A menudo se afirma que ciertas plantas crecen más rápido, o que quizás tienen mayor productividad, cuando se les proporcionan vitaminas exógenas, especialmente la vitamina B, ya sea rociándolas, humedeciendo la vegetación o bien ocasionalmente del suelo (Salisbury, *et. al.* 2000).

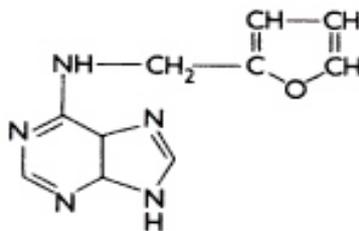
Las funciones de la tiamina dentro del metabolismo vegetal son diversas pero hay que resaltar su participación en el Ciclo de Krebs. La forma activa de la vitamina, sin embargo, es pirofosfato de tiamina. la cual es sintetizada en la transferencia del pirofosfato desde el ATP a la tiamina, dentro de la secuencia de reacciones que llevan a la formación de la acetil-CoA, el piruvato reacciona con la tiamina pirofosfato (TPP o carboxilasa) para formar un complejo acetaldehído-TPP y CO₂ (Bidwell, 1993; Devlin, 1975).

Aparentemente la tiamina estimula al sistema radicular de la mayoría de vegetales, que a su vez no sintetizan una cantidad suficiente en la raíz para suplir sus propias necesidades. Hay que destacar que es importante saber el nivel óptimo de Tiamina en los medios usados para propagación *in vitro*, ya que por su función fisiológica en los vegetales es una opción viable para suprimir hormonas de crecimiento y enraizamiento (Devlin, 1975).

3.1.9.2. Kinetina

La Kinetina o 6-furfurilaminopurina es un compuesto que fue obtenido por Miller en 1955 y se ubica dentro del grupo de las citoquininas (Gráfico 3.1.9.2.1.). Es el descubrimiento más importante en la búsqueda de compuestos que podrían inducir a las células a multiplicarse.

La Kinetina no se puede considerar un producto natural de la biosíntesis de la planta ya que se obtiene a partir de la deoxiadenosina que es un producto de la degradación del ADN. Ésta hormona tiene varios efectos en diversos sistemas de crecimiento vegetal, ya que parece afectar la translocación de compuestos solubles nitrogenados. Entre sus efectos fisiológicos están la habilidad de promover la división y elongación celular, además de romper la dormancia (Devlin, 1975; Ayerbe, 1990).



Kinetina

Gráfico 3.1.9.2.1.: Fórmula química de la Kinetina, Takahashi, EEUU, 1986.

3.2. SISTEMA AUTOTRÓFICO HIDROPÓNICO (SAH)

Este sistema está basado en la capacidad fotoautotrófica de las plántulas, el manejo de los factores ambientales, la micropropagación y en conceptos de hidroponía. Las plántulas son de mejor calidad debido a que son de mayor tamaño, presentan mejor funcionamiento fisiológico y su crecimiento es uniforme. Este sistema permite obtener mayor cantidad de plantas en menor tiempo y de esta manera se ahorra en electricidad, mano de obra, insumos, disminuye el estrés al trasplante. Adicionalmente las plantas presentan una excelente adaptación (Rigato, 2003).

El SAH por lo general utiliza contenedores desechables, sustrato y soluciones hidropónicas; además una de las características más importantes es que no se agrega sucrosa ni reguladores de crecimiento obteniéndose plantas con autotrofia verdadera, que tienen una gran capacidad de adaptación a condiciones de invernadero. El uso de sucrosa, eventualmente, conlleva a desarrollar contaminación, provocando grandes pérdidas económicas (Benítez, *et. al.*, 2002).

En contraste las plantas *in vitro* se pueden desarrollar autotróficamente, si se provee de factores físicos adecuados como CO₂, luz y recipientes amplios sin adicionar sucrosa al medio. En el desarrollo de un sistema de multiplicación para la producción con estas condiciones, se logra un bajo costo en la producción agrícola (Kozal, 1991). De esta manera se logra obtener plantas autotróficas con altas tasas de multiplicación, que tienen una gran capacidad de adaptación por sus tallos vigorosos y hojas grandes, reduciendo la mortalidad y disminuyendo la contaminación (Benítez, *et. al.*, 2002).

3.3. EXTRACCIÓN DE LOS PRINCIPIOS EDULCORANTES DE LA STEVIA

El proceso de extracción se lo hace posterior a la cosecha de las hojas antes de alcanzar la floración, de esta manera se obtiene el máximo rendimiento en esteviósidos. Las hojas se secan a la sombra, hasta que alcancen un 10 % de humedad (Campos, 2005).

Los principales componentes de las hojas son monoterpenos, diterpenos labdamicos, triterpenos, sesquiterpenos, esteroides, flavonoides, taninos, aceites volatiles, glicosidos diterpenicos: esteviósido, esteviolvioso, rebaudiosido: A, B, C, D y E, y dulcosido A. (Tanaka, 1982; Campos, 2005)

El esteviósido es un glucósido diterpeno de peso molecular 804,80 y fórmula $C_{38}H_{60}O_{18}$ (Mosettig, 1963). Las etapas generales para la extracción del esteviósido son la extracción, clarificación, purificación, concentración y secado (Campos, 2005; Gráfico 3.3.1.).

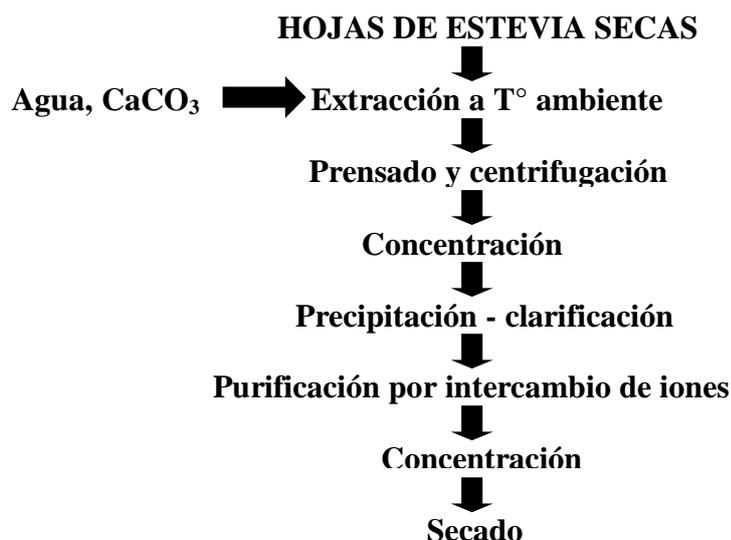


Gráfico 3.3.1.: Diagrama de Flujo de las etapas generales de la extracción de esteviósido de hojas de Stevia, Instituto de Biotecnología - La Molina, Perú, 2005.

El procedimiento que permite llegar a un producto cristalino con buen rendimiento se basa en una extracción acuosa del material vegetal a temperatura controlada seguida de varios pasos de purificación, siendo la etapa clave del proceso el filtrado del líquido de extracción a través de una resina que retiene selectivamente los principios edulcorantes y deja pasar los otros componentes extraídos simultáneamente con éstos con un rendimiento de alrededor del 5 % sobre la base de las hojas secas (Soto, 2002).

En el proceso sólo se usa agua y alcohol etílico como solventes, lo cual es importante teniendo en cuenta el uso alimentario del producto obtenido. La relativa simplicidad de las operaciones permite su implementación a escala industrial en las zonas de producción de la planta (Soto, 2002; Campos, 2005).

3.4. CONTAJE CROMOSÓMICO

3.4.1. Cromosomas

Los cromosomas o “cuerpos coloreados” son estructuras filamentosas constituidas por cromatina, que durante la división celular se presentan como cuerpos compactos coloreados que se forman de una fibra de ADN espiralizada asociada a proteínas. Cada especie animal o vegetal tiene un número, tamaño y forma determinada de sus cromosomas (Rueda, 2004). Con la llegada del microscopio electrónico y los avances en biología molecular sabemos que la cromatina y los cromosomas son lo mismo (ADN y proteínas), pero en diferentes etapas de condensación (Audesirk, 1997).

Según su forma (Gráfico 3.4.1.1.) se clasifican por la ubicación del centrómero y el tamaño relativo de sus brazos en metacéntrico (centrómero en la mitad: brazos iguales), submetacéntrico (brazos de distinto tamaño), acrocéntrico (un brazo es muy corto) y telocéntrico (centrómero en el extremo: posee sólo brazos largos). Estos pueden ser visibles únicamente en metafase (Audesirk, 1997; Rueda, 2004)

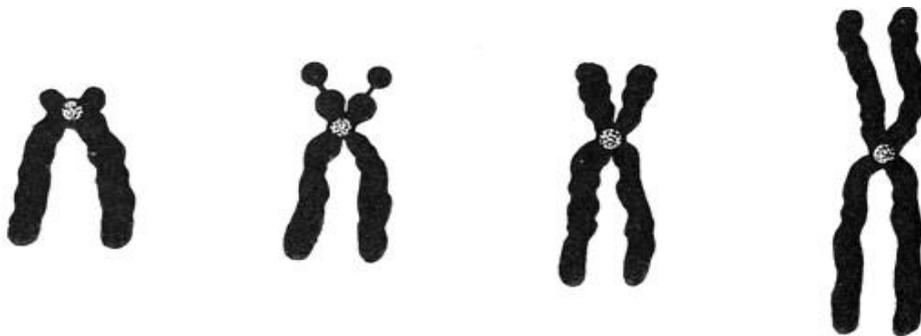


Gráfico 3.4.1.1.: Representación de la clasificación de los cromosomas según su forma, Summa Gallicana, Italia, 2007.

3.4.2. Meristema Radicular

El meristema radicular (Anexo 1) es el tejido vegetal formado por células embrionarias que se encuentra en la zona apical de la raíz. Es una zona que está en continuo desgaste y en continua regeneración por medio de tejidos formadores especializados, por lo que es una zona de activa división celular (mitosis), óptimo para el estudio cromosómico (Gispert, 1979, 1999).

3.4.3. Cariotipo

El cariotipo es la organización de los cromosomas de una especie determinada en grupos específicos. Éste análisis permite evidenciar daños de tipo numérico o estructural del material genético. Los cromosomas metafásicos (células en mitosis) de la especie en estudio se ordenan en pares homólogos según su forma y tamaño (de mayor a menor), y de ser el caso el par sexual se ubica al final (Rueda, 2004; Gispert, 1979).

Brucher (1974) revela que la planta es diploide, conteniendo 22 cromosomas. Los cromosomas en *Stevia* se presentan como seis pares metacéntricos, cuatro pares submetacéntricos y un par acrocéntrico (Oliveira, 2004). Estudios de poliploidía fueron realizados por Brucher (1974), Utsunomiya (1977), Sato y Kawakami (1975). Estos últimos investigadores obtuvieron variedades de alta calidad. La poliploidía puede resultar un buen método para obtener aumentos de productividad en términos de masa foliar y contenido de principio activo, reduciendo el área plantada y por ello los costos (Handro, 1984).

3.4.3.1. Orceína Acética

La orceína acética es un tinte ampliamente usado en estudios celulares. En vegetales, la tinción con orceína acética ha permitido obtener numerosa información. Así mismo cabe indicar que la mayor cantidad de datos proviene del análisis de metafases somáticas (Darlington, 1969).

3.4.3.2. 8-Hidroxiquinoleína

La 8 hidroxiquinoleína o 8-quinolinol es un compuesto químico que se usa como inhibidor del huso acromático para el estudio de metafases de células vegetales principalmente. Su fórmula química es C_9H_7NO (Figura 3.4.3.2.1.). Tiene una masa molar de $149.16 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ (MERCK, 2007).

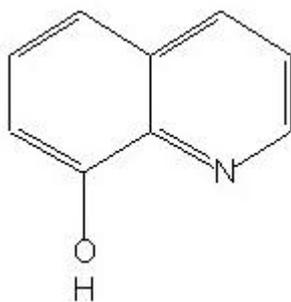


Gráfico 3.4.3.2.1.: Fórmula química de la 8-hidroxiquinoleína, MERCK, 2007.

Este producto es nocivo por inhalación y por ingestión, debe evitarse el contacto con ojos y piel. Al manejar éste químico hay que considerar que es contaminante del agua (MERCK, 2007).

IV. METODOLOGÍA

4.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA.

El proyecto se realizó en los predios de la Carrera de Ciencias Agropecuarias IASA, ubicada en la Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, sector de San Fernando, Hcda. El Prado a una altitud de 2748 m.s.n.m. La investigación constó de dos fases: la primera fue la fase de laboratorio y tuvo lugar en los laboratorios de Micropropagación del Centro Investigaciones; y la segunda fase se realizó en un invernadero de la Facultad.

El laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias tiene condiciones controladas de temperatura (20 – 25° C) y de humedad relativa (43 y 50 %).

4.2. NIVEL ÓPTIMO DE TIAMINA PARA STEVIA

4.2.1. Materiales y Equipos:

- Equipos de Laboratorio: Autoclave, Cámara de flujo Laminar, Estufa, pHímetro, Microondas, Destiladora de Agua, Balanza electrónica, Refrigerador, Cuarto de Crecimiento.
- Material de Vidrio: Vaso de Precipitación, Varilla de vidrio, Tubos de Ensayo, Probeta, Mechero de Alcohol.

- Reactivos e insumos: Soluciones De Murashigue & Skoog con tres niveles de Tiamina, Sucrosa, Agar, Agua Destilada, Alcohol Antiséptico, Soluciones de K(OH) y HCl.
- Otros Materiales: Cajas Magenta, Pinzas Pequeñas, Pinzas Grandes, Tijeras, Parafilm, Papel periódico, Ropa de Laboratorio, Plantas de Stevia cultivadas *in vitro*, Protector de Instrumentos (de Cartón), Marcador Punta Fina.

4.2.2. Metodología:

Los explantes para este estudio se obtuvieron del laboratorio de cultivos *in vitro* de la Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA I). Para el estudio del nivel óptimo de tiamina (Cuadro 4.2.2.1.), los explantes fueron sembrados en M&S, suplementado con 20 g de sucrosa, 2,5 g de agar y con un pH ajustado de 5.6.

Cuadro 4.2.2.1.: Medios de Cultivo para *Stevia rebaudiana*; Solución M&S con cuatro niveles de Tiamina y diferentes fuentes de propagación.

Medio de Cultivo	Tratamiento	Descripción
A M&S + 0.0T	T ₁	SIN Tiamina. Apical.
U M&S + 0.0T	T ₂	SIN Tiamina. Uninodal.
A M&S + 0.2T	T ₃	0.2 ppm. Apical.
U M&S + 0.2T	T ₄	0.2 ppm. Uninodal.
A M&S + 0.4T	T ₅	0.4 ppm. Apical.
U M&S + 0.4T	T ₆	0.4 ppm. Uninodal.
A M&S + 0.8T	T ₇	0.8 ppm. Apical.
U M&S + 0.8T	T ₈	0.8 ppm. Uninodal.
A TH	T ₉	Testigo Hormonal. Fuente Apical.
U TH	T ₁₀	Testigo Hormonal. Fuente Uninodal.

El ensayo se realizó en las cajas magenta, las cuales fueron rotuladas. Posteriormente se dispensó 40 cc. de medio por caja y se autoclavó (121 °C a 15 PSI por 15 minutos).

La propagación *in vitro* se realizó separando las fuentes Uninodales y Apicales. El proceso de sembrado se repitió hasta obtenerse el número de cajas deseado con nueve plantas por caja. Las cajas listas se llevaron al cuarto de crecimiento durante un mes aproximadamente, colocándolas en bloques al azar (Cuadro 4.2.2.2.).

Cuadro 4.2.2.2.: Disposición en el laboratorio de los tratamientos del nivel óptimo de tiamina en bloques al azar, IASA I, Ecuador, 2007.

Bloques	Tratamientos									
B 2	T7	T8	T5	T9	T6	T2	T1	T3	T10	T4
B 4	T8	T1	T2	T7	T4	T3	T6	T5	T10	T9
B 3	T1	T8	T3	T4	T9	T10	T5	T6	T7	T2
B 1	T9	T4	T1	T6	T5	T3	T8	T2	T10	T7

Las unidades experimentales de esta parte del estudio fueron cajas magenta tipo GA7 con nueve explantes de Stevia cada una. Las plantas fueron evaluadas cada cinco días (Anexo 2) considerando las siguientes variables:

- Contaminación: presencia de colonias de hongos o bacterias en el medio de cultivo.
- Prendimiento: número de explantes que viven y se adaptan a la propagación *in vitro*.
- Altura de Planta: medición en cm de altura de planta en las cajas (desde la base hasta la parte apical).
- Número de hojas: número de hojas formadas a lo largo del crecimiento del explante.
- Color del follaje: medida visual usando una escala de colores (Cuadro 4.2.2.3.).
- Fenolización: oxidación y necrosamiento del tejido vegetal. (coloración amarillenta o café)
- Enraizamiento: explantes que muestren el apareamiento de raíces en el medio.

Cuadro 4.2.2.3.: Escala arbitraria utilizada para evaluar el color del follaje de la Stevia.

Escala	1	2	3	4
Color	Verde Intenso			Amarillo

El ensayo se estableció bajo un diseño de bloques al azar en arreglo factorial $(3 \times 2) + 4$ con cuatro repeticiones. El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + S_j + F_k + Q_l + SFQ_{ikl} + e_{ijkl}$$

Donde

Y_{ijkl} = Variable aleatoria

μ = Media General

B_i = efecto de i-esimo Bloque

S_j = efecto de j-esimo Sustrato

F_k = efecto de k-esima Fuente

Q_l = efecto de l-esima Kinetina

SFQ_{ikl} = efecto de la j-esima, k-esima, l-esima interacción

e_{ijk} = error experimental

Además se realizó pruebas de comparación de media de Duncan al 5 % para sustratos, fuentes e interacciones. Para determinar el nivel óptimo de tiamina se realizó un análisis de regresión lineal entre el porcentaje de prendimiento y los niveles de tiamina.

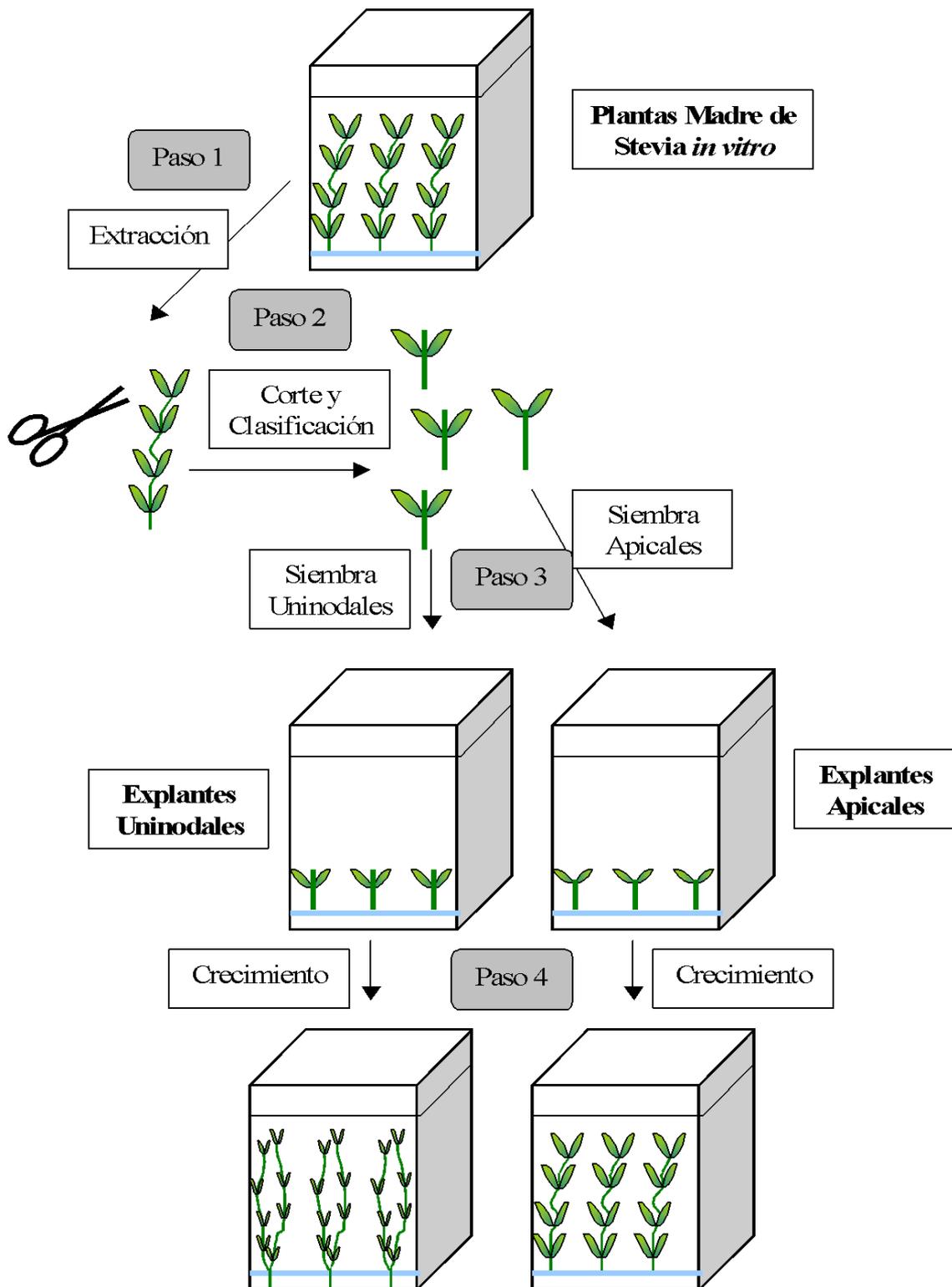


Gráfico 4.2.2.1.: Esquema de propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertonii, IASA I, Ecuador, 2007.

4.3. SELECCIÓN DEL SUSTRATO PARA LA PRODUCCIÓN DE STEVIA

4.3.1. Materiales y Equipos:

- Equipos de Laboratorio: Autoclave
- Material de Vidrio: Pipeta, Vaso de Precipitación, Vaso de Vidrio
- Reactivos e Insumos: Agua Destilada, Pomina, Tierra Negra, Turba, Alcohol Antiséptico, Fibra de coco
- Otros Materiales: Cuchara, Contenedores Plásticos Transparentes, Parafilm, Pinzas Medianas, Tijeras, Plantas de Stevia cultivadas *in vitro*, Marcador Punta Fina, Fundas Plásticas, Papel Periódico.

4.3.2. Metodología:

Los sustratos fueron esterilizados en el autoclave. Los contenedores plásticos transparentes (11 cm de ancho x 11 cm de largo y 5 cm de altura) fueron limpiados con alcohol antiséptico para llenarlos con los diferentes sustratos (Cuadro 4.3.2.1.), dejando espacio para la parte aérea de la planta.

Cuadro 4.3.2.1.: Sustratos usados para la producción *ex vitro* de *Stevia rebaudiana*

Sustrato	Tratamiento	Descripción
A FC	T ₁	Fuente Apical, Sustrato de Fibra de Coco.
U FC	T ₂	Fuente Uninodal, Sustrato de Fibra de Coco.
A SC	T ₃	Fuente Apical. Sustrato Compuesto.
U SC	T ₄	Fuente Uninodal. Sustrato Compuesto.

Las plantas fueron obtenidas de la fase *in vitro*. Las fuentes de propagación se separaron según su origen y se sembraron en los diferentes contenedores plásticos transparentes (Gráfico 4.3.2.1.). El sustrato se humedeció con solución hidropónica (Anexo 3) a partir del análisis foliar (Anexo 4).

El proceso de sembrado se repitió hasta obtener el número de cajas deseado, sembrando nueve plantas por caja. Las cajas se etiquetaron por tratamiento y se llevaron al cuarto de crecimiento (Anexo 5), en el cual permanecieron entre 21 y 28 días (Anexo 6), cuando se hizo evidente la presencia de raíces en la base.

Para esta parte del estudio las unidades experimentales fueron los contenedores plásticos transparentes con nueve explantes de *Stevia* cada uno. Las plantas se evaluaron cada siete días (Anexo 7), considerando las siguientes variables:

- Contaminación: presencia de hongos en las micro estacas o el sustrato.
- Prendimiento: número de micro estacas que viven y se adaptan a la propagación *ex vitro*.
- Altura de Planta: medición en cm de altura de planta en las cajas (desde la base hasta la parte apical)
- Número de hojas: número de hojas formadas a lo largo del crecimiento de la micro estaca.
- Enraizamiento: explantes que muestren el apareamiento de raíces en el sustrato (base del contenedor transparente).

El diseño empleado fue de bloques completos al azar con cuatro repeticiones (Cuadro 4.3.2.2.); el modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = u + B_i + T_j + e_{ijk}$$

Donde

Y_{ijk} = variable aleatoria

u = media general

B_i = efecto del i-esimo bloque

T_j = efecto del j-esimo tratamiento

e_{ijk} = error experimental

Cuadro 4.3.2.2.: Disposición en el laboratorio de los tratamientos del mejor sustrato en bloques al azar, IASA I, Ecuador, 2007.

Bloques	Tratamientos			
B3	T4	T2	T1	T3
B2	T2	T3	T1	T4
B1	T4	T3	T2	T1

Además se realizó pruebas de comparación de media de Duncan al 5 % para tratamientos.

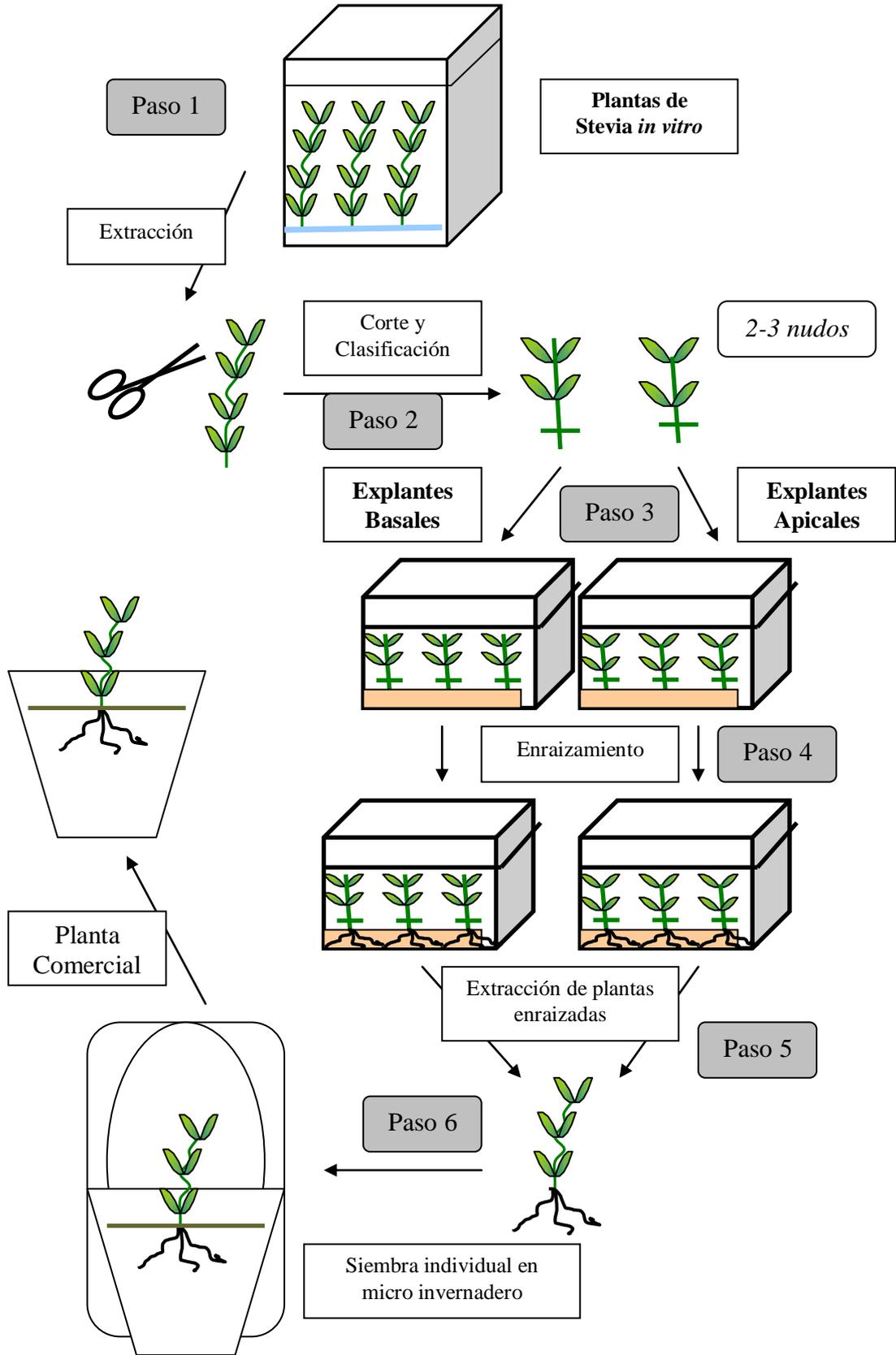


Gráfico 4.3.2.1.: Esquema de propagación *ex vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni, IASA I, Ecuador, 2007.

4.4. PORCENTAJE DE PRENDIMIENTO DE LAS PLANTAS OBTENIDAS EN EL LABORATORIO BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO.

Después de los días de permanencia de los contenedores plásticos transparentes en el cuarto de crecimiento se extrajeron las plantas enraizadas para sembrarlas individualmente en un micro invernadero para evitar estrés (Anexo 8). Se esperó 15 días más y las plantas se sacaron paulatinamente a las condiciones del invernadero, en el que las camas elevadas se prepararon para el trasplante final usando un sustrato compuesto por humus de lombriz, pomina y fibra de coco con una relación de 2:1:1. Una vez que las plantas se encontraron aclimatadas se procedió a las labores y cuidados comunes como son el riego y control de problemas fitopatológicos.

Las plantas se evaluaron cada siete días durante un mes para observar su adaptación a las condiciones de invernadero (Anexo 9), considerando únicamente el número de explantes que prendieron en el invernadero.

4.5. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO PORCENTUAL DE ESTEVIÓSIDO

Se tomaron hojas frescas de Stevia, tanto de plantas *in vitro* como del invernadero, y se las puso en la estufa a una temperatura de 60 °C durante 12 horas para su secado. Una vez secadas las muestras se enviaron para el análisis de las mismas a los laboratorios ANAGALIDE S.A. en Huesca, España. Los cromatogramas fueron obtenidos con el detector UV (210 nm) y con el detector ELSD (Evaporative Light Scattering Detector).

4.6. DETERMINACIÓN DE LA CARGA GENÉTICA DE LAS PLANTAS DE STEVIA

4.6.1. Materiales y Equipos:

- Equipos de Laboratorio: Cámara de flujo, Microscopio
- Material de Vidrio: Porta objetos, cubre objetos, Cajas Petri, Tubos de ensayo.
- Reactivos e Insumos: Agua Destilada, 8-hidroxiquinoleína, orceína acética, Fijador Carnoy (3 Alcohol Absoluto: 1 Ácido Acético)
- Otros Materiales: Papel Toalla

4.6.2. Metodología:

Las plantas en estudio para el conteo cromosómico se pusieron en un recipiente con papel toalla húmedo para promover la formación de raíces nuevas durante cinco días. Luego a las plantas completas se les dio un pretratamiento con una solución de 8-

hidroxiquinoleína al 0.002 M por un espacio de 3 horas (Anexo 10). Terminado el tiempo de pretratamiento las radículas seleccionadas se fijaron en una mezcla de tres partes de alcohol absoluto y una de ácido acético (Fijador Carnoy), durante 12 a 24 horas. (Guía de Investigación CIP 10).

Luego las raíces se sometieron a tinción en orceína acética clorhídrica (Anexo 11) durante tres horas. Las placas se prepararon cubriendo el material con un cubreobjetos, posteriormente se realizó el squash, con el fin de individualizar las células. Las placas fueron observadas al microscopio para el armado del cariotipo (Guía de Investigación CIP 10).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Nivel óptimo de Tiamina en los medios *in vitro*

5.1.1. Primer Ciclo de Propagación

Al analizar el porcentaje de prendimiento de explantes de Stevia bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1, 227}=9.89$; $p=0.0019$), de la Dosis ($F_{3, 227}=12.31$; $p<0.0001$), de Kinetina ($F_{1, 227}=38.37$; $p<0.0001$), de la interacción Fuente x Dosis ($F_{3, 227}=8.12$; $p<0.0001$) y de la interacción Fuente x Kinetina ($F_{1, 227}=8.61$; $p=0.0037$) (Cuadro 5.1.1.1.).

Cuadro 5.1.1.1.: Análisis de varianza del porcentaje de prendimiento, altura de planta, número de hojas, color de la planta, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.

	VARIABLE					
	Prendimiento	Altura	Hojas	Color	Fenolización	Enraizamiento
Modelo	<0.0001	0.0061	0.0150	0.0021	0.0004	0.0506
Repetición	0.1585	0.3285	0.4081	0.7694	0.1040	0.1104
Fuente	0.0019	0.0317	0.0075	0.0389	0.4710	0.1819
Dosis	<0.0001	0.0014	0.0205	0.0007	0.0058	0.0482
Kinetina	<0.0001	0.2678	0.0715	0.6618	0.0481	0.2276
Fuente*Dosis	<0.0001	0.3461	0.6209	0.2415	0.0050	0.2530
Fuente*Kinetina	0.0037	0.8113	0.4484	0.0295	0.3755	0.8799
CV	15.89	82.78	48.09	35.28	50.07	188.34

Al examinar las fuentes de propagación se determinó que la fuente apical presentó un mayor prendimiento que la fuente uninodal (Cuadro 5.1.1.2.).

Cuadro 5.1.1.2.: Promedio \pm error estándar del porcentaje de prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto de 2 fuentes de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Fuente	Prendimiento	Altura	Hojas
Apical	8.13 \pm 0.15 b	2.93 \pm 0.22 b	6.66 \pm 0.26 a
Uninodal	7.63 \pm 0.13 a	2.33 \pm 0.19 a	7.88 \pm 0.38 b

Miyagawa (1986) manifiesta que los brotes primordiales de *Stevia* son capaces de propagarse vegetativamente con una alta tasa y rediferenciarse fácilmente en nuevas plantas. La propagación de brotes primordiales de *Stevia* es rápida, y son altamente estables en número cromosómico y cariotipo. El brote primordial puede propagarse a una alta tasa por un largo tiempo sin diferenciación.

En cualquier momento, el brote primordial está listo para desarrollarse como plántulas con brotes y raíces permaneciendo 2 o 3 semanas en cultivo estático. Las plántulas pueden ser transplantadas a suelo esterilizado para crecer normalmente como plantas adultas (Miyagawa, 1986).

Las dosis de tiamina 0.0 ppm mostró mayor prendimiento frente a las dosis 0.2 ppm, 0.4 ppm y 0.8 ppm (Cuadro 5.1.1.3.).

Cuadro 5.1.1.3.: Promedio \pm error estándar del porcentaje de prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto diferentes dosis de tiamina IASA I, Ecuador, 2007.

Dosis	Prendimiento	Altura	Hojas
0.00	8.71 \pm 0.07 c	3.03 \pm 0.34 b	8.02 \pm 0.56 b
0.20	7.77 \pm 0.22 b	2.61 \pm 0.32 b	7.60 \pm 0.58 b
0.40	7.88 \pm 0.15 b	2.98 \pm 0.24 b	7.40 \pm 0.35 b
0.80	7.17 \pm 0.28 a	1.55 \pm 0.22 a	5.92 \pm 0.39 a

La tiamina o vitamina B1 es importante para las células de las plantas (Smith, 2000). Ciertas plantas crecen más rápido o tienen mayor productividad cuando se les proporcionan vitaminas exógenas, especialmente la vitamina B (Salisbury *et. al.* 2000). La mayoría de vegetales no sintetizan una cantidad suficiente de tiamina en la raíz para suplir sus propias necesidades (Devlin, 1975).

Al considerar el efecto de la kinetina se observó que las plantas con ésta hormona mostraron mayor prendimiento que los tratamientos sin kinetina (Cuadro 5.1.1.4.).

Cuadro 5.1.1.4.: Promedio \pm error estándar del porcentaje de prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto de 2 dosis de Kinetina, IASA I, Ecuador, 2007.

Kinetina	Prendimiento	Altura	Hojas
0.00	7.68 \pm 0.12 a	2.48 \pm 0.16 a	7.07 \pm 0.26 a
1.00	8.67 \pm 0.07 b	3.23 \pm 0.34 b	8.04 \pm 0.47 a

La Kinetina tiene varios efectos en el crecimiento vegetal, entre los efectos fisiológicos están el promover la división y elongación celular, además de romper la dormancia (Devlin, 1975; Ayerbe, 1990).

El cultivo de explantes con pocas hojas en un medio que contiene 10 mg l⁻¹ de kinetina es adecuado para la propagación vegetativa eficiente de Stevia, con un rendimiento de 50 a 100 brotes de un solo explante en 80 días. Cuando estos brotes múltiples se transplantan a un medio fresco de 10 mg l⁻¹ de kinetina, forman múltiples brotes otra vez (Tamura, 1984).

Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que los tratamientos T₁ (fuente apical sin tiamina), T₂ (fuente uninodal sin tiamina), T₉ (fuente apical más 0.4 ppm de tiamina y kinetina) y T₁₀ (fuente uninodal más 0.4 ppm de tiamina y kinetina) tuvieron mayor prendimiento que los demás, siendo el tratamiento de menor prendimiento el T₆ (fuente uninodal más 0.4 ppm de tiamina) (Cuadro 5.1.1.5.).

Cuadro 5.1.1.5.: Promedio \pm error estándar del porcentaje de prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto los tratamientos, IASA I, Ecuador, 2007.

Tratamiento	Prendimiento	Altura	Hojas
T ₁	8.83 \pm 0.08 d e	3.35 \pm 0.50 b c	7.25 \pm 0.59 a b
T ₂	8.58 \pm 0.10 d e	2.70 \pm 0.47 a b c	8.79 \pm 0.95 b
T ₃	7.46 \pm 0.38 b c	2.48 \pm 0.45 a b c	6.50 \pm 0.62 a b
T ₄	8.08 \pm 0.22 c d	2.73 \pm 0.47 a b c	8.71 \pm 0.94 b
T ₅	8.17 \pm 0.32 c d	3.25 \pm 0.52 b c	6.71 \pm 0.54 a b
T ₆	6.00 \pm 0.16 a	2.23 \pm 0.42 a b	6.79 \pm 0.89 a b
T ₇	7.21 \pm 0.45 b	1.74 \pm 0.37 a	5.38 \pm 0.48 a
T ₈	7.13 \pm 0.34 b	1.35 \pm 0.24 a	6.46 \pm 0.62 a b
T ₉	9.00 \pm 0.00 e	3.85 \pm 0.54 c	7.46 \pm 0.57 a b
T ₁₀	8.33 \pm 0.10 d e	2.62 \pm 0.40 a b c	8.63 \pm 0.74 b

En general los tratamientos de fuentes apicales (T_1 , T_5 , T_7 y T_9) presentaron el mayor prendimiento frente a las fuentes uninodales (Gráfico 5.1.1.1.). Se asume este comportamiento a que las fuentes apicales tienen mayor capacidad de adaptación en la propagación *in vitro*, ya que sus células poco diferenciadas tienen alta capacidad de división y crecimiento.

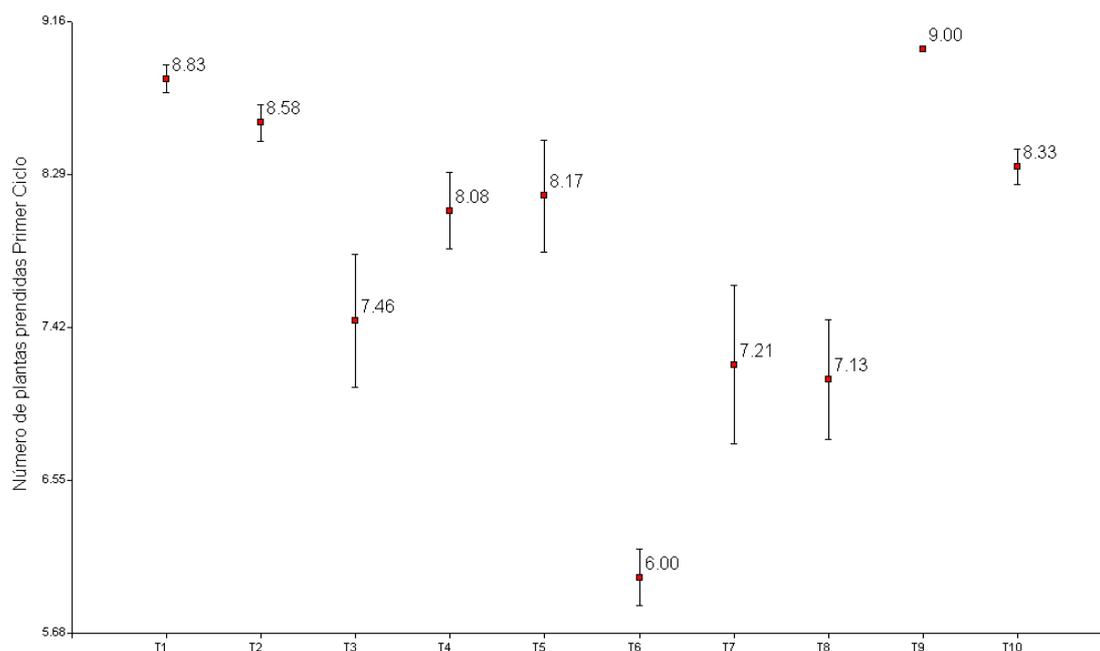


Gráfico 5.1.1.1.1.: Número de plantas prendidas de stevia según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Con respecto a la dosis de tiamina y el prendimiento hay un comportamiento interesante, ya que en los tratamientos de dosis cero el prendimiento es muy alto, y según se aumenta la dosis de esta hormona el número de plantas prendidas va disminuyendo (Gráfico 5.1.1.1.2.). Se asume que altos niveles de tiamina no son beneficiosos para el crecimiento de las plantas.

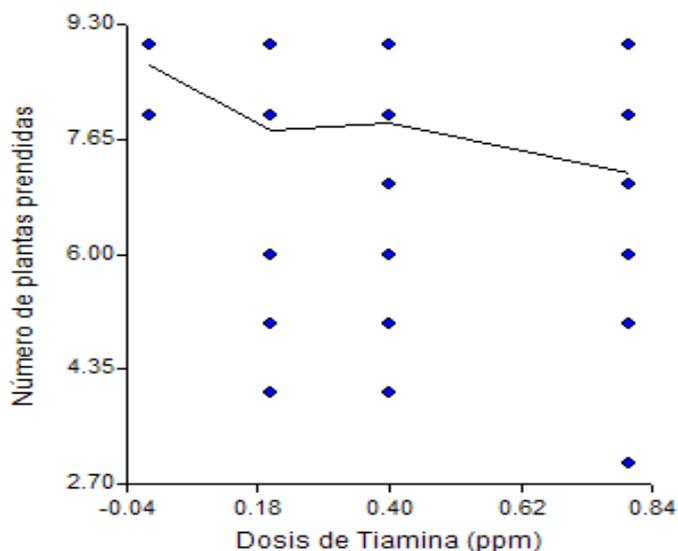


Gráfico 5.1.1.1.2.: Relación entre el número de plantas prendidas y la dosis de tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.

Al realizar el análisis de regresión entre el número de plantas prendidas y la dosis de tiamina bajo el modelo de un polinomio de tercer grado ($\# \text{ Plantas Prendidas} = 8.71 - 8.98D + 25.65 D^2 - 21.05D^3$) se encontró que la capacidad de prendimiento está en función de la dosis de tiamina en el medio de cultivo.

Al realizar la primera derivada de la ecuación de la regresión se encontró que el valor óptimo de la dosis de tiamina es de 0.2553 ppm a 0.5571 ppm

$$\# \text{ Plantas Prendidas} = 8.71 - 8.98D + 25.65 D^2 - 21.05D^3$$

$$\Delta = -8.98 + 2(25.65)D - 3(21.05)D^2$$

$$63.15D^2 - 51.3D + 8.98 = 0$$

$$D = \frac{51.3 \pm \sqrt{51.3^2 - 4(63.15)(8.98)}}{2(63.15)}$$

en donde D es igual a

$$D_1 = 0.2553 \text{ y } D_2 = 0.5571$$

Al analizar la altura de planta de Stevia bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1, 227}=4.67$; $p=0.0317$), de la Dosis ($F_{3, 227}=5.35$; $p=0.0014$). Al examinar las fuentes de propagación se determinó que la fuente apical presentó mayor altura que la fuente uninodal. Las dosis de tiamina 0.0 ppm, 0.2 ppm y 0.4 ppm mostraron mayor altura frente a la dosis 0.8 ppm. Al considerar el efecto de la kinetina se observó que los tratamientos que la tenían alcanzaron mayor altura que los tratamientos sin kinetina. Al comparar los diferentes tratamientos no se encontró diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a la altura de planta.

Los tratamientos T₁, T₅, T₇ y T₉ de fuentes apicales presentaron mayor altura de planta frente a los tratamientos de fuentes uninodales de su misma dosis (Gráfico 5.1.1.2.). Se asume que esto se debe a que las células de los tejidos apicales son más jóvenes y menos diferenciadas que las células de los nudos uninodales, por lo que se dividen y crecen más rápido.

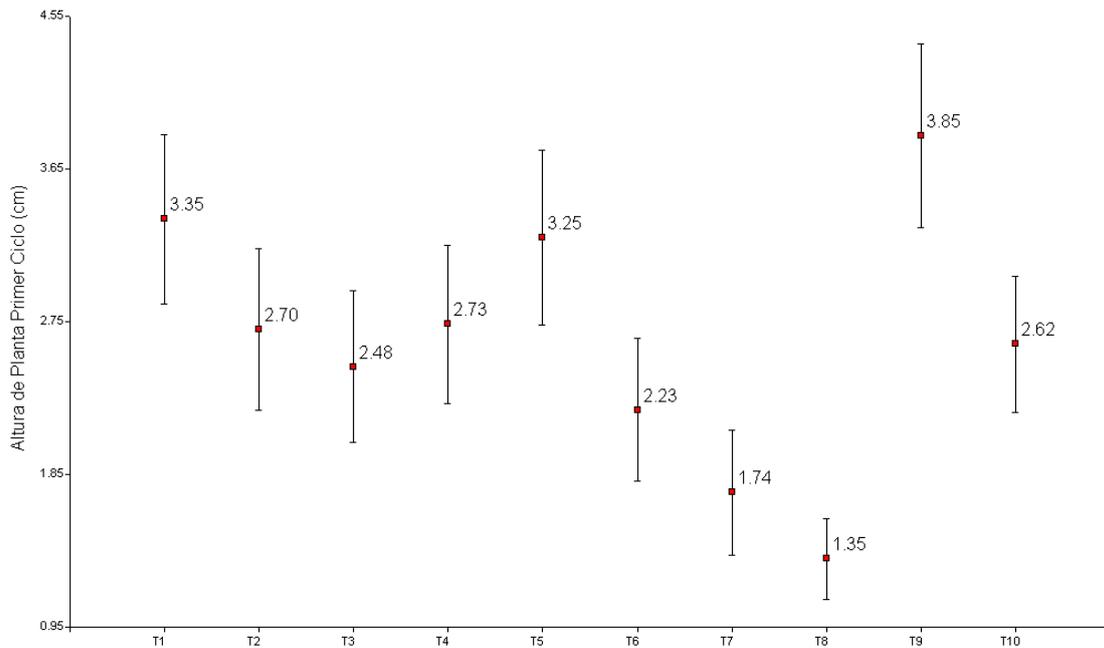


Gráfico 5.1.1.2.: Promedio de la altura de planta de stevia según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

El estado físico del medio muestra diferencias significativas para la altura de las vitroplantas de sábila (*Aloe vera* L.). Se obtienen vitroplantas de mayor altura (3,85 cm) al usar el medio de cultivo líquido en agitación; mientras que, en medio de cultivo semi-sólido se obtiene un promedio de 2,83 cm (Albany *et. al.* , 2006.)

En la propagación *in vitro* de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* L.) la vitamina B12 (tiamina HCl) presentó efecto simple significativo en las variables altura de planta y número de hijos (Méndez, 1997).

Al analizar el número de hojas de Stevia bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1, 227}=7.27$; $p=0.0075$), de la Dosis ($F_{3, 227}=3.33$; $p=0.0205$). Con respecto a las fuentes de propagación se determinó que la fuente uninodal presentó mayor número de hojas que la fuente apical. Las dosis de tiamina 0.0 ppm, 0.2 ppm y 0.4ppm mostraron mayor número de hojas frente a la dosis

0.8 ppm. Al considerar el efecto de la kinetina se observó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al número de hojas. Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que no hay diferencias significativas entre tratamientos con respecto al número de hojas.

Según Tamura (1984) en sus trabajos de propagación clonal de *Stevia* los explantes sin hojas con una longitud menor a 0.3 mm no crecen y se tornan cafés. Sin embargo, el 80 % de los explantes con 2 a 4 hojas entre 0.3 y 1.5 mm de largo desarrollan brotes múltiples. El noventa por ciento de los explantes con 6 a 8 hojas de entre 1.5 a 2 mm de largo forman brotes individuales en vez de brotes múltiples. Parece que los explantes largos contienen una sustancia desconocida que inhibe la formación de brotes múltiples como una expresión de la dominancia apical.

Todos los tratamientos de fuentes uninodales T₂, T₄, T₆, T₈ y T₁₀, presentaron mayor número de hojas que los tratamientos de fuentes apicales y de la misma dosis; por ende más nudos (cada nudo es una potencial planta nueva en el futuro) (Gráfico 5.1.1.3.). Se asume que las fuentes uninodales crecen más lentamente que las fuentes apicales, pero lo compensan formando dos o más brotes por nudo, debido a que se rompe la dominancia apical del nudo al momento de propagar. También hay que tomar en cuenta que los tratamientos T₉ y T₁₀ que tienen la hormona kinetina, forman una cantidad muy superior de brotes, tanto en fuentes apicales como uninodales, por lo que se pudo observar el efecto beneficioso del uso de esta sustancia en la propagación *in vitro* de *stevia*.

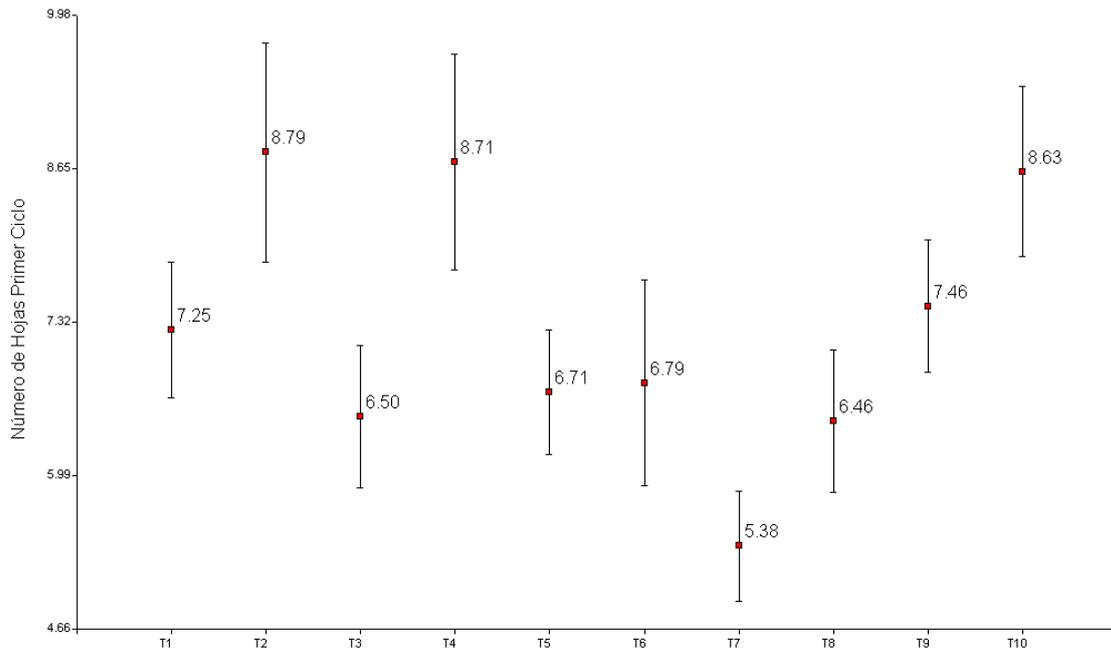


Gráfico 5.1.1.3.: Promedio del número de hojas de stevia según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Las plántulas de *Agave* (*Agave salmiana* Otto y *Agave mapisaga*) cultivadas *in vitro* presentan valores mayores en su número de hojas, comparando con las plantas en invernadero. La altura de las plantas como único parámetro, no necesariamente refleja crecimiento; por lo que es posible suponer que las condiciones *in vitro* pueden favorecer los ritmos de crecimiento de las plantas, obteniendo plántulas con mayor número de hojas (Malda, 2004).

Al analizar el color de las plantas de *Stevia* bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1, 227}=4.32$; $p=0.0389$), de la Dosis ($F_{3, 227}=5.86$; $p=0.0007$) y de la interacción Fuente x Kinetina ($F_{1, 227}=4.80$; $p=0.0295$). Al examinar las fuentes de propagación se determinó que la fuente apical presentó mayor coloración verde que la fuente de propagación uninodal (Cuadro 5.1.1.6.).

Cuadro 5.1.1.6.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de 2 fuentes de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Fuente	Color	Fenolización	Enraizamiento
Apical	1.26 \pm 0.04 a	4.71 \pm 0.25 a	0.83 \pm 0.13 a
Uninodal	1.38 \pm 0.05 b	4.93 \pm 0.21 a	0.60 \pm 0.12 a

Las dosis de tiamina 0.0, 0.2 y 0.4 mostraron mayor coloración verde frente a la dosis 0.8 ppm (Cuadro 5.1.1.7.).

Cuadro 5.1.1.7.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de diferentes dosis de tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.

Dosis	Color	Fenolización	Enraizamiento
0.00	1.21 \pm 0.06 a	3.71 \pm 0.35 a	0.83 \pm 0.18 b
0.20	1.19 \pm 0.06 a	5.02 \pm 0.29 b	0.77 \pm 0.22 b
0.40	1.33 \pm 0.05 a	5.09 \pm 0.26 b	0.88 \pm 0.16 b
0.80	1.54 \pm 0.07 b	5.19 \pm 0.40 b	0.23 \pm 0.07 a

Al considerar el efecto de la kinetina se observó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 5.1.1.8.).

Cuadro 5.1.1.8.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de 2 dosis de kinetina, IASA I, Ecuador, 2007.

Kinetina	Color	Fenolización	Enraizamiento
0.00	1.32 \pm 0.03 a	4.88 \pm 0.18 a	0.72 \pm 0.10 a
1.00	1.31 \pm 0.08 a	4.60 \pm 0.36 a	0.71 \pm 0.19 a

Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que no hay diferencias significativas entre tratamientos con respecto a la coloración verde de los explantes (Cuadro 5.1.1.9.; Gráfico 5.1.1.4.).

Cuadro 5.1.1.9.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de los tratamientos, IASA I, Ecuador, 2007.

Tratamiento	Color	Fenolización	Enraizamiento
T ₁	1.13 \pm 0.07 a	4.08 \pm 0.55 a b	0.92 \pm 0.24 a b
T ₂	1.29 \pm 0.09 a b	3.33 \pm 0.45 a	0.75 \pm 0.28 a b
T ₃	1.21 \pm 0.08 a	5.67 \pm 0.46 b c	0.63 \pm 0.25 a b
T ₄	1.17 \pm 0.08 a	4.38 \pm 0.32 a b	0.92 \pm 0.37 a b
T ₅	1.33 \pm 0.10 a b	4.63 \pm 0.58 a b	1.33 \pm 0.41 b
T ₆	1.38 \pm 0.10 a b	6.54 \pm 0.39 c	0.75 \pm 0.31 a b
T ₇	1.54 \pm 0.10 b	5.08 \pm 0.68 b c	0.25 \pm 0.12 a
T ₈	1.54 \pm 0.10 b	5.29 \pm 0.44 b c	0.21 \pm 0.08 a
T ₉	1.08 \pm 0.06 a	4.08 \pm 0.50 a b	1.04 \pm 0.35 a b
T ₁₀	1.54 \pm 0.13 b	5.13 \pm 0.50 b c	0.38 \pm 0.15 a

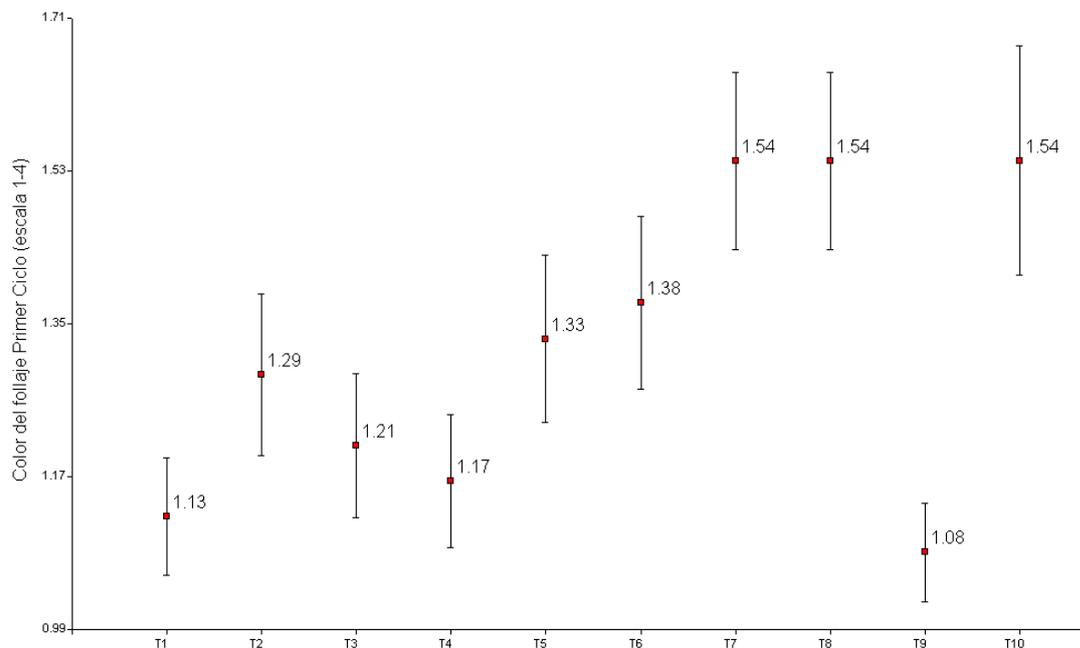


Gráfico 5.1.1.4.: Coloración del follaje de stevia (escala 1-4) según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

La clorofila de las plantas o alimentos puede sufrir distintos tipos de alteraciones. Al elevar el pH se mantiene el color, pero a costa de aumentar la destrucción de la tiamina (Calvo, 2002).

Al analizar la fenolización de Stevia bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Dosis ($F_{3, 227}=4.29$; $p=0.0058$), de Kinetina ($F_{1, 227}=3.95$; $p=0.0481$) y de la interacción Fuente x Dosis ($F_{3, 227}=4.39$; $p=0.0050$). Al examinar las fuentes de propagación no se encontró diferencias significativas entre fuentes apicales y uninodales. Las dosis de tiamina 0.2 ppm, 0.4 ppm y 0.8 ppm mostraron mayor porcentaje de fenolización que la dosis 0.0 ppm. Con respecto al efecto de la kinetina se observó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que no hay diferencias significativas entre tratamientos con respecto a la fenolización.

Se deduce que la presencia de la tiamina podría propiciar la fenolización de los tejidos debido a que los tratamientos T_1 Y T_2 , que tenían dosis cero, presentaron el menor índice de fenolización, y a medida que aumenta la dosis se observó que aumentó la fenolización también (Gráfico 5.1.1.5.).

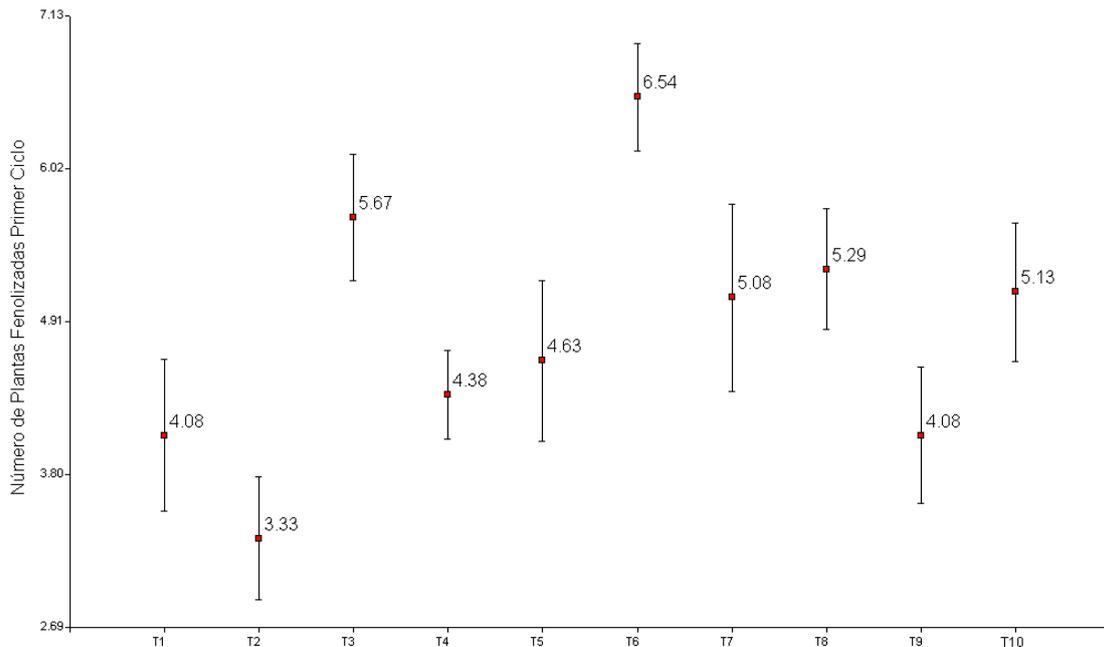


Gráfico 5.1.1.5.: Número de plantas fenolizadas de stevia según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

En el cultivo *in vitro* de arroz (*Oryza sativa* L.) la edad y estado de fenolización influyen en los procesos de multiplicación y crecimiento (Narváez, 1983). Los tejidos meristemáticos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) poseen alta concentración de polifenoles y éstos causan oxidación e inducen a la formación de quinonas. El grado de producción de fenoles depende posiblemente de la variedad con que se trabaje y no del medio de cultivo que se utilice (Cuellar, 1996). En plantas de chirimoya (*Annona cherimola*), plátanos y bananos (*Mussa spp.*) la identificación del explante inicial en edad, tamaño y ubicación en la planta permite controlar la fenolización inicial que limita el cultivo *in vitro*. Los explantes pueden ser tratados con antioxidantes para disminuir la fenolización de los mismos en el medio de cultivo (Bridg, 2001; Pérez, 2006). La mayor producción de fenoles de plantas de teca (*Tectona grandis* L.F.) está en los tejidos diferenciados de la planta. La síntesis de los precursores de fenoles es más activa y compleja en tejidos maduros que en tejidos jóvenes, y está directamente influenciada por el contenido de sales y reguladores de crecimiento en el medio de cultivo

(Rodríguez *et. al.*, 2002). La exudación de fenoles fitotóxicos durante el cultivo de tejidos de orquídeas constituye un serio problema para su cultivo *in vitro* (Rodríguez, 2005).

Al analizar el enraizamiento de Stevia bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Dosis ($F_{3, 227}=2.67$; $p=0.0482$). Al examinar las fuentes de propagación no se encontró diferencias significativas entre apicales y uninodales. Las dosis de tiamina 0.0 ppm, 0.2 ppm y 0.4 ppm mostraron mayor enraizamiento que la dosis 0.8 ppm. Al considerar el efecto de la kinetina se observó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que no hay diferencias significativas con respecto al enraizamiento.

Se asume que el mayor enraizamiento de los tratamientos T₅ y T₉ se debió a que ambos tenían la dosis normal de tiamina de 0.4 ppm con fuentes de propagación apicales, lo que propició condiciones favorables para estas plantas frente a las que tenían dosis diferentes de tiamina (Gráfico 5.1.1.6.). Aún así no se pudo encontrar un efecto significativo de la tiamina como un enraizador efectivo.

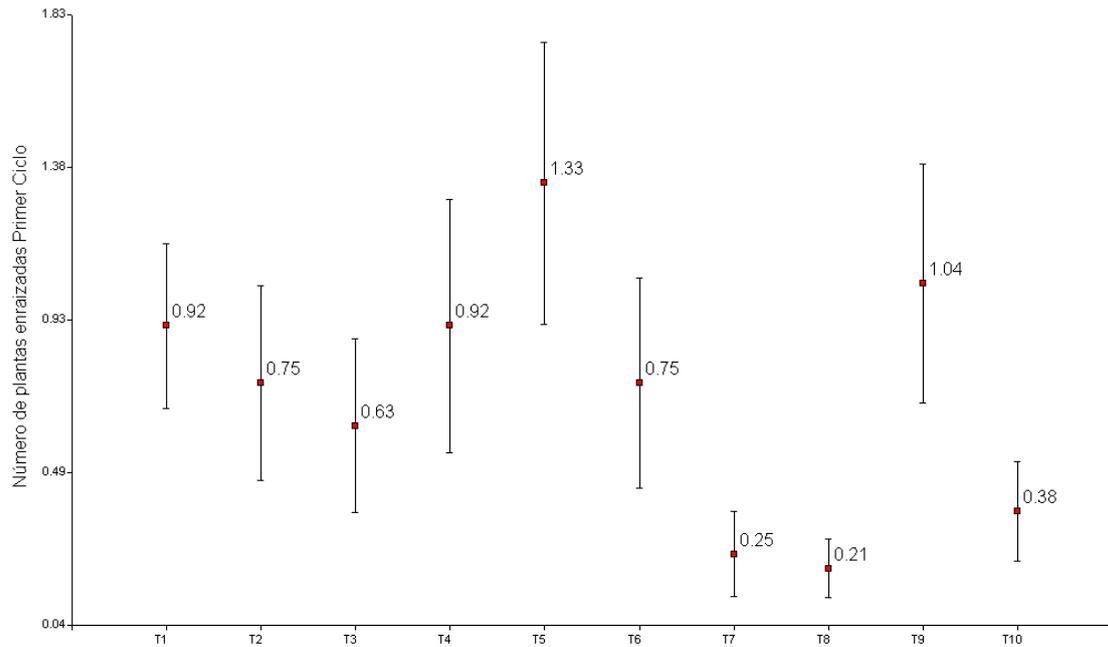


Gráfico 5.1.1.6.: Número de plantas enraizadas de stevia según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

La propagación de Stevia es usualmente hecha con estacas que enraízan fácilmente. La pobre germinación es uno de los factores que limitan el cultivo a gran escala. Shock (1982), Duke(1993) y Carneiro (1997), mencionan la pobre producción de semillas viables.

5.1.2. Segundo Ciclo de Propagación

Al analizar la contaminación de los medios de Stevia bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1,1787}=3.80$; $p=0.0513$), de la Dosis ($F_{3, 1787}=22.65$; $p<0.0001$), de Kinetina ($F_{1, 1787}=21.39$; $p<0.0001$), de la interacción Fuente x Dosis ($F_{3, 1787}=45.47$; $p<0.0001$) y de la interacción Fuente x Kinetina ($F_{1, 1787}=21.39$; $p<0.0001$) (Cuadro 5.1.2.1.).

Cuadro 5.1.2.1.: Análisis de Varianza del prendimiento, altura, número de hojas, color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.

	VARIABLE						
	Contam.	Prendim.	Altura	Hojas	Color	Fenoliza.	Enraiza.
Modelo	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Fuente	0.0513	<0.0001	<0.0001	0.0049	0.6892	<0.0001	<0.0001
Repetición	<0.0001	<0.0001	0.0834	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0721
Dosis	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0049	<0.0001
Kinetina	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0162	<0.0001	0.0387
Fuente*Dosis	<0.0001	<0.0001	0.0051	0.9452	0.0827	0.3521	<0.0001
Fuente*Kinetina	<0.0001	0.0314	0.0158	0.0666	0.8879	0.0001	0.3204
CV	167.37	43.95	86.43	74.27	42.18	201.14	346.46

Al examinar las fuentes de propagación se determinó que las fuentes apicales y uninodales mostraron el mismo nivel de contaminación (Cuadro 5.1.2.2.).

Cuadro 5.1.2.2.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto de 2 fuentes de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Fuente	Contaminación	Prendimiento	Altura	Hojas
Apical	0.23 \pm 0.01 a	0.78 \pm 0.01 a	1.95 \pm 0.06 b	7.86 \pm 0.24 a
Uninodal	0.20 \pm 0.01 a	0.88 \pm 0.01 b	1.32 \pm 0.04 a	8.77 \pm 0.24 b

La dosis de tiamina 0.2 ppm mostró menor contaminación frente al resto de dosis. La dosis 0.8 ppm mostró mayor nivel de contaminación (Cuadro 5.1.2.3.).

Cuadro 5.1.2.3.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto de diferentes dosis de tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.

Dosis	Contaminación	Prendimiento	Altura	Número de Hojas
1 (0.0)	0.25 \pm 0.02 c	0.89 \pm 0.02 c	1.42 \pm 0.07 a	7.93 \pm 0.32 b
2 (0.2)	0.13 \pm 0.02 a	0.85 \pm 0.02 b c	1.62 \pm 0.09 b c	7.78 \pm 0.30 b
3 (0.4)	0.19 \pm 0.01 b	0.79 \pm 0.02 a	1.81 \pm 0.07 c	9.74 \pm 0.33 c
4 (0.8)	0.33 \pm 0.02 d	0.81 \pm 0.02 a b	1.46 \pm 0.07 a b	6.66 \pm 0.26 a

Con respecto a la Kinetina se observó que los tratamientos con ésta hormona obtuvieron menos contaminación que los tratamientos sin kinetina (Cuadro 5.1.2.4.).

Cuadro 5.1.2.4.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto de 2 dosis de Kinetina, IASA I, Ecuador, 2007.

Kinetina	Contaminación	Prendimiento	Altura	Hojas
0.0	0.24 \pm 0.01 b	0.82 \pm 0.01 a	1.48 \pm 0.04 a	7.52 \pm 0.15 a
1.0	0.13 \pm 0.02 a	0.87 \pm 0.02 b	2.13 \pm 0.10 b	11.42 \pm 0.52 b

Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que los tratamientos T₄ (fuente uninodal más 0.2 ppm de tiamina) y T₁₀ (fuente uninodal más 0.4 ppm de tiamina y kinetina) tuvieron contaminación cero, siendo el tratamiento de mayor contaminación el T₈ (fuente uninodal más 0.8 ppm de tiamina) (Cuadro 5.1.2.5.).

Cuadro 5.1.2.5.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura y número de hojas bajo el efecto de los diferentes tratamientos, IASA I, Ecuador, 2007.

Tratamiento	Contaminación	Prendimiento	Altura	Número de Hojas
T ₁	0.25 \pm 0.03 b	0.89 \pm 0.02 c d	1.70 \pm 0.11 b	7.35 \pm 0.41 a b c
T ₂	0.25 \pm 0.03 b	0.89 \pm 0.02 c d	1.14 \pm 0.08 a	8.52 \pm 0.50 c
T ₃	0.25 \pm 0.03 b	0.81 \pm 0.03 b c	2.19 \pm 0.16 d	7.49 \pm 0.44 a b c
T ₄	0.00 \pm 0.00 a	0.89 \pm 0.02 c d	1.10 \pm 0.07 a	8.04 \pm 0.40 b c
T ₅	0.25 \pm 0.03 b	0.57 \pm 0.04 a	1.86 \pm 0.15 b c	6.73 \pm 0.43 a b
T ₆	0.25 \pm 0.03 b	0.85 \pm 0.03 b c	1.11 \pm 0.07 a	8.29 \pm 0.46 b c
T ₇	0.17 \pm 0.03 b	0.82 \pm 0.03 b c	1.81 \pm 0.10 b c	6.11 \pm 0.28 a
T ₈	0.50 \pm 0.04 c	0.80 \pm 0.03 b	1.10 \pm 0.08 a	7.23 \pm 0.44 a b c
T ₉	0.25 \pm 0.03 b	0.79 \pm 0.03 b	2.20 \pm 0.15 d	11.43 \pm 0.80 d
T ₁₀	0.00 \pm 0.00 a	0.96 \pm 0.02 d	2.06 \pm 0.14 c d	11.40 \pm 0.68 d

Se asume que el nivel de tiamina, la fuente de propagación o la presencia de kinetina nada tiene que ver con el índice de contaminación del medio de cultivo (Gráfico 5.1.2.1.); no así el efecto mismo de la contaminación sobre los explantes. Se pudo

observar que la mayoría de la contaminación fue de hongos (no fitopatógenos), que si bien no afectan a los explantes directamente, disminuyen su prendimiento y capacidad de crecimiento por competencia de espacio y nutrientes.

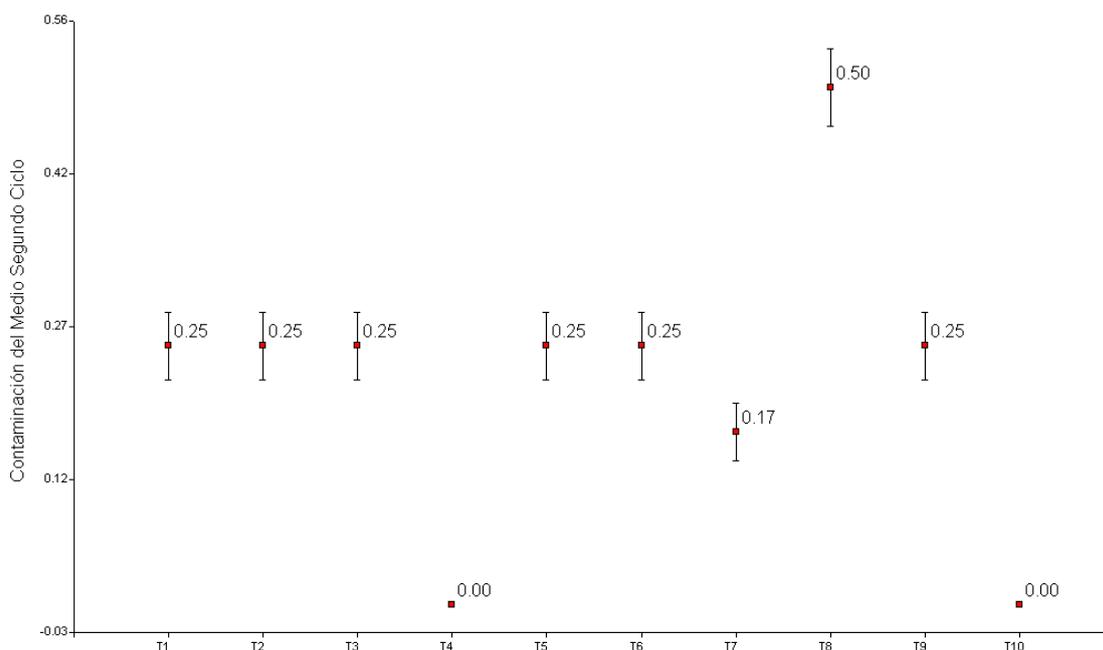


Gráfico 5.1.2.1.: Contaminación de los medios de cultivo según el tratamiento en el segundo ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

En el cultivo *in vitro* de Sábila (*Aloe vera* L.) el porcentaje de contaminación puede deberse al uso de un explante de tamaño pequeño (1 cm de altura y 0,5 cm de diámetro aproximadamente) (Albany, 2006).

Al analizar el prendimiento de *Stevia* bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1,1787}=35.62$; $p<0.0001$), de la Dosis ($F_{3, 1787}=7.38$; $p=0.0001$), de Kinetina ($F_{1, 1787}=36.62$; $p<0.0001$), de la interacción Fuente x Dosis ($F_{3, 1787}=12.57$; $p<0.0001$) y de la interacción Fuente x Kinetina ($F_{1, 1787}=4.64$; $p=0.0314$). Al examinar las fuentes de propagación se determinó que la fuente uninodal presentó mayor prendimiento que la fuente de propagación apical. La

dosis de tiamina 0.0 ppm mostró mayor prendimiento frente a la dosis 0.4 ppm que fue la de menos prendimiento. Con respecto a la Kinetina se observó que los tratamientos que la tenían obtuvieron más prendimiento que los tratamientos sin kinetina. Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que el tratamiento T₅ (fuente apical más 0.4 ppm de tiamina) tuvo el prendimiento más bajo, siendo el tratamiento de mayor prendimiento el T₁₀ (fuente uninodal más 0.4 ppm de tiamina y 10 ppm de kinetina).

El prendimiento general de los tratamientos fue alto, pero cabe destacar al T₁₀, que tuvo un prendimiento de casi el 100%, lo cual se asume es debido a que la fuente uninodal usada se pudo adaptar fácilmente a la propagación, y a que este tratamiento poseía kinetina, hormona que pudo tener algún efecto sobre el prendimiento en esta fase (Gráfico 5.1.2.2.).

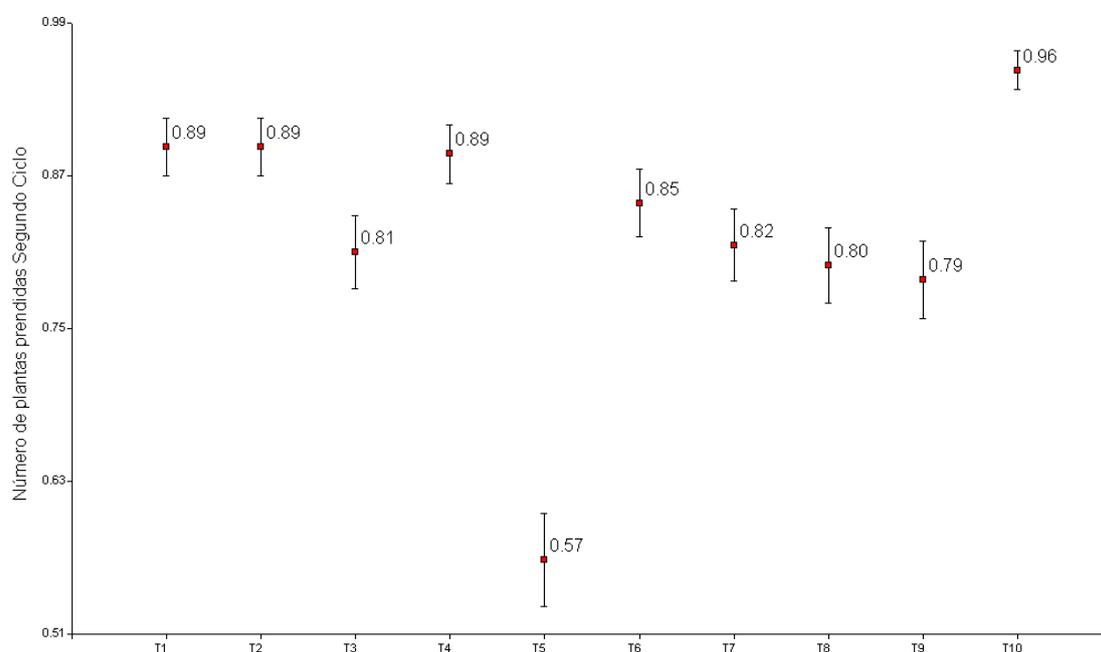


Gráfico 5.1.2.2.: Número de plantas prendidas de stevia según el tratamiento en el segundo ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Al comparar los dos ciclos de propagación *in vitro* se determinó que en el primer ciclo hubo mayor prendimiento de las fuentes apicales, en tanto que en el segundo ciclo el mayor prendimiento lo presentaron las fuentes uninodales. Con respecto a la dosis de tiamina en el primer ciclo la dosis 0.0 ppm presentó el mayor prendimiento y en el segundo ciclo no hubo diferencias significativas entre las diferentes dosis con respecto a la altura. Al examinar el efecto de la kinetina se observó que en los dos ciclos de propagación la presencia de esta hormona aumenta el prendimiento.

Al analizar la altura de Stevia bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1,1476}=76.21$; $p<0.0001$), de la Dosis ($F_{3,1476}=8.00$; $p<0.0001$), de Kinetina ($F_{1,1476}=34.32$; $p<0.0001$), de la interacción Fuente x Dosis ($F_{3,1476}=4.28$; $p=0.0051$) y de la interacción Fuente x Kinetina ($F_{1,1476}=5.84$; $p=0.0158$). Al examinar las fuentes de propagación se determinó que la fuente apical presentó mayor altura que la fuente de propagación uninodal. La dosis de tiamina 0.4 ppm mostró mayor altura frente a las dosis 0.0 ppm y 0.8 ppm que fueron de menor altura. Con respecto a la Kinetina se observó que los tratamientos que la tenían obtuvieron más altura que los tratamientos de dosis 0.0. Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que los tratamientos T₂ (fuente uninodal sin tiamina), T₄ (fuente uninodal más 0.2 ppm de tiamina), T₆ (fuente uninodal más 0.4 ppm de tiamina) y T₈ (fuente uninodal más 0.8 ppm de tiamina) tuvieron la altura más baja, siendo los tratamientos de mayor altura el T₃ (fuente apical más 0.2 ppm de tiamina), T₉ (fuente apical más 0.4 ppm de tiamina y kinetina) y T₁₀ (fuente apical más 0.4 ppm de tiamina y kinetina).

Los tratamientos T₁, T₃, T₅, T₇ Y T₉ que poseían fuentes de propagación apical presentaron la mayor altura de planta que sus contrapartes de fuente uninodal de misma dosis de tiamina, por lo que se asume que las fuentes apicales crecen más rápidamente con un brote único que las fuentes uninodales. Cabe resaltar que los tratamientos T₉ y T₁₀, sin importar la fuente de propagación, presentaron alturas similares, posiblemente a la presencia de kinetina en sus medios, a diferencia de los demás tratamientos donde en dosis iguales de tiamina con fuentes de propagación diferentes, presentaron diferencias significativas entre sí (Gráfico 5.1.2.3.).

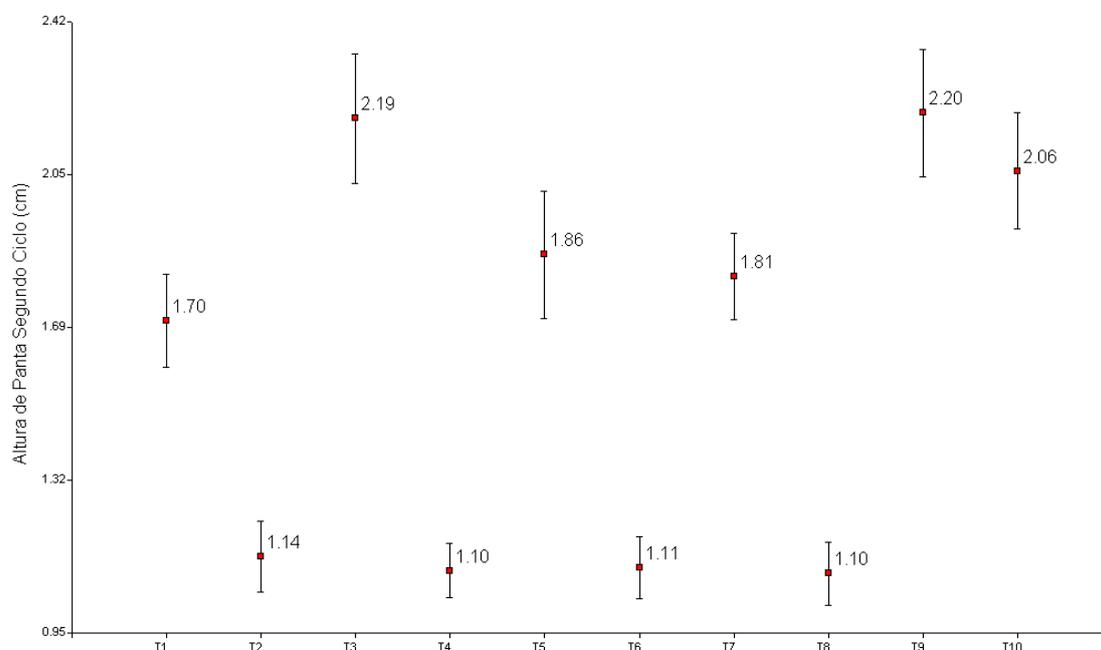


Gráfico 5.1.2.3.: Promedio de la altura de planta de stevia según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Al comparar los dos ciclos de propagación *in vitro* se determinó que la altura de planta en ambos casos fue mayor para las fuentes apicales. Con respecto a la dosis de tiamina en el primer ciclo la dosis 0.8 ppm presentó la menor altura y en el segundo ciclo no hubo diferencias significativas entre las diferentes dosis con respecto a la altura. Al

examinar el efecto de la kinetina se observó que en los dos ciclos de propagación la presencia de esta hormona favorece una mayor altura de planta.

Al analizar el número de hojas de Stevia bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1,1476}=7.92$; $p=0.0049$), de la Dosis ($F_{3, 1476}=14.21$; $p<0.0001$) y de Kinetina ($F_{1, 1476}=55.61$; $p<0.0001$). Al examinar las fuentes de propagación se determinó que la fuente uninodal presentó mayor altura que la fuente de propagación apical. La dosis de tiamina 0.8 ppm mostró el menor número de hojas frente a la dosis 0.4 ppm que fue la de más número de hojas. Al considerar el efecto de la Kinetina se observó que los tratamientos que la tenían obtuvieron más número de hojas que los tratamientos sin kinetina. Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que el tratamiento T₇ (fuente apical más 0.8 ppm de tiamina) tuvo el número de hojas más bajo, siendo los tratamientos de mayor número de hojas el T₉ (fuente apical más 0.4 ppm de tiamina y 10 ppm de kinetina) y T₁₀ (fuente uninodal más 0.4 ppm de tiamina y 10 ppm de kinetina).

Se asume que los tratamientos T₉ y T₁₀ presentaron el mayor número de hojas debido a la presencia de kinetina y el efecto que esta hormona tiene en la división celular, además de estimular la formación de brotes, independientemente de si la fuente de propagación es apical o uninodal. En los demás tratamientos se observaron diferencias entre los tratamientos de diferentes fuentes, es decir que las fuentes uninodales tuvieron dos brotes y las fuentes apicales un único brote y por ende menos hojas (Gráfico 5.1.2.4.).

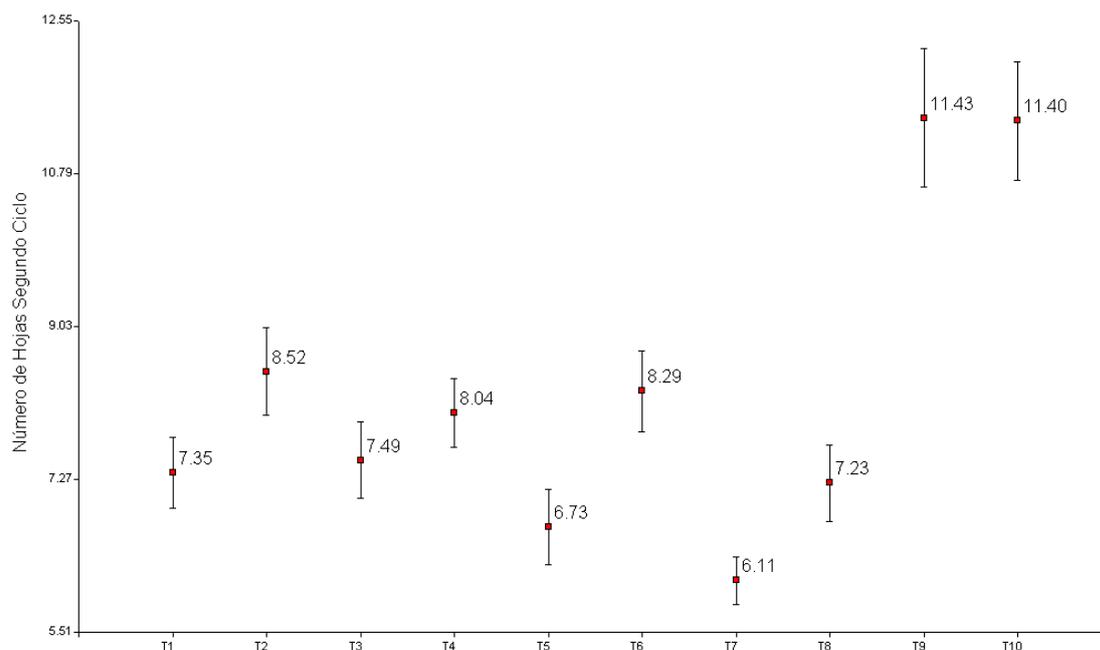


Gráfico 5.1.2.4.: Promedio del número de hojas de stevia según el tratamiento en el segundo ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Al comparar los dos ciclos de propagación *in vitro* se determinó que el número de hojas en ambos casos fue mayor para las fuentes uninodales. Con respecto a la dosis de tiamina en ambos ciclos la dosis 0.8 ppm presentó el menor número de hojas frente a las demás dosis. Al examinar el efecto de la kinetina se observó que en el primer ciclo no hubo diferencias significativas del número de hojas, mientras que en el segundo ciclo de propagación la presencia de kinetina favoreció la formación de mayor número de hojas.

Al analizar el color de Stevia bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Dosis ($F_{3, 1476}=11.37$; $p<0.0001$) y de Kinetina ($F_{1, 1476}=5.79$; $p=0.0162$). Al examinar las fuentes de propagación no se encontró diferencias significativas entre apicales y uninodales (Cuadro 5.1.2.6.).

Cuadro 5.1.2.6.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de 2 fuentes de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Fuente	Color	Fenolización	Enraizamiento
Apical	1.28 \pm 0.02 a	0.25 \pm 0.02 b	0.11 \pm 0.01 b
Uninodal	1.29 \pm 0.02 a	0.13 \pm 0.01 a	0.04 \pm 0.01 a

La dosis de tiamina 0.2 ppm mostró mayor coloración verde frente a la dosis 0.0 ppm que fue la de menos coloración verde (Cuadro 5.1.2.7.).

Cuadro 5.1.2.7.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de diferentes dosis de tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.

Dosis	Color	Fenolización	Enraizamiento
1 (0.0)	1.42 \pm 0.04 c	0.19 \pm 0.02 b	0.04 \pm 0.01 a
2 (0.2)	1.18 \pm 0.03 a	0.23 \pm 0.02 b	0.15 \pm 0.02 c
3 (0.4)	1.24 \pm 0.02 a b	0.20 \pm 0.02 b	0.03 \pm 0.01 a
4 (0.8)	1.31 \pm 0.03 b	0.12 \pm 0.02 a	0.09 \pm 0.02 b

Al considerar el efecto de la Kinetina se observó que los tratamientos que la tenían obtuvieron más coloración verde que los tratamientos de dosis 0.0 (Cuadro 5.1.2.8.).

Cuadro 5.1.2.8.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de 2 dosis de Kinetina, IASA I, Ecuador, 2007.

Kinetina	Color	Fenolización	Enraizamiento
0.0	1.30 \pm 0.02 b	0.20 \pm 0.01 b	0.09 \pm 0.01 b
1.0	1.20 \pm 0.03 a	0.14 \pm 0.02 a	0.02 \pm 0.01 a

Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que el tratamiento T₁ (fuente apical sin tiamina) tuvo la coloración verde más baja, siendo los tratamientos de mayor coloración verde el T₃ (fuente apical más 0.2 ppm de tiamina), T₄ (fuente uninodal más 0.2 ppm de tiamina), T₉ (fuente apical más 0.4 ppm de tiamina y 10 ppm de kinetina) y T₁₀ (fuente uninodal más 0.4 ppm de tiamina y 10 ppm de kinetina) (Cuadro 5.1.2.9.).

Cuadro 5.1.2.9.: Promedio \pm error estándar del color, fenolización y enraizamiento bajo el efecto de los diferentes tratamientos, IASA I, Ecuador, 2007.

Tratamiento	Color	Fenolización	Enraizamiento
T ₁	1.48 \pm 0.06 c	0.23 \pm 0.03 c d	0.06 \pm 0.02 a b
T ₂	1.37 \pm 0.05 b c	0.14 \pm 0.03 c d	0.02 \pm 0.01 a
T ₃	1.18 \pm 0.04 a	0.32 \pm 0.04 b c	0.28 \pm 0.04 c
T ₄	1.19 \pm 0.04 a	0.14 \pm 0.03 c d	0.03 \pm 0.01 a
T ₅	1.25 \pm 0.06 a b	0.46 \pm 0.05 a	0.08 \pm 0.03 a b
T ₆	1.32 \pm 0.04 a b	0.16 \pm 0.03 b c	0.04 \pm 0.02 a
T ₇	1.26 \pm 0.04 a b	0.16 \pm 0.03 b c	0.12 \pm 0.03 b
T ₈	1.37 \pm 0.05 b c	0.09 \pm 0.02 b	0.07 \pm 0.02 a b
T ₉	1.18 \pm 0.04 a	0.15 \pm 0.03 b	0.01 \pm 0.01 a
T ₁₀	1.12 \pm 0.03 a	0.12 \pm 0.03 d	0.02 \pm 0.01 a

Se observó que a mayor dosis de tiamina hay menor coloración verde del follaje, por lo que se puede asumir que a mayor dosis de esta vitamina hay un efecto negativo en los procesos fotosintéticos. Los tratamientos T₃, T₄, T₉ y T₁₀ con dosis normal de tiamina mostraron una coloración mayor que los demás tratamientos.

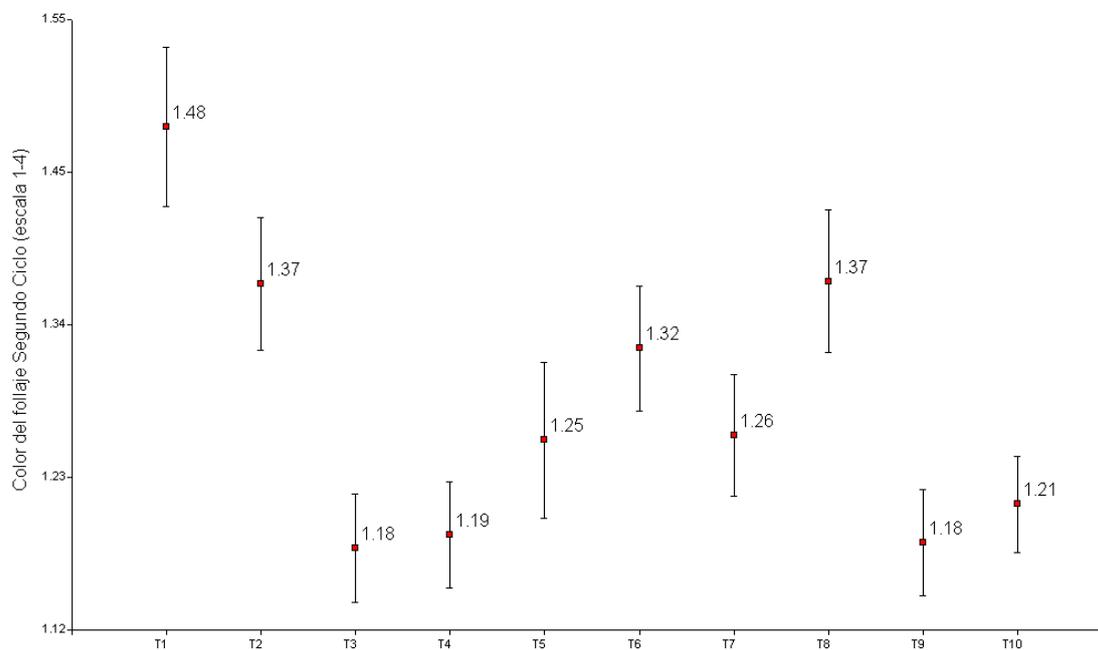


Gráfico 5.1.2.5.: Coloración del follaje de stevia (escala 1-4) según el tratamiento en el primer ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Al comparar los dos ciclos de propagación *in vitro* se determinó que el color de las plantas en el primer ciclo fue mayor en las fuentes apicales, mientras que en el segundo ciclo no hubo diferencias significativas en cuanto al color entre fuentes de propagación. Con respecto a la dosis de tiamina en el primer ciclo las dosis 0.0 ppm, 0.2 ppm y 0.4 ppm presentaron mayor coloración en tanto que en el segundo ciclo fueron las dosis 0.2 ppm, 0.4 ppm y 0.8 ppm las que presentaron mayor coloración verde. Al examinar el efecto de la kinetina se observó que en el primer ciclo no hubo diferencias significativas con respecto al color, mientras que en el segundo ciclo los tratamientos con kinetina mostraron mayor coloración.

Al analizar el porcentaje de fenolización de Stevia bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1,1476}=37.42$; $p<0.0001$), de la Dosis ($F_{3, 1476}=4.30$; $p=0.0049$), de Kinetina ($F_{1, 1476}=19.61$; $p<0.0001$) y de la interacción Fuente x Kinetina ($F_{1, 1476}=14.60$; $p=0.0001$). Al examinar las fuentes de propagación se determinó la fuente uninodal presentó menor fenolización que la fuente de propagación apical. La dosis de tiamina 0.8 ppm mostró el menor porcentaje de fenolización frente a las dosis 0.0 ppm, 0.2 ppm y 0.4 ppm que fueron las más fenolizadas. Al considerar el efecto de la Kinetina se observó que los tratamientos que la tenían obtuvieron menos fenolización que los tratamientos sin kinetina. Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que el tratamiento T₅ (fuente apical más 0.4 ppm de tiamina) tuvo la más alta fenolización, siendo el tratamiento de menor fenolización el T₁₀ (fuente uninodal más 0.4 ppm de tiamina y 10 ppm de kinetina).

Los tratamientos T₂, T₄, T₆, T₈ y T₁₀ con fuentes uninodales mostraron menor fenolización que los tratamientos de fuentes apicales de misma dosis, por lo que se

asume que la fuente de propagación apical tiende a presentar mayor fenolización que las fuentes uninodales (Gráfico 5.1.2.6.).

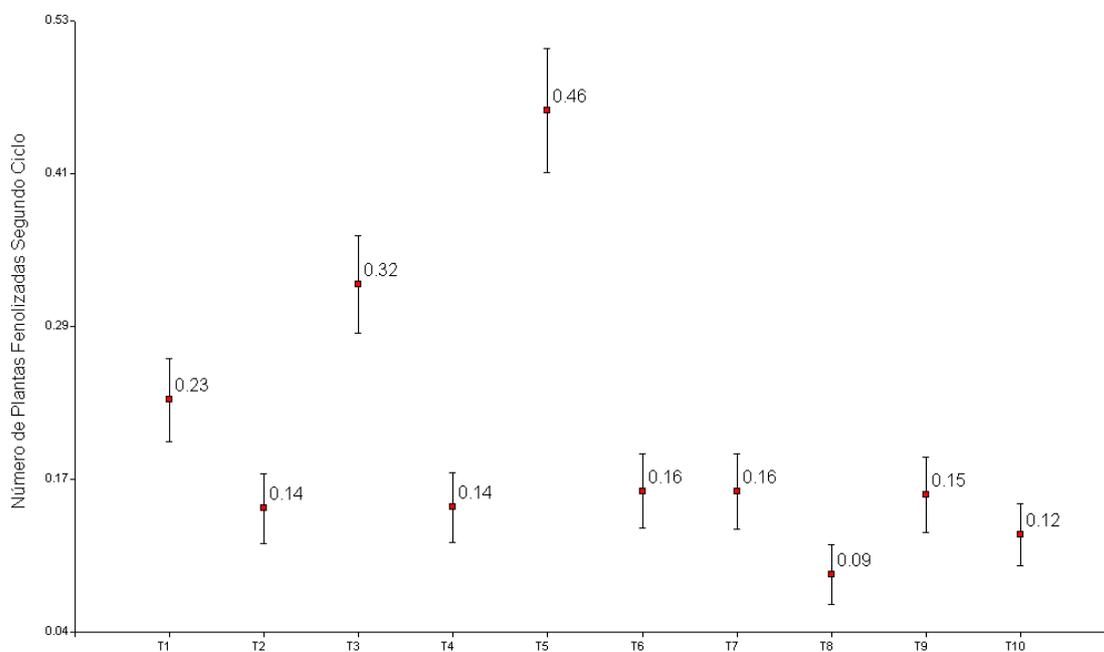


Gráfico 5.1.2.6.: Número de plantas fenolizadas según el tratamiento en el segundo ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Al comparar los dos ciclos de propagación *in vitro* se determinó que la fenolización en el primer ciclo no presentó diferencias significativas entre fuentes de propagación, mientras que en el segundo ciclo las fuentes uninodales fueron menos fenolizadas que las fuentes apicales. Con respecto a la dosis de tiamina en el primer ciclo la dosis 0.0 ppm presentó la menor fenolización y en el segundo ciclo la dosis 0.8 ppm fue la menos fenolizada. Al examinar el efecto de la kinetina se observó que en el primer ciclo de propagación no hubo diferencias significativas, mientras que en el segundo ciclo los tratamientos con kinetina mostraron menos fenolización.

Al analizar el porcentaje de enraizamiento de Stevia bajo el efecto de diferentes niveles de tiamina se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1,1476}=35.35$; $p<0.0001$), de la Dosis ($F_{3, 1476}=15.67$; $p<0.0001$), de Kinetina ($F_{1, 1476}=4.28$; $p=0.0387$) y de la interacción Fuente x Dosis ($F_{3, 1476}=15.95$; $p<0.0001$). Al examinar las fuentes de propagación se determinó que la fuente apical presentó mayor enraizamiento que la fuente de propagación uninodal. La dosis de tiamina 0.2 ppm mostró el mayor porcentaje de enraizamiento frente a las dosis 0.0 ppm y 0.4 ppm que fueron las menos enraizadas. Con respecto a la Kinetina se observó que los tratamientos que la tenían obtuvieron menos enraizamiento que los tratamientos sin kinetina. Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que el tratamiento T₃ (fuente apical sin tiamina) tuvo más alto enraizamiento, siendo los tratamientos de menor enraizamiento el T₂ (fuente uninodal sin tiamina), T₄ (fuente uninodal más 0.2 ppm de tiamina), T₆ (fuente uninodal más 0.4 ppm de tiamina), T₉ (fuente apical más 0.4 ppm de tiamina y 10 ppm de kinetina) y T₁₀ (fuente uninodal más 0.4 ppm de tiamina y 10 ppm de kinetina).

Los tratamientos T₉ y T₁₀ no muestran un efecto de la tiamina o la kinetina en cuanto al enraizamiento, por lo que se asume que estas sustancias combinadas no tienen efecto significativo para el enraizamiento de los explantes. El mayor enraizamiento lo presentó el tratamiento T₃, pero sin un efecto obvio de la tiamina con respecto al enraizamiento en ninguno de los tratamientos (Gráfico 5.1.2.7.).

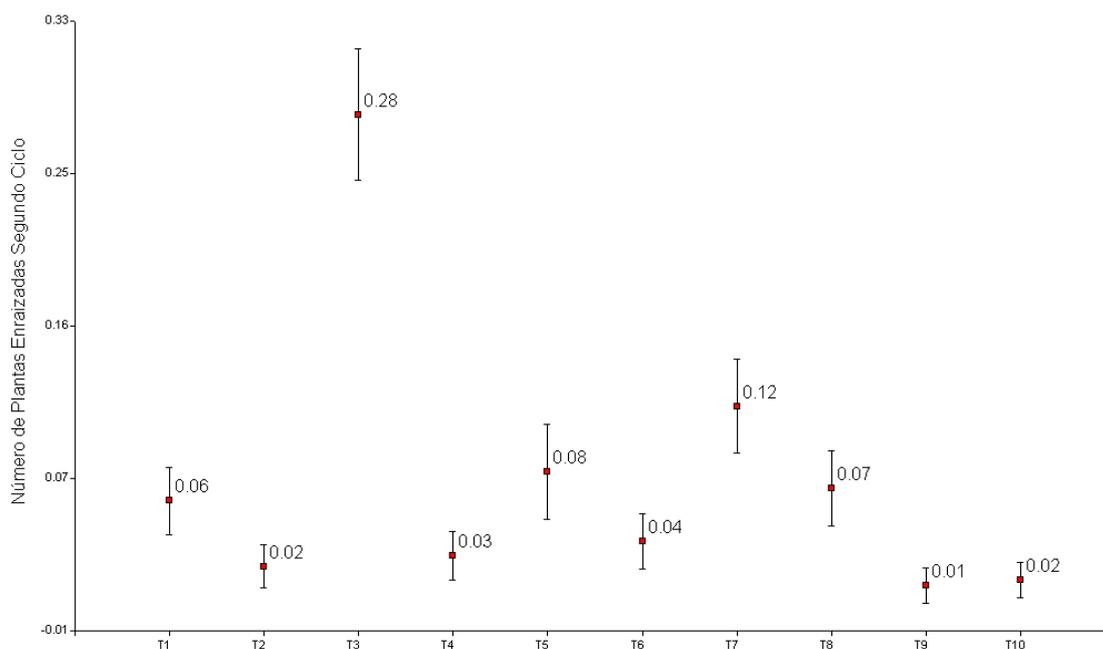


Gráfico 5.1.2.7.: Número de plantas enraizadas de stevia según el tratamiento en el segundo ciclo de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Al comparar los dos ciclos de propagación *in vitro* se determinó que el enraizamiento de las plantas en el primer ciclo no presentó diferencias significativas con respecto a la fuente de propagación, en tanto que en el segundo ciclo las fuentes apicales tuvieron mayor enraizamiento que las fuentes uninodales. Con respecto a la dosis de tiamina en ambos ciclos la dosis 0.20 ppm mostró mayor enraizamiento que las demás dosis. Al examinar el efecto de la kinetina se observó que en el primer ciclo de propagación no hubo diferencias significativas para el enraizamiento, mientras que en el segundo ciclo los tratamientos sin kinetina mostraron mejor enraizamiento.

5.2. Sustrato más adecuado dentro del Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH)

Al analizar la contaminación de micro estacas de Stevia bajo el efecto de diferentes sustratos en el sistema autotrófico hidropónico se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1, 569}=32.61$; $p<0.0001$), del Sustrato ($F_{1, 569}=17.41$; $p<0.0001$) y de la interacción Fuente x Sustrato ($F_{1, 569}=251.39$; $p<0.0001$) (Cuadro 5.2.1.).

Cuadro 5.2.1.: Análisis de Varianza para contaminación, prendimiento, altura, número de hojas y enraizamiento bajo el efecto de diferentes sustratos, IASA I, Ecuador, 2007.

	VARIABLE				
	Contaminación	Prendimiento	Altura	Hojas *	Enraizamiento *
Modelo	<0.0001	<0.0001	0.0648	<0.0001	<0.0001
Repetición	<0.0001	0.0001	0.5792	0.0005	0.9934
Fuente	<0.0001	<0.0001	0.1882	0.5065	0.0023
Sustrato	<0.0001	0.0004	0.4556	0.0187	0.0026
Fuente * sustrato	<0.0001	<0.0001	0.0057	<0.0001	<0.0001
CV	53.83	38.86	57.22		

* Prueba No Paramétrica

Al examinar las fuentes de propagación se determinó que la fuente apical presentó menor contaminación que la fuente de propagación uninodal (Cuadro 5.2.2.).

Cuadro 5.2.2.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura, hojas y enraizamiento bajo el efecto de 2 fuentes de propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Fuente	Contaminación	Prendimiento	Altura	Hojas	Enraizamiento
Apical	0.50 \pm 0.03 a	0.96 \pm 0.01 b	1.47 \pm 0.05 a	6.43 \pm 0.24 a	0.15 \pm 0.02 b
Uninodal	0.63 \pm 0.03 b	0.73 \pm 0.03 a	1.39 \pm 0.05 a	6.73 \pm 0.30 a	0.07 \pm 0.02 a

La fibra de coco mostró mayor contaminación frente al sustrato compuesto que fue el sustrato de menos contaminación (Cuadro 5.2.3.).

Cuadro 5.2.3.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura, hojas y enraizamiento bajo el efecto de 2 sustratos para propagación, IASA I, Ecuador, 2007.

Sustrato	Contaminación	Prendimiento	Altura	Hojas	Enraizamiento
F. Coco	0.63 \pm 0.03 b	0.80 \pm 0.02 a	1.40 \pm 0.05 a	6.10 \pm 0.27 a	0.16 \pm 0.02 b
S. Comp.	0.50 \pm 0.03 a	0.90 \pm 0.02 b	1.74 \pm 0.06 a	6.97 \pm 0.26 b	0.07 \pm 0.02 a

Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que el tratamiento T₃ (sustrato compuesto fuente apical) tuvo la contaminación más baja, siendo los tratamientos de mayor contaminación el T₁ (fibra de coco fuente apical) y T₄ (sustrato compuesto fuente uninodal) (Cuadro 5.2.4.).

Cuadro 5.2.4.: Promedio \pm error estándar de la contaminación, prendimiento, altura, hojas y enraizamiento bajo el efecto de los tratamientos, IASA I, Ecuador, 2007.

Tratamiento	Contaminación	Prendimiento	Altura	Hojas	Enraizamiento
T ₁	0.75 \pm 0.04 c	0.97 \pm 0.02 c	1.53 \pm 0.07 b	6.66 \pm 0.32 b	0.24 \pm 0.04 c
T ₂	0.50 \pm 0.04 b	0.63 \pm 0.04 a	1.20 \pm 0.05 a	5.23 \pm 0.44 a	0.03 \pm 0.02 b
T ₃	0.25 \pm 0.04 a	0.96 \pm 0.02 c	1.41 \pm 0.08 b	6.19 \pm 0.34 b	0.06 \pm 0.02 a
T ₄	0.75 \pm 0.04 c	0.83 \pm 0.03 b	1.53 \pm 0.08 b	7.88 \pm 0.38 b	0.09 \pm 0.03 c

Se observó un efecto significativo de la contaminación sobre el prendimiento y desarrollo de las plantas, ya que los hongos o los líquenes que se presentaron, compiten por luz, agua, espacio y nutrientes con plantas pequeñas sin raíz, lo cual perjudica el crecimiento y desarrollo de las plantitas. No hubo diferencias en cuanto a la contaminación entre fibra de coco y sustrato compuesto (Gráfico 5.2.1.).

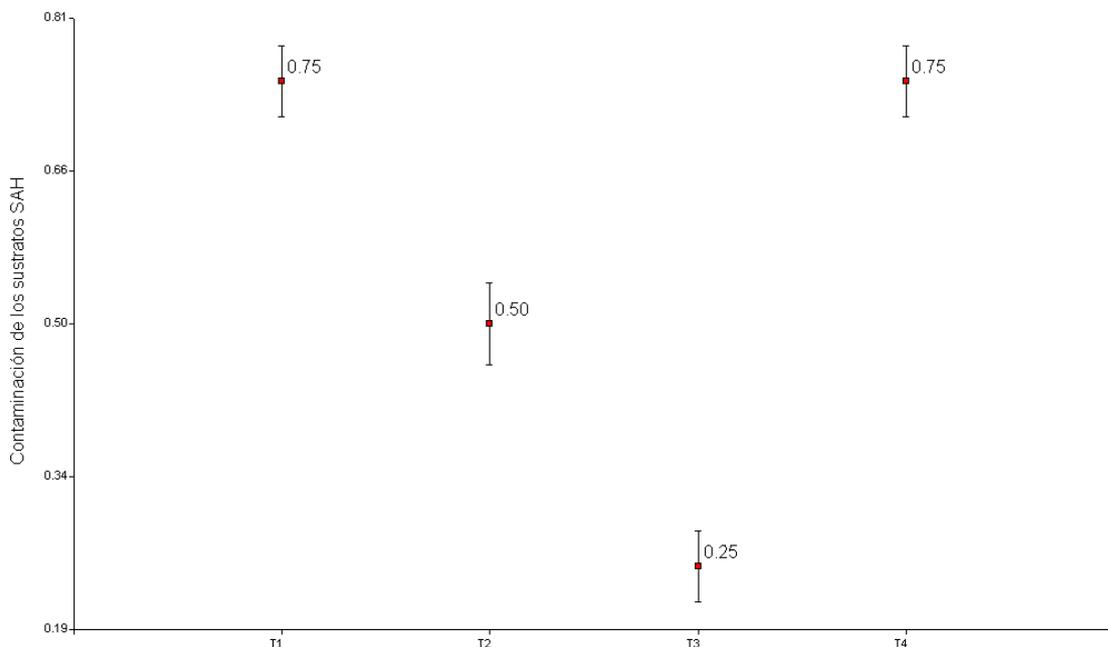


Gráfico 5.2.1.: Contaminación de los sustratos según el tratamiento, IASA I, Ecuador, 2007.

Al analizar el prendimiento de Stevia bajo el efecto de diferentes sustratos en el sistema autotrófico hidropónico se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1, 569}=68.58$; $p<0.0001$), del Sustrato ($F_{1, 569}=12.50$; $p=0.0004$) y de la interacción Fuente x Sustrato ($F_{1, 569}=15.38$; $p=0.0001$). Al examinar las fuentes de propagación se determinó que la fuente apical presentó menor prendimiento que la fuente de propagación uninodal. La fibra de coco mostró menor prendimiento frente al sustrato compuesto que fue el sustrato de más prendimiento. Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que el tratamiento T₂ (fibra de coco fuente uninodal) tuvo el prendimiento más bajo, siendo los tratamientos de mayor prendimiento el T₁ (fibra de coco fuente apical) y T₃ (sustrato compuesto fuente apical).

Se observó que los tratamientos T₁ y T₃ de fuentes de propagación apical presentaron un mayor prendimiento que los tratamientos T₂ y T₄ de fuente uninodal, por lo que se asume que las fuentes apicales de Stevia tienen mayor aptitud para resistir el cambio de *in vitro* a *ex vitro* y adaptarse. El mayor prendimiento lo tuvo el tratamiento T₁ de fuente apical y en fibra de coco (Gráfico 5.2.2.).

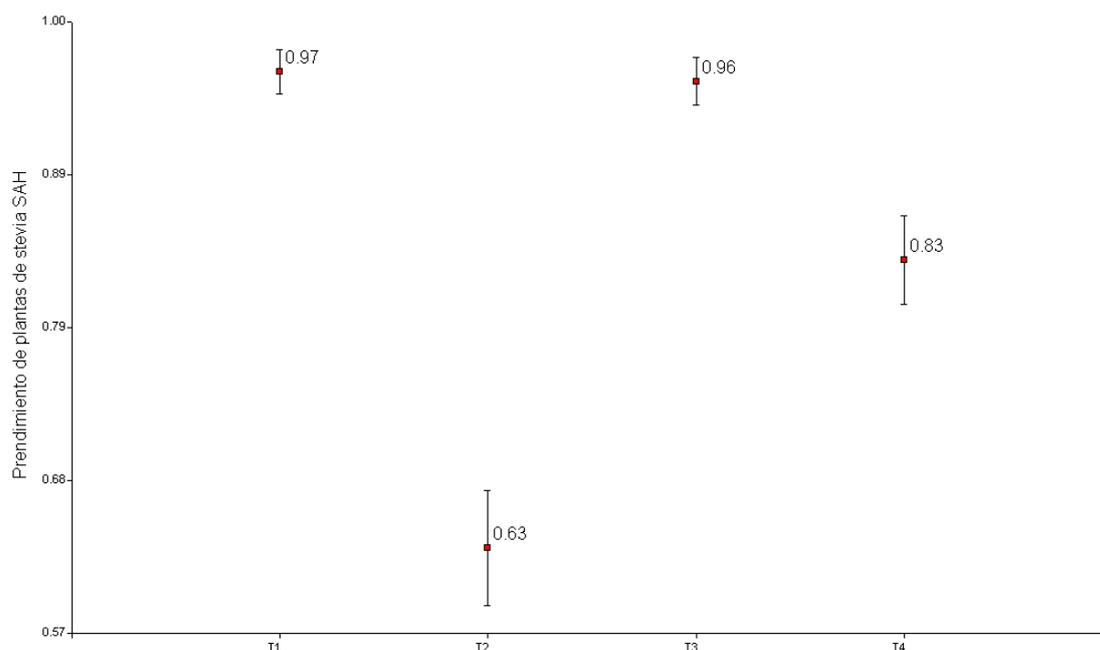


Gráfico 5.2.2.: Prendimiento de plantas de stevia en el SAH, IASA I, Ecuador, 2007.

Al analizar la altura de Stevia bajo el efecto de diferentes sustratos en el sistema autotrófico hidropónico se encontró un efecto significativo de la interacción Fuente x Sustrato ($F_{1, 481}=7.71$; $p=0.0057$). Al examinar las fuentes de propagación no se encontró diferencias significativas entre apicales y uninodales en cuanto a la altura. La fibra de coco y el sustrato compuesto no mostraron diferencias significativas en cuanto a la altura de planta. Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que el tratamiento T₂ (fibra de coco fuente uninodal) tuvo la altura más baja, siendo los tratamientos de mayor altura el T₁ (fibra de coco fuente apical), T₃ (sustrato compuesto fuente apical) , y T₄ (sustrato compuesto fuente uninodal).

El tratamiento T₁ de fuente apical presentó mayor altura que la fuente uninodal del T₂. El tratamiento T₃ presentó menor altura que el T₄, por lo que se asume que las fuentes apicales se adaptan mejor a la fibra de coco y las fuentes uninodales al sustrato compuesto (Gráfico 5.2.3.).

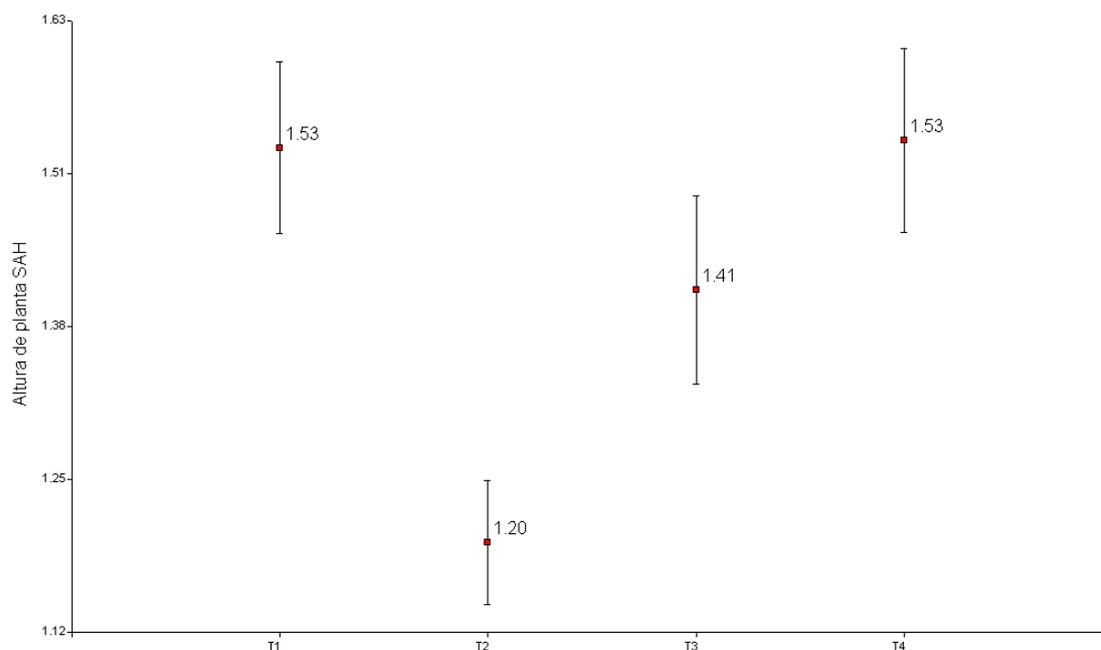


Gráfico 5.2.3.: Altura de plantas de stevia según el tratamiento en el SAH, IASA I, Ecuador, 2007.

En el sistema autotrófico hidropónico se pueden obtener plantas de papa (*Solanum* sp.) de 2 a 3.5 cm de alto en sólo 15 días (Benítez et. al., 2002).

Al analizar el número de hojas de Stevia bajo el efecto de diferentes sustratos en el sistema autotrófico hidropónico se encontró un efecto significativo del Sustrato ($F_{1, 481}=5.56$; $p=0.0187$) y de la interacción Fuente x Sustrato ($F_{1, 481}=21.65$; $p<0.0001$). Al examinar las fuentes de propagación no se encontró diferencias significativas entre apicales y uninodales en cuanto al número de hojas. La fibra de coco mostró menor número de hojas frente al sustrato compuesto que fue el sustrato de más número de hojas. Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que el tratamiento T₂ (fibra de coco fuente uninodal) tuvo el menor número de hojas, siendo los tratamientos de mayor número de hojas el T₁ (fibra de coco fuente apical), T₃ (sustrato compuesto fuente apical) y T₄ (sustrato compuesto fuente uninodal).

El tratamiento T₁ de fuente apical presentó el mayor número de hojas en fibra de coco junto con el tratamiento T₄ de fuente uninodal en sustrato de compuesto. Se asume que las fuentes apicales se adaptan mejor a la fibra de coco y pueden desarrollar más hojas, en tanto que las fuentes uninodales se adaptaron mejor al sustrato compuesto y se desarrolló mejor. También el número de hojas de la fuente uninodal fue mayor debido a que se formó más de un brote por planta (Gráfico 5.2.4.).

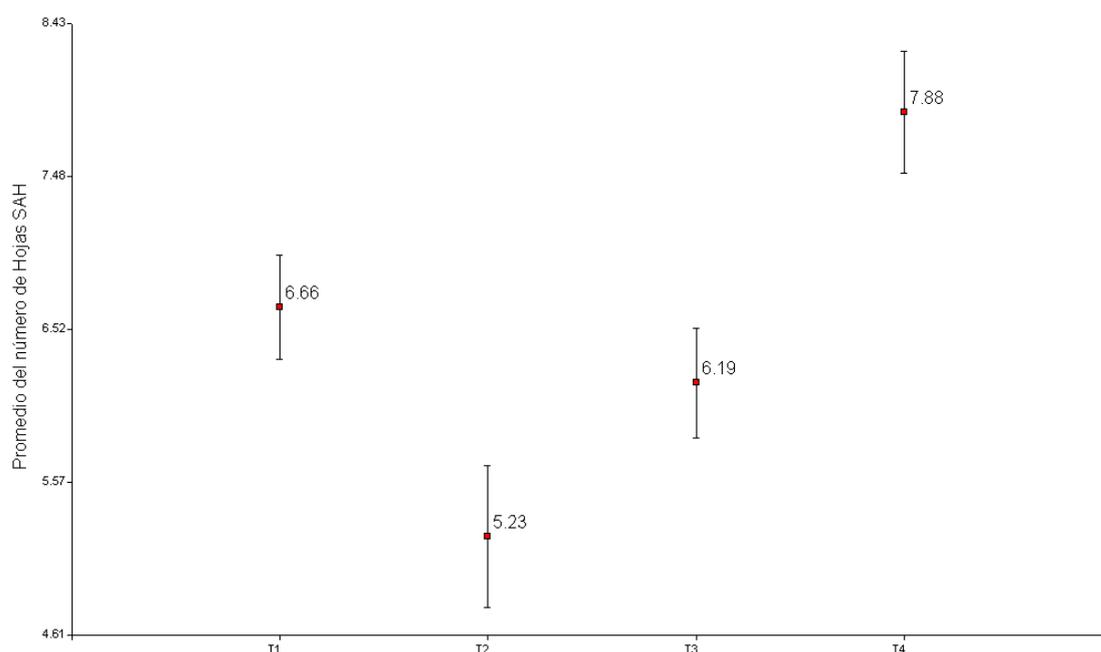


Gráfico 5.2.4.: Promedio del número de hojas según el tratamiento en el SAH, IASA I, Ecuador, 2007.

Al analizar el enraizamiento de Stevia bajo el efecto de diferentes sustratos en el sistema autotrófico hidropónico se encontró un efecto significativo de la Fuente ($F_{1, 482}=9.38$; $p=0.0023$), del Sustrato ($F_{1, 482}=9.16$; $p=0.0026$) y de la interacción Fuente x Sustrato ($F_{1, 482}=17.78$; $p<0.0001$). Al examinar las fuentes de propagación se determinó que la fuente apical presentó mayor enraizamiento que la fuente uninodal. La fibra de coco mostró mayor enraizamiento frente al sustrato compuesto que fue el sustrato de menos enraizamiento. Al comparar los diferentes tratamientos se determinó que el tratamiento

T₁ (fibra de coco fuente apical) tuvo el mayor número de hojas, siendo los tratamientos de menor número de hojas el T₂ (fibra de coco fuente uninodal), T₃ (sustrato compuesto fuente apical) y T₄ (sustrato compuesto fuente uninodal).

El mayor enraizamiento se presentó en el T₁ de fuente apical y fibra de coco, por lo que se asume que este sustrato tiene condiciones favorables para el prendimiento y posterior enraizamiento de micro estacas de origen apical. Los demás tratamientos no presentan un efecto significativo con respecto al enraizamiento, aunque pudo influenciar el tiempo de evaluación, ya que casi siempre las fuentes de propagación apical se adaptan y crecen más rápido, dejando en desventaja a los demás tratamientos (Gráfico 5.2.5.).

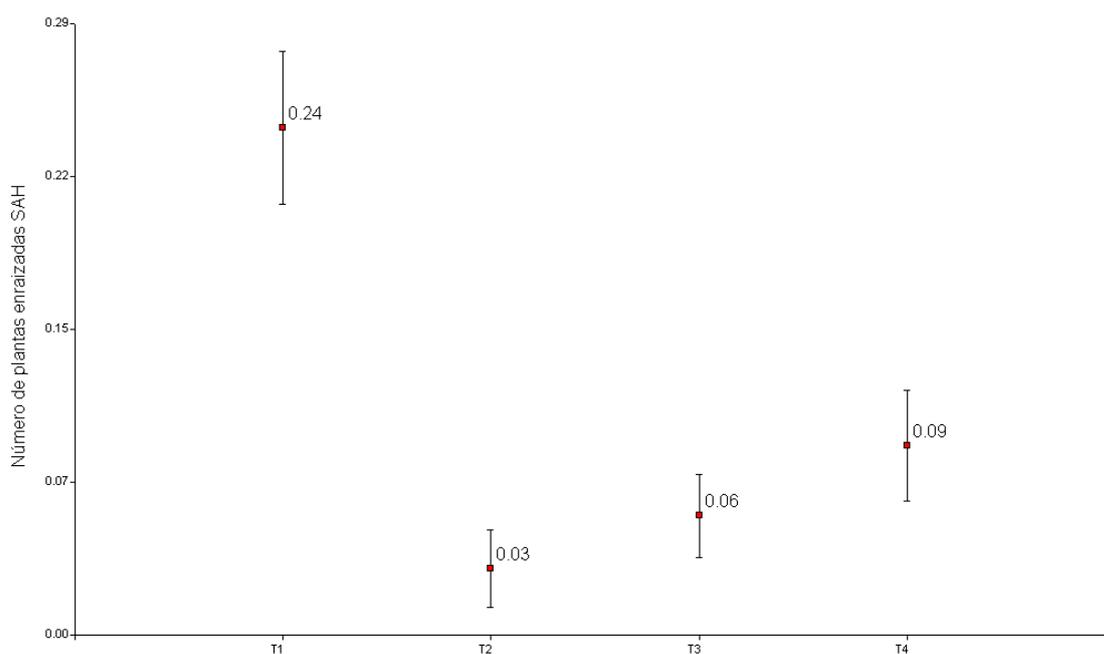


Gráfico 5.2.5.: Número de plantas enraizadas según el tratamiento en el SAH, IASA I, Ecuador, 2007.

Según Rigato (2003) las plantas de papa (*Solanum* sp.) bajo el sistema SAH pueden producir hasta 10.000 nuevas plantas a partir de 100 tubos *in vitro* en un mes, en tanto

que en el método tradicional se demora 3 meses en obtener el mismo número de plantas nuevas.

5.3. Porcentaje de prendimiento de las plantas bajo condiciones de invernadero

Al analizar el porcentaje de prendimiento de las plantas bajo condiciones de invernadero se encontró que las plantas obtenidas en condiciones de laboratorio tienen alta capacidad de adaptación a las condiciones de campo mostrando 100 % de prendimiento.

Nepovim (1998) asevera que el proceso de cultivo de los brotes múltiples de Stevia en un bioreactor y la transferencia a condiciones *ex vitro* toma de 8 a 9 semanas y se puede producir aproximadamente 600 nuevas plantitas, que pueden ser transplantadas del invernadero a condiciones de campo.

5.4. Extracción y cuantificación de esteviósido

Según el laboratorio ANAGALIDE las hojas del IASA I presentaron un estado muy bueno de secado y conservación. Los cromatogramas fueron obtenidos con el detector UV (210 nm) (línea roja) y con el detector ELSD (Evaporative Light Scattering Detector)(línea verde). Los contenidos de Esteviósido y Rebaudiósido A son de 0,97 % y 5,23 % respectivamente (Gráfico 5.4.1.)

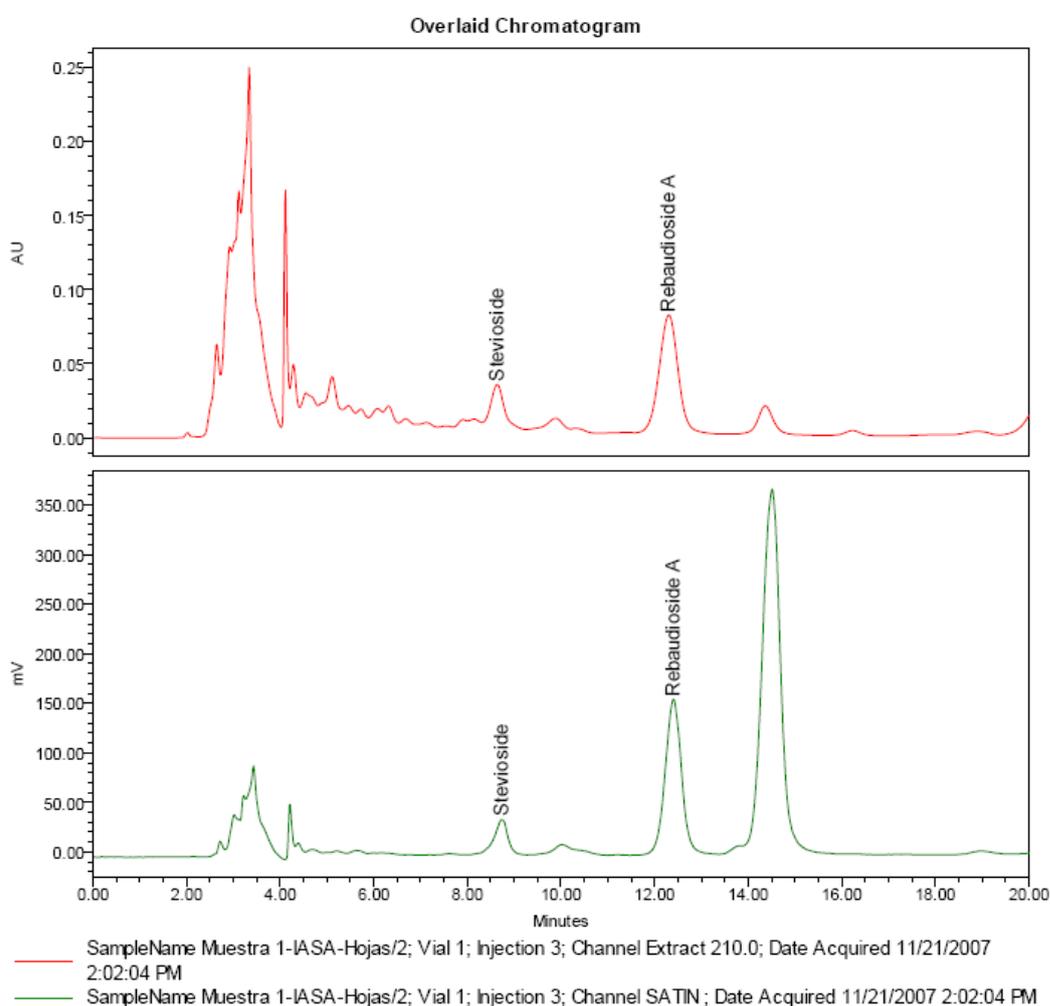


Gráfico 5.4.1.: Cromatogramas de hojas de Stevia del IASA I hechos con detector UV (línea roja) y detector ELSD (línea verde), Laboratorios ANAGALIDE, España, 2007.

El contenido total de glucósidos fue alrededor de la mitad de lo esperado. Los contenidos de Esteviósido y Rebaudiósido A fueron de 0,97 % y 5,23 %

respectivamente. El Rebaudiósido C fue el pico más grande después del Esteviósido y el Rebaudiósido A. La relación Esteviósido - Rebaudiósido A fue muy buena.

Se asume que los resultados obtenidos fueron influenciados por la corta edad de la planta y las condiciones extremas del invernadero, ya que la planta gasta más energía en sobrevivir y adaptarse que en producir azúcar. Además es más fácil para la planta producir las biomoléculas más simples a edad temprana, para luego en la adultez, sintetizar moléculas más complejas como el esteviósido (Com. Pers. Rueda, D.).

La determinación cuantitativa del esteviósido hecha con hojas secas de plantas de 16 lugares diferentes del este de Paraguay, usando el método analítico ELSD, mostró que los niveles medios de esteviósido variaron de 43.6 a 98.9 g kg⁻¹ (4.36 % y 9.89 % respectivamente). Los resultados indicaron que los factores ambientales y agronómicos tienen más influencia en la producción de esteviósido que el hábito de crecimiento (Tateo, 1999).

Al comparar diferentes sistemas de propagación Tamura (1984) confirma que la propagación clonal de Stevia por brotes apicales es una método efectivo de obtener una población de plantas uniformes para la producción de glucósidos diterpenos dulces. El esteviósido es el glucósido más abundantemente producido (Duke, 1993).

En plantas no mejoradas los componentes edulcorantes de las hojas de Stevia, esteviósido y rebaudiósido A, alcanzan entre un 6 a 8 % y 2 a 3 % respectivamente (Galperin de Levy, 1982). Shock (1982) afirma que de los ocho glucósidos producidos por la planta, el esteviósido es el glucósido más abundante. En la selección de 28

ecotipos de Stevia hecha por Mitsuhashi (1975), se determinó que el contenido de esteviósido varió entre el 2,07 y 18,34 %.

En la comparación de distintos métodos de propagación y el contenido de glucósidos de Stevia (Tamura, 1984) se encontró que las plantas propagadas asexualmente *in vitro*, son muy uniformes en crecimiento y calidad química. El rendimiento total de glucósidos de las hojas secas fue del 10.0 al 12.9 %. El rendimiento del esteviósido fue de 4.4 a 5.7 % y el de rebaudiósido A fue de 4.1 a 5.9 %. El contenido de rebaudiósido C fue del 1 % para todos los casos.

En los trabajos de propagación clonal hechos por Tamura (1984) se menciona que las plantas de Stevia propagadas por semillas generalmente muestran una gran variación en el contenido de esteviósido en hojas secas, que va del 5 al 15 %.

Según Soto (2002), que describe el proceso extracción de los principios edulcorantes de Stevia, es decir de glucósidos totales, se puede obtener un rendimiento de alrededor del 5 % sobre la base de las hojas secas en forma de un producto cristalino.

Bondarev (2000) determina diferencias de producción de glucósidos en plantas intactas, plantas *in vitro*, callos no diferenciados y cultivos en suspensión, callos morfogenéticos y brotes regenerados. La composición cualitativa de glucósidos en plantas *in vitro* es idéntica al de plantas intactas, pero el contenido en las plantas *ex vitro* parecieron ser cinco o seis veces menor. Los cultivos celulares no diferenciados, como los callos y las suspensiones celulares, mostraron que sintetizan cantidades menores de glucósidos, y su contenido varía grandemente durante el ciclo de crecimiento del cultivo. La

composición cualitativa de glucósidos en los cultivos celulares es altamente escasa en comparación con las plantas donadoras.

5.5. Carga genética de las plantas de *Stevia*

Al analizar el material genético de las plantas de *Stevia* del IASA I a partir del meristema radicular se encontró que las células somáticas observadas son diploides, $2n = 22$ cromosomas (Anexo 12). El estudio de células meióticas del tejido floral mostró que los cromosomas son $n = 11$ cromosomas (Anexo 13).

Según su forma los cromosomas de *Stevia* del IASA I se clasifican en seis pares metacéntricos, cuatro pares submetacéntricos y un par acrocéntrico. Según el tamaño de los cromosomas los pares metacéntricos se subdividen en cuatro pares grandes y dos pares medianos. Los pares submetacéntricos se dividen en tres pares grandes y un par mediano. El único par acrocéntrico es pequeño (Gráfico 5.5.1.).

Cariotipo de *Stevia* sp.

$2n = 22$ cromosomas
 $n = 11$ cromosomas

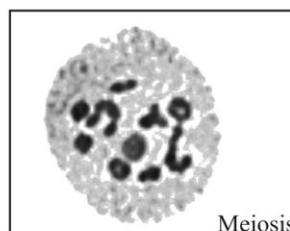
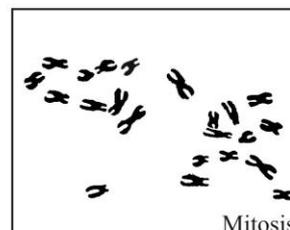
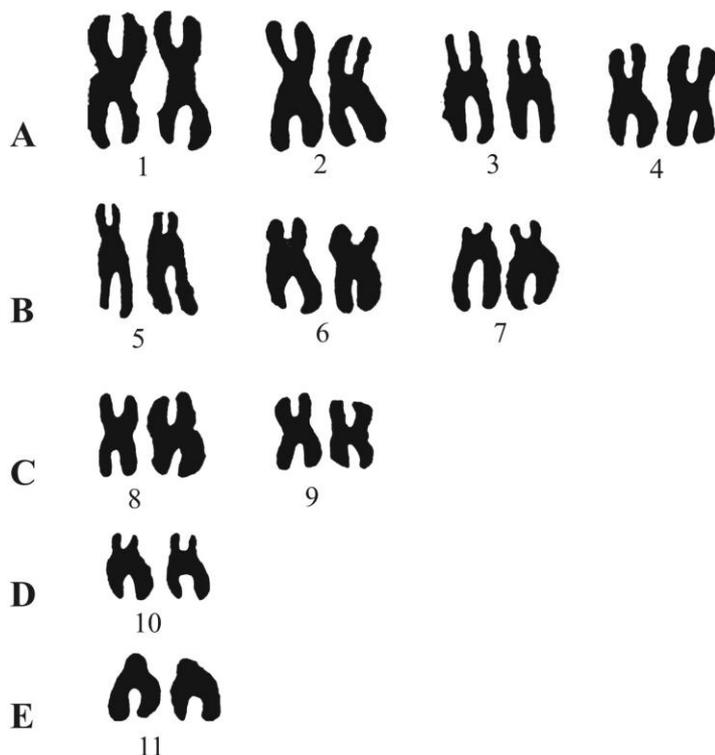


Gráfico 5.5.1.: Cariotipo de *Stevia rebaudiana* Bertoni, IASA I, Ecuador, 2007.

El género *Stevia* muestra gran variación en el número cromosómico. La mayoría de los reportes indican valores de $n = 11$ y $2n = 22$, pero también se han observado valores de $2n = 24, 33, 34, 44, 48, 66$ y 70 (Darlington y Wylie, 1955; Bolkhoviskikh *et al.*, 1969; Moore, 1973, 1974, 1977; Golblatt, 1981, 1984, 1985, 1988; Goldblatt and Jonson, 1990, 1991, 1996, 1998).

En observaciones citológicas hechas por Tamura (1984) a partir de material radicular en la propagación clonal de *Stevia* se mostró que éstas tenían el número normal de cromosomas $2n = 22$. En estudios cromosómicos y morfológicos hechos por Oliveira (2004), Frederico *et al.* (1996) y Monteiro (1980, 1982) se reportó nuevamente $2n = 22$.

Oliveira (2004) además de células normales, reporta células triploides $2n = 33$ ($3n$) y tetraploides $2n = 44$ ($4n$). La inducción de la poliploidía para mejorar los cultivos es un proceso comúnmente usado en plantas de interés económico (Allard, 1960). Este proceso se ha realizado en cultivos como café (Cruz *et al.*, 1993) y naranja (Romero y Aranda *et al.*, 1997).

Frederico *et al.* (1996) indica que los cariotipos de seis especies brasileñas de *Stevia* fueron muy similares en número y forma. La mayoría de cromosomas fueron metacéntricos con un número variable de submetacéntricos. Solamente *Stevia ophryophylla* y *Stevia rebaudiana* tienen un par de cromosomas acrocéntricos.

5.6.2. Costos de los tratamientos de la fase *ex vitro* 1, Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH).

Cuadro 5.6.2.1.: Costos de la fase de producción *ex vitro* 1 de todos los tratamientos (costo por planta, por tratamientos y costo promedio), IASA I, Ecuador, 2007.

Costos por Tratamiento Fase SAH						
Tratamientos			T1 Y T2		T3 Y T4	
Insumo	Unidad	Costo/unidad	Cantidad	Costo Total	Costo/unidad	Costo Total
Agua Destilada	cc	0.0005	360	0.1800	0.0005	0.1800
Fibra de Coco	g	0.0025	320	0.8152	0.0010	0.3200
Fertilizante	g	0.0020	1.8	0.0036	0.0020	0.0036
Explantes	explantes	0.0460	72	3.3128	0.0460	3.3128
Mano de Obra	hora	1.0625	0.8	0.8500	1.0625	0.8500
SUBTOTAL				5.1617		4.6664
Otros (20%)				1.0323		0.9333
				6.1940		5.5997
				Costo/Planta 0.086028		0.077774
				Costo X 0.081901		

5.6.3. Costos de los tratamientos de la fase *ex vitro* 2, Micro invernadero y plantas para venta.

Cuadro 5.6.3.1.: Costos de la fase de producción *ex vitro* 2 (costo por planta y por bandeja), IASA I, Ecuador, 2007.

Costos por Bandeja Fase Ex vitro				
Insumo	Cantidad	Unidad	Costo/unidad	Costo Total USD
Agua	1500	cc	0.0005	0.7500
Fertilizante	7.5	g	0.0020	0.0150
Plástico Transparente	2	m	0.2158	0.4315
Explante	38	plantas	0.0819	3.1122
Fibra de Coco	950	g	0.0025	2.3750
Mano de Obra	0.33	hora	1.0625	0.3506
SUBTOTAL				7.0344
Otros (20%)				1.4069
TOTAL				8.4413
				Costo/Planta 0.222138

VI. CONCLUSIONES

El nivel óptimo de tiamina para la propagación *in vitro* de stevia fue de 0.4 ppm, ya que favoreció el prendimiento, color, número de hojas y menor fenolización.

Plantas de stevia más vigorosas y con más brotes se lograron con la dosis 0.4 ppm de tiamina más 10 ppm de kinetina (T₉ y T₁₀).

Dentro del Sistema Autotrófico Hidropónico el mejor sustrato fue la fibra de coco por sus características físicas de buen aireamiento y retención de humedad que favorecen el prendimiento y la formación de raíces en micro estacas de stevia en 15 días.

El prendimiento de las plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni micro propagadas fue del 100 % en condiciones de invernadero mostrando alta capacidad de adaptación en condiciones de campo.

El contenido total de glucósidos en plantas jóvenes de *Stevia rebaudiana* Bertoni fue bajo en comparación con plantas adultas. Los contenidos de Esteviósido y Rebaudiósido A fueron de 0,97 % y 5,23 % respectivamente. El Rebaudiósido C fue el pico más grande después del Esteviósido y el Rebaudiósido A.

El análisis genético de *Stevia rebaudiana* Bertoni en su tejido somático presentó $2n = 22$ cromosomas y $n = 11$ cromosomas en el tejido sexual.

El costo de producción de una planta de stevia en los laboratorios del IASA I es de 0.22 dólares.

VII. RECOMENDACIONES

Es recomendable usar la dosis de 0.4 ppm de tiamina en la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Para producir plantas vigorosas *in vitro* y en gran número se recomienda usar kinetina en los medios de cultivo.

Por sus excelentes características físicas, se recomienda usar fibra de coco para propagar plantas de stevia. Así mismo para la fase del SAH se sugiere el uso de fuentes de propagación apical, por su rápido crecimiento y enraizamiento sin el uso de hormonas.

Se recomienda realizar la cuantificación de los glucósidos de las plantas de stevia adultas, para determinar la calidad de las mismas en la época propicia de la cosecha, esto es antes de la floración.

Es recomendable realizar estudios moleculares de Stevia para determinar los genes que permiten obtener mejor calidad y cantidad de glucósidos.

Para propagación a nivel comercial se recomienda la combinación de los métodos *in vitro* y *ex vitro*, ya que por su costo es un proceso competitivo en el mercado nacional y una opción viable para empresas interesadas en propagar esta especie en particular.

Es recomendable ampliar los estudios en *Stevia rebaudiana* Bertoni no solamente en nuevas alternativas de propagación, sino también en la producción, cosecha y poscosecha.

VIII. RESUMEN

Stevia rebaudiana Bertoni, planta originaria del Paraguay, fue usada ancestralmente por sus aborígenes como edulcorante y medicina. La sustancia dulce se denomina esteviósido y se encuentra en todo el vegetal. La propagación sexual de *Stevia* no es recomendable por la heterogeneidad de la floración y las plantas resultantes de este método (semillas de bajo poder germinativo). Este estudio buscó definir el nivel óptimo de Tiamina en medios *in vitro*, el mejor sustrato dentro del Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH), el prendimiento de las plantas en invernadero, extraer y cuantificar el esteviósido, determinar el cariotipo de *Stevia* y establecer los costos del Sistema de Propagación. Los explantes del estudio se obtuvieron del laboratorio de cultivos *in vitro* de la Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA I). Para determinar el nivel óptimo de tiamina, los explantes fueron sembrados en M&S, suplementado con 20 g de sucrosa, 2,5 g de agar y con un pH ajustado de 5.6. Los factores del estudio fueron: la fuente de propagación, la dosis de tiamina y la presencia o ausencia de kinetina. Las dosis de tiamina usadas fueron 0.0, 0.2, 0.4 y 0.8 ppm. La propagación *in vitro* se realizó separando las fuentes Uninodales y Apicales. El nivel óptimo de tiamina para la propagación *in vitro* de *stevia* fue de 0.4 ppm, y el medio que tuvo el efecto más favorable fue el de tiamina 0.4 ppm más kinetina 10 ppm (T₉ y T₁₀) ya que produjo plantas vigorosas y con muchos brotes rápidamente. Las dos fuentes de propagación responden bien a la propagación *in vitro*: fuente apical de crecimiento rápido con brote individual y fuente uninodal de crecimiento lento con dos o más brotes. Las plantas para el SAH fueron obtenidas de la fase *in vitro*. Las fuentes de propagación se separaron según su origen y se sembraron en los diferentes contenedores plásticos. El sustrato se humedeció con solución hidropónica formulada a partir del análisis foliar. Las plantas

enraizadas se sembraron individualmente en un micro invernadero. Dentro del Sistema Autotrófico Hidropónico el sustrato de fibra de coco probó favorecer el prendimiento y la formación de raíces en micro estacas de stevia. Luego las plantas se sacaron paulatinamente a las condiciones del invernadero. El prendimiento de las plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni obtenidas en condiciones de laboratorio fue de un 100 % en condiciones de invernadero mostrando alta capacidad de adaptación a condiciones de campo. Se enviaron 200 gr de hojas secas de plantas del invernadero al laboratorio ANAGALIDE (Huesca-España), que fueron analizadas con detector UV (210 nm) y detector ELSD. Los contenidos de Esteviósido y Rebaudiósido A fueron de 0,97 % y 5,23 % respectivamente. La relación Esteviósido - Rebaudiósido A fue muy buena. Se aplicó el protocolo propuesto por el Centro de Investigación de la Papa (CIP), en plantas de stevia, para buscar cromosomas aptos para fotografiarlos y el posterior armado del cariotipo. Las células somáticas de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni del IASA I fueron diploides, $2n = 22$ cromosomas y las células meióticas del tejido floral fueron $n = 11$. El costo de producción de una planta de stevia en los laboratorios del IASA I es de 0.22 dólares.

IX. SUMMARY

Stevia rebaudiana Bertonii is Paraguayan native plant and was traditionally used as sweetener and medicine for its Aboriginal. The sweet substance is called stevioside and it's found throughout the plant. The sexual propagation of *Stevia* is not recommended because the heterogeneity of flowering and resulting plants from this method (low seed germination). This research wanted to define the optimal *in vitro*'s Thiamine media level, the best substrate using Autotrofical Hydroponic System (SAH), the plants' survival at greenhouse, extract and quantify stevioside, determine the karyotype of *Stevia* and establish the cost of this Propagation System. The explants of the study were obtained from Facultad de Ciencias Agropecuarias's labs (IASA I). For determine the optimal level of thiamine, the explants were planted in M&S, supplemented with 20 g of sucrose, 2.5 g of agar and ph 5.6. The factors of this research were: the source of propagation, the dose of thiamin and the presence or absence of kinetine. The doses of thiamine used were 0.0, 0.2, 0.4 and 0.8 ppm. The *in vitro* propagation were made by separating propagation sources. The optimal level of thiamine for *in vitro*'s propagation of stevia was 0.4 ppm, and the medium that had the best effect was thiamine 0.4 ppm with kinetine 10 ppm (T₉ and T₁₀) because produced vigorous plants and many shoots quickly. The two sources respond well to *in vitro*'s propagation: apical source with fast-growing but only one shoot and uninodal source of slow growth with two or more shoots. SAH's plants were obtained from the *in vitro* phase. The propagation sources were separated according to their origin and were planted in different plastic containers. The substrate was irrigated with a hydroponic solution made from the leaves analysis. The rooted plants were sown individually at a micro-greenhouse. The tested coconut fiber's substrate showed good survival and strong root formation in stevia's micro-

explants. After, the plants were removed gradually to the greenhouse conditions. The survival of stevia's plants obtained into lab's conditions was 100% at greenhouse conditions, showing high capacity to adapt to the field conditions. It sent 200 g of dried leaves of greenhouse's plants to ANAGALIDE's labs (Huesca, Spain), which were analyzed with UV detection (210 nm) and ELSD detector. Stevioside and Rebaudioside A level's were 0.97% and 5.23% respectively. The stevioside – rebaudioside A's balance was very good. We used the protocol proposed by Centro Internacional de la Papa (CIP) to find chromosomes to photograph and then make karyotype. Somatic cells of IASA's stevia plants were diploid, $2n = 22$ and meiotic chromosomes of floral tissue were $n = 11$. The production cost of a stevia plant at IASA's lab was 0,22 dollars.

X. BIBLIOGRAFÍA

- ACP (Asociación Camino al Progreso). Baquero, J. 2005. Informe Agronómico Sobre el cultivo de *Stevia Rebaudiana*: Yerba Dulce. Putumayo, CO. 8 p.
- Allard, RW. 1996. Principles of Plant Breeding. Jhon Wiley & Sons, Inc., New York, 485 pp.
- Albany, N. Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. 2006. Revista de la Facultad de Agronomía-LUZ v.23 n.2 Maracaibo, Ve.
- Ayerbe, L. 1990. Cultivo *In vitro* de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, ES. Pp.: 66-67, 98-99, 112-117, 128-133.
- Audesirk, T.; Audesirk, G. 1997. Biología, La vida en la Tierra. 4a. Ed. Denver, EEUU. Pp.: 161-169.
- Bidwell, R. 1993. Fisiología Vegetal. Ed. AGT editor. 1era Edición. México D. F., MX. Pp.: 120-121, 181-185.
- Bolkhoviskikh Z, Grif V, Matvejeva T and Zakharyeva HV. 1969. Chromosome number of flowering plants. VL Komarov Botanical Institute, Academy of Sciences of the USSR, Moscou, 926 pp.

- Bondarev, N.; Reshetnyak, O.; Nosov, A. 2000. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya 35, Moscow, RUS.
- Bridg, H. 2001. Micropropagation and determination of the *in vitro* stability of *Annona cherimola* Mill. and *Annona muricata* L. Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät. Berlin, Al.
- Brucher, H. 1974. Paraguay "Substoff" – Pflanze *Stevia rebaudiana* Bert. Naturw. Rdsch. 6:231-233.
- Calvo, M. Bioquímica de los Alimentos: Clorofila. Consultado 23 dic 2007. Disponible en: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/programasbio.html>
- Campos, D. 2005. Industrialización de la Estevia. Instituto de Biotecnología - Universidad La Molina. Lima, PE. 15 p.
- C.C.N. (Central Cooperativa Nacional), LTDAS "Credicoop" Proyecto de Producción de Ka´a He´e (Yerba Dulce). 1980. Asunción, Paraguay
- CEPAL. 2005. Sobre el TLC: "El sector agropecuario del Ecuador pierde en todos los escenarios". (en línea). Quito, EC. Consultado 26 abr. 2005. Disponible en http://www.bilaterals.org/article-print.php3?id_article=1533

- Chan P, Tomlinson B, Chen YJ, *et al.* 2000. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *Br J Clin Pharmacol* . pp.: 215 - 220.
- Cruz ND, Boaventura MS, Conagin CHTM, Dutilh JHA, Forni-Martins ER, Medina DM, Mendes AJT, Pierozzi NI and Pinto-Maglio CAF. 1993. Cinquenta e Três Anos de Pesquisa em Citogenética Vegetal. Documents IAC, n. 27. 60 pp.
- Cuellar, J. 1996. Propagación vegetativa *in vitro* a partir de hojas jóvenes de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). *AGRONOMIA MESOAMERICANA* 8(1): 74-80.
- Darlington C and Wylie AP. 1955. *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. 2nd edition. George Allen and Unwin Ltd., London, 519 pp.
- Darlington, C. D. y La Cour. 1969. *The Handling of Chromosomes*.
- De Vargas, Roger. 1980. Informe sobre viaje al Japón para observar la producción, comercialización e industrialización de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni. Asunción.
- Devlin, R. 1975. *Plant Physiology*. 3ra. Ed. New York, EU. Pp.: 451.

- Felipe, G.M. 1977. *Stevia rebaudiana* Bert.: uma revisao. *Ciencia e Cultura* 29 (11) 1240-1248. II Seminario Brasileiro sobre *Stevia rebaudiana* (Bert.). Bertoni Resumos ITAL Campinas 9/82. Instituto de Tecnología de Alimentos, Sao Paulo.
- Frederico AP, Ruas PM, Marin-Morales MA, Ruas CF and Nakajima JN. 1996. Chromosome studies in some *Stevia* Cav. (Compositae) species from southern Brazil. *Rev Bras Genet* 19:605-609.
- Galperin de Levy, R. 1982. *Stevia rebaudiana* Bertoni. Extracción, purificación y empleo del steviósido. *Anales de SAIPA*, Vol. 4, 45:572, 150 pp.
- Gattoni, Luis A. 1945. Caa-Jhee A wild shrub native to Paraguay (*Stevia rebaudiana* Bert.) September. Typed Material. STICA, Paraguay.
- Gispert, C. *Diccionario Enciclopédico Éxito*. 1979. Ediciones Océano-Éxito S.A. Barcelona, ES. Tomo 1, 3.
- Gispert, C. *Enciclopedia Práctica de la Agricultura y Ganadería*. 1999. Océano Grupo Editorial. Barcelona, ES. Pp.: 19-20.
- Goettemoeller, J.; Ching, A. 1999. Seed Germination in *Stevia Rebaudiana*. Alexandria, VA. 2 p.

- Goldblatt P (1981) Index to Plant Chromosome Numbers. 1975-1978. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. v. 5. Missouri Botanical Garden, St. Louis, 553 pp.
- Goldblatt P (1984) Index to Plant Chromosome Numbers. 1979-1981. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Vol. 8. Missouri Botanical Garden, St. Louis, 432 pp.
- Goldblatt P (1985) Index to Plant Chromosome Numbers. 1982-1983. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. v. 13. Missouri Botanical Garden, St. Louis, 224 pp.
- Goldblatt P (1988) Index to Plant Chromosome Numbers. 1984-1985. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. v. 23. Missouri Botanical Garden, St. Louis, 264 pp.
- Goldblatt P and Johnson DE (1990) Index to Plant Chromosome Numbers. 1986-1987. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. v. 30. Missouri Botanical Garden, St. Louis, 242 pp.
- Goldblatt P and Johnson DE (1991) Index to Plant Chromosome Numbers. 1988-1989. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. v. 40. Missouri Botanical Garden, St. Louis, 238 pp.

- Goldblatt P and Johnson DE (1996) Index to plant chromosome numbers. 1992-1993. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. v. 58. Missouri Botanical Garden, St. Louis, 276 pp.
- Goldblatt P and Johnson DE (1998) Index to Plant Chromosome Numbers. 1994-1995. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. v. 69. Missouri Botanical Garden, St. Louis, 208 pp.
- Grashoff, J. L. 1972. A systematic a study of the North Central and Souter, American. Specias of Stevia PhD dibbertartion. University of Texas. Austin 609 pp.
- GSC (Global Stevia Corporation, CA). 2005. Benefits of Stevia. (en línea). Canadá. Consultado 18 abr. 2006. Disponible en <http://www.steviacanada.com/>
- Guía de Investigación CIP 10. Técnicas Citológicas para determinar el número cromosómico y la fertilidad de las papas.
- Handro, W. 1994. Stevia rebaudiana Bert. Bertoni ESTADO ATUAL DO CONHECIMENTO. Monografía apresentada a Universidade Estadual de Maringá, referente a Relatório de Pesquisa.
- Herbotecnia. 2004. CAÁ HEÉ - YERBA DULCE. (en línea). Argentina. Consultado 25 abr. 2006. Disponible en <http://www.herbotecnia.com.ar/aut-stevia.html>

- INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias). Benítez J.; Navarrete J. 2002. Aplicación del Sistema Autotrófico-Hidropónico SHA (Técnica Argentina) en variedades mejoradas del Ecuador, para la obtención de semilla prebásica de papa. Quito, EC. 6 p.
- Jordán Molero, F. 1983. La propagación de ka'a he'e *Stevia rebaudiana* Bertoni. Primer Simposio Nacional de la Stevia (ka'a he'e). Asunción, PA. 29 p.
- Kozai, T. 1991. Autotrophic micropropagation. En: Environmental Control in micropropagation.
- La Prensa. Guerrero, R. 2005. Campo y Agro: Planta endulzante con mucho futuro. (en línea). Nicaragua. Consultado 18 abr. 2006. Disponible en <http://www.laprensa.com.ni/archivo/2005/abril/14/campoyagro/>
- Malda, G.; Ruiz, M. 2004. Comparación del crecimiento de magueyes pulqueros (*Agave salmiana* otto ex. salm y *Agave mapisaga* trel.) bajo esquemas de propagación *in vitro* y condiciones de invernadero. Querétaro, Mx. *Biologia Scripta*. Vol. 1 No. 1, pp:1-6.
- Marcavillaca M.C. 1985. Micropropagación "In-Vitro" de *Stevia rebaudiana* Bertoni por medio de segmentos nodales y meristemas.

- Marcavillaca M.C.; Divo de Sesar M. y Villela F. 1985. Propagación vegetativa a gran escala de Ka'a He'e (*Stevia rebaudiana* Bertoni): combinación de micro y macropropagación. Libro de actas de la XVIII
- Méndez, E. 1997. Efecto de los factores nutricionales en la propagación *in vitro* de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* L.). Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. Managua, Ni. 78 p..
- Mitsuhashi, H; Ueno, J y Sumita, T. 1975. Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana*_Bert. Determination of stevioside II. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan (12):1501-1503.
- Miyagawa, H.; Fujioka, N.; Kohda, H.; Yamasaki k.; Taniguchi, K.;Tanaka, R. 1986. Studies on the Tissue Culture of *Stevia rebaudiana* and Its Components; (II). Induction of Shoot Primordia. Planta Med 1986; 52: 321-323
- Monteiro Reinaldo. 1982. Taxonomía e biología da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. I Seminario Brasileiro sobre *Stevia rebaudiana* Bertoni. IV 1. Resumos ITAL Campinas 9/82. Instituto de Tecnología de Alimentos, Sao Paulo. Pagliosa, Frida Maciel. Pesquisa sobre *Stevia rebaudiana* Bertoni no nucleo de pesquisa de productos naturais da Universidade Federal de Santa María. I Seminario sobre *Stevia rebaudiana* Bertoni. VIII 1. Resumos ITAL Campinas 9/82.
- Mosettig, E. *et al.* 1963. J.Am.Chem.Soc. 85:2305.

- Narváez, V.; Gonzáles, J. 1983. Cultivo de tejidos del arroz *Oryza sativa* L.: inducción de callo y regeneración de plantas. Acta Agronómica (Colombia). v. 33(1) p. 5-24
- Nepovim, A.; Vanek, T. 1998. *In vitro* Propagation of *Stevia rebaudina* Plants Using Multiple Shoot Culture. Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic. *Planta Med* 1998; 64: 775-776
- Oliveira, V. et. al. 2004. Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana*(Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). Resarch Article. Pp.: 215-222.
- Pérez, O. 2006. Efecto de la contaminación bacteriana en la micropropagación de FHIA 18 (*Musa* spp híbrido AAAB)en la Biofábrica de Cienfuegos. UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA “FRUCTUOSO RODRIGUES PÉREZ”. La Habana, Cu.
- Perrin, R. H., *et al.* 1976. Formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos. Un manual metodológico de evaluación económica. México, Centro Internacional de Mejora- miento de Maíz y Trigo CIMMYT. 54 p.
- Rigato, S.; Gonzales, A.; Huarte, M. 2003. Tecnología desarrollada en el PROPAPA, adoptada por productores de distintas regiones de Argentina. INTA. Argentina.

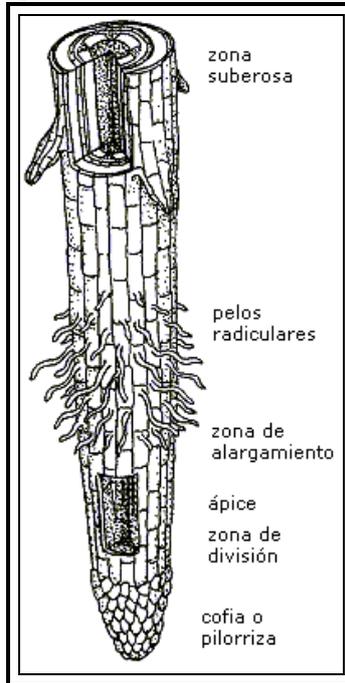
- Rodríguez, L. *et al.* 2005. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. [En línea]. Cuba. ISBN 959-250-156-4. *Disponible en:* www.dama.gov.co
- Rodríguez, M. 2007. Alternativas a los edulcorantes. (en línea). Consultado 10 jun. 2007. Disponible en <http://www.consumereroski.com>
- Rodríguez, R. *et. al.* 2002. Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.F.). Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales, ISSN 1131-7965, Vol. 11, N° 1, pags. 137-144
- Romero-Aranda R, Bondada BR, Syvertsen JP and Grosser JW (1997) Leaf characteristics and net gas exchange of diploid and autotetraploid citrus. *Ann Bot* 79:153-160.
- Rueda, D. 2004. Genética General Teoría y Problemas. 2da. Ed. Quito, EC. Pp.: 59, 112, 114, 175, 176.
- Sagakuchi M.; Tatsuiko K. 1982. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni e o esteviosideo. *Ciencia e Cultura* 34(2). pp. 235-248.
- Salisbury, F.; Ross, C. 2000. Fisiología de las plantas. Ed. Paraninfo S.A. Madrid, ES. Pp.: 176.
- Sato, T. & Kawakami, T. 1975. Cytological Studies of Artificial Tetraploid in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Jap. Jour. Crop. Sci.* 25 : 88-89.

- Shock, Clinton C. 1982. Experimental Cultivation of Rebaudi's Stevia in California. Agronomy Prog No. 122. Univ, of California, Davis.
- Soto, A.; Del Val, S. 2002. EXTRACCIÓN DE LOS PRINCIPIOS EDULCORANTES DE LA STEVIA REBAUDIANA. Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos. Buenos Aires, AR. Vol. 20.
- Sumida, T. 1980. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a new possible crop for sweetning resource in Japan. J. Cent. Agric. Exp. Sta. 31, 1-71
- Taiariol, D. 2003. Caracterización de la *Stevia rebaudiana* Bertoni. (en línea). Consultado 01 may. 2006. Disponible en <http://www.ilustrados.com/publicaciones/EpyplIEZEVENPGeSRF.php>
- Tamura, Y.; Nakamura, S.; Fukui, H.; Tabata, M. 1984. Clonal Propagation of *Stevia Rebaudiana* Bertoni by stemp-tip culture. Kyoto, JA. 3 p.
- Tamura, Y.; Nakamura, S.; Fukui, H.; Tabata, M. 1984. Comparison of *Stevia* plants grown from seeds, cuttings and stem-tip cultures for growth and sweet diterpene glucosides. Kyoto, JA. 3 p.
- Tanaka, O. 1982. Trends in Analytical Chemistry 1 N° 11: 246-248.

- Tateo, F.; Escobar, M. L.; Bonini, M.; Lubian, E. 1999. Stevioside content of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) bertoni grown in east Paraguay. Italian journal of food science . vol. 11, n°3, Pp. 265-269.
- Utsunomiya, T. 1977. Cultivation of *Stevia* Containing Sweetening Agents. *Nogyo Oyobi Engei* 52 (4):543-547.
- Yang Yau Wen and Wei Chin Chang. 1979. In vitro Plant Regeneration from Leaf Explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Z. Pflazenphysiol.* Bd. 93. S. 337-343. 1979.
- Yépez, R.; Fuenmayor, G.; Pino, A.; Yépez, E. 1996. Enfermedades crónicas no transmisibles relacionadas con la dieta en el Ecuador. (en línea). Cuba. Consultado 20 abr. 2006. Disponible en http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol10_1_96/ali08196.htm

X.I. ANEXOS

Anexo 1. Representación gráfica del ápice de una raíz y su zona meristemática, Naturenotes Cuaderno de Biología, 2006.



Anexo 2. Tabla de evaluación de los niveles óptimos de Tiamina, IASA I, Ecuador, 2007.

TRATAMIENTO	REPETICIÓN																							
PLANTA	Planta1						Planta2						Planta3						Planta4					
VARIABLE	Prend	Altura	Hojas	Color	Fenol	Enraiz	Prend	Altura	Hojas	Color	Fenol	Enraiz	Prend	Altura	Hojas	Color	Fenol	Enraiz	Prend	Altura	Hojas	Color	Fenol	Enraiz
05/06/2007 m																								
10/06/2007 d																								
15/06/2007 v																								
20/06/2007 x																								
25/06/2007 l																								
30/06/2007 s																								
PLANTA	Planta5						Planta6						Planta7						Planta8					
VARIABLE	Prend	Altura	Hojas	Color	Fenol	Enraiz	Prend	Altura	Hojas	Color	Fenol	Enraiz	Prend	Altura	Hojas	Color	Fenol	Enraiz	Prend	Altura	Hojas	Color	Fenol	Enraiz
05-jun																								
10-jun																								
15-jun																								
20-jun																								
25-jun																								
30-jun																								
PLANTA	Planta9																							
VARIABLE	Prend	Altura	Hojas	Color	Fenol	Enraiz																		
05-jun																								
10-jun																								
15-jun																								
20-jun																								
25-jun																								
30-jun																								

Anexo 3. Dosis para la solución Hidropónica Ajustada para Stevia, IASA I, Ecuador, 2007.

	Cant. en m ³	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	N como		PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	Cl	Fe ³⁺	Mn ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	B ³⁺	Mo ⁶⁺	Co ²⁺	Si ⁴⁺	
						NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻												
Nit de Ca	454	100					69.9												
Nit de K	1101.5				404.7		145												
Sulf de K téc	86.6				35				14.6										
Sulf de Mg	206.9		20						26.4										
18-18-18 + 1	483.3				48.1		58	25.3											
Quelato de Fe	45																		
Quelato de Mg												0.05							
Quelato de Mn	5																		
Acido Bórico	2.7														0.5				
Σ de ppm por elemento					487.8		272.9												
Requerimiento del cultivo en ppm.		100	32		480		275	20	40		2	1	0.05	0.05	0.5	0.01	0.05	----	

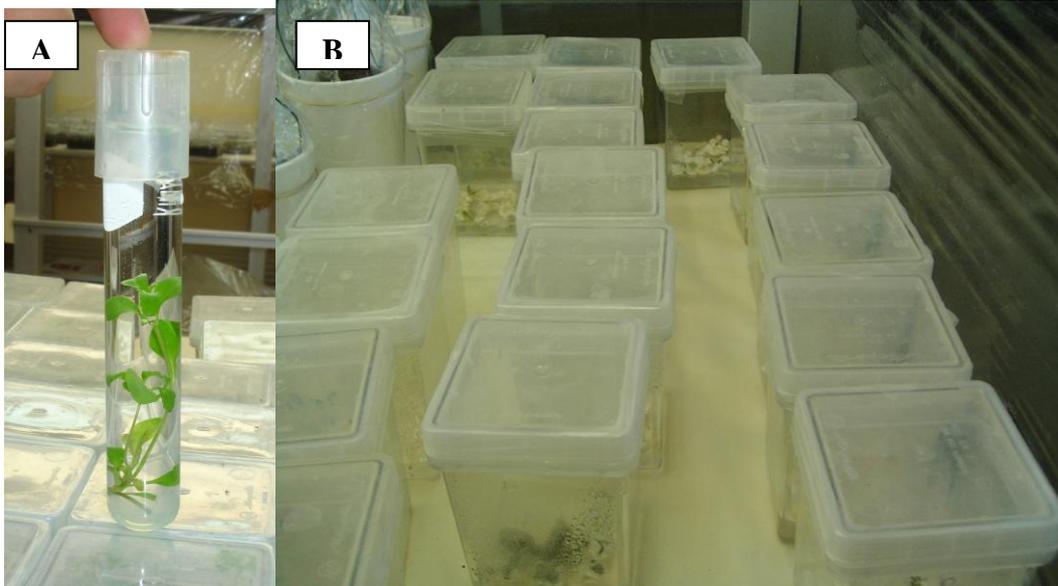
Fecha: 30-abr-2007

Anexo 4. Análisis Foliar de *Stevia Rebaudiana* Bertoni, INIAP, Ecuador, 2007.

Cenizas	Elementos Mayores (%)							Microelementos (ppm)			
	M.O.	N.T.	P	K	Ca	Mg	Na	Fe	Mn	Cu	Zn
0.07	86	2.75	0.2	4.8	1	0.32	-	168	220	14	110

Fecha: 10/4/07

Anexo 5. Fotografías de Plantas de Stevia *in vitro*. A. Planta *in vitro* de Stevia en tubo de ensayo. B. Cajas Magenta de cultivo *in vitro* de Stevia. IASA I, Ecuador, 2007.



Anexo 8. Plantas de Stevia en microinvernadero, IASA I, Ecuador, 2007.



Anexo 9. Evaluación de plantas de Stevia en invernadero, IASA I, Ecuador, 2007.



Anexo 10. Fotografía de raíces en pretratamiento con 8-hidroxiquinoleína para contaje cromosómico, IASA I, Ecuador, 2007.



Anexo 11. Fotografía de las placas de raíces de Stevia en tinción con orceína acética, IASA I, Ecuador, 2007.



Anexo 12. Fotografía de cromosomas mitóticos de *Stevia* ($2n = 22$) bajo el microscopio con un aumento de 100X, IASA I, Ecuador, 2007.



Anexo 13. Fotografías del tejido floral de *Stevia*. A. Planta de *Stevia* en floración. B. Flor de *Stevia* bajo el Microscopio (aumento 10X). C. Polen de *Stevia* bajo el microscopio (aumento 40X). D. Cromosomas meióticos de *Stevia* ($n = 11$) bajo el microscopio con un aumento de 100X. IASA I, Ecuador, 2007.

