

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN AGRICULTURA SUSTENTABLE



**“PROPAGACIÓN CLONAL *in vitro* DE LÍNEAS AVANZADAS DE
STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bertoni) PARA UNA PRODUCCIÓN DE
CALIDAD SOSTENIBLE”**

Presentada por:

MARÍA DE LOURDES TAPIA Y FIGUEROA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN AGRICULTURA SUSTENTABLE**

Lima – Perú

2023

Document Information

Analyzed document	TESIS LOURDES TAPIA tesis doctorado (ouriginal).docx (D164708246)
Submitted	2023-04-21 21:05:00
Submitted by	Luz Rayda Gómez Pando
Submitter email	luzgomez@lamolina.edu.pe
Similarity	18%
Analysis address	luzgomez.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / TESIS PA CON CARÁTULA NUEVA (5to).docx Document TESIS PA CON CARÁTULA NUEVA (5to).docx (D144385560) Submitted by: rpinedo@lamolina.edu.pe Receiver: rpinedo.unalm@analysis.arkund.com	 26
W	URL: https://core.ac.uk/download/pdf/249320848.pdf Fetched: 2021-03-05 17:38:03	 3
SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / TesisAlvaroCastro (1).docx Document TesisAlvaroCastro (1).docx (D159607358) Submitted by: 20130913@lamolina.edu.pe Receiver: hpcbioinformatica.unalm@analysis.arkund.com	 27
W	URL: http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/maestria/2021gaonapereiraandresdaniel.pdf Fetched: 2022-07-23 05:12:11	 1
W	URL: https://www.researchgate.net/publication/223515252_Cultivation_of_Stevia_Stevia_rebaudiana_Ber... Fetched: 2023-01-20 01:28:56	 6
W	URL: https://es.wikipedia.org/wiki/Stevia_rebaudiana Fetched: 2019-09-24 23:36:35	 2
W	URL: https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/20884/1/TESIS%20FINAL%20STEVIA%202019%20DEFENSA%20MAYO.pdf Fetched: 2022-06-08 00:19:42	 3
W	URL: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362015000500001 Fetched: 2022-01-05 02:57:00	 3
SA	submission.pdf Document submission.pdf (D101034400)	 4
W	URL: https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/601 Fetched: 2021-03-19 02:42:23	 3
W	URL: https://www.researchgate.net/profile/Jorge_Herrera13/publication/330401807_Investigaciones_Cie... Fetched: 2022-11-10 18:10:13	 2
W	URL: https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-27027-2_8 Fetched: 2019-11-21 19:55:09	 1
W	URL: https://www.researchgate.net/publication/320827266_Extraction_Purification_and_Analysis_of_Swe... Fetched: 2020-06-03 11:28:17	 1

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN AGRICULTURA SUSTENTABLE

**PROPAGACIÓN CLONAL *in vitro* DE LÍNEAS AVANZADAS DE
STEVIA (*Stevia rebaudiana* BERTONI) PARA UNA PRODUCCIÓN DE
CALIDAD SOSTENIBLE**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTORIS PHILOSOPHIAE (Ph.D.)**

Presentada por:

MARÍA DE LOURDES TAPIA Y FIGUEROA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

**Ph.D. Elizabeth Heros Aguilar
PRESIDENTE**

**Dra. Luz Gómez Pando
ASESOR**

**Dra. Rosana Chirinos Gallardo
MIEMBRO**

**Dr. Alberto Julca Otiniano
MIEMBRO**

**Dra Rebeca Magdalena Pavlich Herrera
MIEMBRO EXTERNO**

A mis padres Manuel y Mercedes, por su apoyo incondicional.

A mi esposo Faustino Félix Beraún Barrantes, a mis amados hijos José Carlos y José Faustino Beraún Tapia por su apoyo y cariño incondicional y a mi nieto Alessandro Beraun por su gran alegría

A mis hermanos Edwin y Gaby, y a mis hermanos políticos Pepe, Hugo, Juanita y Coco por estar siempre presente y motivándome a seguir avanzando.

AGRADECIMIENTO

A mi asesora, Dra. Luz Gómez Pando, por su apoyo incondicional, guía constante y gran amiga.

A los miembros del jurado, Ph.D. Elizabeth Heros Aguilar, Dra. Rosana Chirinos Gallardo, Dr. Alberto Julca Otiniano, Dra. Rebeca Magdalena Pavlich Herrera, por su apoyo al desarrollo de mi tesis.

A los profesores del Doctorado de Agricultura Sustentable por sus valiosas enseñanzas y consejos.

Al Departamento de Fitotecnia de la Facultad de Agronomía de la UNALM por su apoyo durante mis estudios del doctorado, al personal administrativo de Fitotecnia Elia Velázquez Bueno y María Canchay Jiménez, por su apoyo incondicional, al personal administrativo del Doctorado de Agricultura Sustentable Rebeca, Marcial y Bertha, por su apoyo en todo momento.

A AJE Group, por financiar la presente investigación y, de ese modo, permitir llevar a cabo investigaciones de este tipo en el país.

Al Ing. Ángel Eduardo Añaños Jeri, Ing. Carlos Vargas Olarte, Ing. Jorge Gustavo Tello León, por sus valioso apoyo y recomendaciones para el buen desarrollo del trabajo de investigación.

Al maravilloso equipo humano del Instituto de Biotecnología de la UNALM, por su inmenso apoyo en el desarrollo de la tesis.

A mis amigas y amigos por su apoyo en momentos difíciles.

A mis alumnas, Gabriela Saravia Castillo y Sofia Noriega Cervantes, por su apoyo en el desarrollo de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Importancia de la stevia.....	4
2.2. Origen.....	6
2.3. Descripción botánica	6
2.3.1. Taxonomía	6
2.3.2. Morfología	7
2.3.3. Reproducción.....	8
2.4. Contenido de glucósidos dulces	9
2.5. Aplicaciones de la <i>Stevia rebaudiana</i>	10
2.6. Cultivo.....	10
2.6.1. Clima	10
2.7. Manejo del cultivo.....	12
2.7.1. Suelos.....	13
2.7.2. Semillas u otras estructuras vegetales empleadas en la siembra	13
2.7.3. Espaciamiento / densidad de cultivo	14
2.7.4. Época de siembra.....	14
2.7.5. Manejo de nutrientes.....	15
2.7.6. Manejo de malezas.....	15
2.7.7. Manejo de enfermedades y plagas.....	16
2.7.8. Requerimientos de agua.....	16
2.7.9. Cosecha	17
2.7.10. Secado	17
2.8. Microprogación	18
2.9. Mejoramiento	20
2.9.1. Herencia Genética	20
2.9.2. Métodos de Mejoramiento Genético	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Ubicación del experimento.....	22
3.2. Material vegetal.....	22

3.3.	Insumos de laboratorio	22
3.4.	Materiales	23
3.5.	Equipos.....	23
3.6.	Metodología	24
3.6.1.	Experimento 1.....	24
3.6.2.	Experimento 2.....	26
3.6.3.	Experimento 3.....	28
3.6.4.	Experimento 4.....	28
3.7.	Análisis estadísticos	30
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1.	Desarrollo de un protocolo de propagación clonal convencional <i>in vitro</i> de genotipos de stevia en micropropagación convencional <i>in vitro</i>	31
4.1.1.	Experimento comparativo de cuatro medios de cultivo en micropropagación convencional.....	31
4.1.2.	Experimento comparativo de micropropagación convencional <i>in vitro</i> de tres genotipos de stevia.....	32
4.1.3.	Fase de aclimatización de plantas propagadas <i>in vitro</i> convencional.....	33
4.2.	Desarrollo de un protocolo para la propagación clonal de genotipos de stevia en un sistema de biorreactores de inmersión temporal.....	36
4.2.1.	Experimento comparativo de cuatro medios de cultivo en biorreactores de inmersión temporal	36
4.2.2.	Experimento comparativo de tres genotipos en biorreactores de inmersión temporal	38
4.3.	Evaluación del contenido de steviosido y rebaudiosido en genotipos propagadas en micropropagación convencional <i>in vitro</i> y en sistemas de biorreactores de inmersión temporal.....	41
4.4.	Evaluación del efecto de dos ambientes controlados en el crecimiento y rendimiento y la calidad de líneas avanzadas de stevia	43
4.4.1.	Efecto de dos ambientes controlados (Sullana. Perú y Misiones Paraguay) en el desarrollo de genotipos de stevia (IBT1, IBT2 y IBT3).....	43
4.4.2.	Efecto de dos ambientes controlados (Sullana - Perú y Misiones - Paraguay) en el desarrollo de líneas avanzadas de Sstevia (IBT1, IBT2 y IBT3) después del primer corte de tallos o cosecha.....	44

V. CONCLUSIONES.....	46
VI. RECOMENDACIONES.....	48
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cámara edafoclimática Aralab.....	24
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Medios de cultivo usados en la propagación clonal de tres genotipos de stevia (<i>stevia rebaudiana</i>)	22
Tabla 2: Detalle de los medios de cultivo del Experimento 1	25
Tabla 3: Detalle de los medios de cultivo del Experimento 2	27
Tabla 4: Ambientes de Sullana – Perú y misiones - Paraguay y programados en las cámaras edafoclimáticas.....	29
Tabla 5: Cuadrados medios del ANVA de altura de plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula (G) y número de raíces/plántula de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) propagados en forma convencional in vitro en cuatro diferentes medios de cultivo.....	32
Tabla 6: Valores medios de altura de plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula (G) y número de raíces/plántula de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) propagados en forma convencional in vitro en cuatro diferentes medios de cultivo.....	32
Tabla 7: Cuadrados medios del ANVA de altura de plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula y número de raicillas/plántula de tres genotipos de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) propagados en forma convencional en condiciones in vitro	33
Tabla 8: Valores medios de altura de plántula (cm), número de hojas/plántula, peso fresco/plántula (g) y número de raicillas/plántula de tres genotipos de stevia (<i>stevia rebaudiana</i> bertoni) propagados en forma convencional en forma convencional en condiciones in vitro.....	33
Tabla 9: Cuadrados medios del ANVA de altura de planta, número de raíces/ planta, longitud de raíces/planta y peso fresco/planta de tres genotipos de stevia (<i>stevia rebaudiana</i> bertoni) en proceso de aclimatización	34
Tabla 10: Valores medios de altura de planta (cm), N° de raíces/ planta, longitud de raíces/planta (cm) y peso fresco/planta (g) de tres genotipos de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) en proceso de aclimatización.....	34
Tabla 11: Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de tres genotipos de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) en proceso de aclimatización.....	35

Tabla 12: Cuadrados medios del ANVA de altura de plántula, número de tallos/plántula, número de hojas/plántula, peso (g) y número de raíces/plántula de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) propagados en biorreactores en cuatro diferentes medios de cultivo.....	37
Tabla 13: Valores medios de altura de plántula, número de tallos/plántula, número de hojas/plántula, peso (g) y número de raíces/plántula de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) en biorreactores en cuatro diferentes medios de cultivo.....	37
Tabla 14: Cuadrados medios del ANVA de altura de plántula, número de tallos, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula y número de raicillas/plántula de tres genotipos de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) propagados en biorreactores ..	38
Tabla 15: Valores medios de altura de plántula (cm), número de tallos/ plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula (g) y número de raicillas/plántula de tres genotipos de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) propagados en birreactores	39
Tabla 16: Cuadrados medios del ANVA de altura de planta, número de raíces/planta, longitud de raíces y peso fresco/planta de tres genotipos de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) en etapa de aclimatación provenientes de biorreactores ...	39
Tabla 17: Valores medios de altura de planta (cm), número de raíces/planta, longitud de raíces (cm) y peso fresco/plántula (g) de tres genotipos de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) en etapa de aclimatación provenientes de biorreactores ...	40
Tabla 18: Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de tres genotipos de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) propagadas en biorreactores de inmersión temporal en proceso de aclimatización	40
Tabla 19: Cuadrados medios del ANVA del contenido de Rebaudiósido y Esteviosido en dos genotipos de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) propagadas por el método convencional y en biorreactores.....	42
Tabla 20: Valores medios del contenido de Rebaudiósido y Esteviosido en dos genotipos de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) propagadas por el método convencional y en biorreactores.....	42
Tabla 21: Cuadrados medios del ANVA de altura de plántula, número de hojas, longitud de raíz y peso fresco de tres genotipos de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) propagadas en Sullana y Misiones	43
Tabla 22: Valores medios de altura de plántula, número de hojas, longitud de raíz y peso fresco de tres genotipos de stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) propagadas en Sullana y Misiones	44

Tabla 23: Cuadrados medios del ANVA de altura de plántula (cm), número de hojas/planta, número de brotes/planta, longitud de raíz/planta y peso fresco/planta de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagadas en Sullana y Misiones después de 30 días del corte de tallo 45

RESUMEN

La Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es una especie originaria de Paraguay y Brasil es usada como un endulzante o edulcorante natural y por sus propiedades medicinales contribuyen a reducir a problemas de glicemia e hipertensión. La presente investigación tuvo los siguientes objetivos: (1) Desarrollar un protocolo de propagación clonal *in vitro* de genotipos de stevia en micropropagación convencional *in vitro*, (2) Desarrollar un protocolo para la propagación clonal de genotipos de stevia en un sistema de biorreactores de inmersión temporal, (3) Evaluar el contenido de esteviósido y el rebaudiósido en genotipos propagados en micropropagación convencional *in vitro* y en sistemas de biorreactores de inmersión temporal y (4) Evaluar el efecto de dos ambientes controlados en el rendimiento y calidad de genotipos de stevia. La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos *in vitro* del Instituto de Biotecnología – IBT, de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima, Perú). Se emplearon cuatro medios de cultivo: M1: Murashigue and Skoog (MS) sin reguladores de crecimiento + 30 g de sacarosa, M2: MS + 1 mg/l BAP+0.1 mg/l ANA + 30 g sacarosa, M3: MS + 1.5 mg/l BAP+0.1 mg/l ANA + 30 g sacarosa y M4: MS + 2.5 mg/l BAP+0.1 mg/l ANA + 30 g sacarosa y se evaluaron tres genotipos de Stevia. Se desarrolló un protocolo para la propagación convencional *in vitro*, empleando el medio de cultivo M1 e identificándose al genotipo IBT1 y el IBT3 con el mejor comportamiento en el medio M1. Igualmente se desarrolló un protocolo para la propagación con Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) sobresaliendo el medio M2 y el genotipo con mejor comportamiento fue IBT1. El genotipo IBT3 presentó el contenido más alto de rebaudiosido y esteviósido igual a 17.21 g/100g y 5.28 g/100g; respectivamente superior al IBT1 tanto en plantas provenientes de propagación convencional *in vitro* y plantas provenientes de propagación en BIT. Para el IBT1 los mejores valores para las características evaluadas fueron observados en el ambiente de Sullana y se observó después de la primera cosecha un incremento en el número de hojas de 13.25 a 57.67 y el contenido de rebaudiósido (16.467 g/100) y esteviósido (3.612 g/100) más alto se observó en Misiones. El IBT2 tuvo mejores

valores para la mayor parte de las características en Sullana y después del primer corte (cosecha se reporta un incremento de hojas de 23.62 a 45 hojas y con un contenido de rebaudiósido (19.668 g/100 g) y esteviósido (4.592 g/100 g) más alto se observó en Misiones y en Sullana; respectivamente. El IBT3 dio los mejores valores de las características evaluadas en general en el ambiente de Misiones Paraguay, después del primer corte (cosecha) los mejores valores fueron encontrados en Sullana, de igual modo se observó un incremento de hojas de 21.5 a 34 hojas y el contenido de rebaudiósido (20.218 g/100g) y esteviósido (4.588 g/100 g) más alto se observó en Misiones y en Sullana; respectivamente.

Palabras clave: edulcorante, *in vitro*, biorreactor, genotipo, *Stevia*.

ABSTRACT

Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) is a species native to Paraguay and Brazil. It is used as a natural sweetener and, due to its medicinal properties, it contributes to reducing glycemia and hypertension problems. The present research had the following objectives: (1) To develop a protocol for in vitro clonal propagation of stevia genotypes in conventional in vitro micropropagation, (2) To develop a protocol for the clonal propagation of stevia genotypes in a bioreactor system of temporary immersion, (3) To evaluate the content of stevioside and rebaudioside in genotypes propagated in conventional micropropagation *in vitro* and in temporary immersion bioreactor systems and (4) Evaluate the effect of two controlled environments on the yield and quality of stevia genotypes. The research was carried out in the *in vitro* Tissue Culture Laboratory of the Institute of Biotechnology - IBT, of the La Molina National Agrarian University, located in La Molina, Lima province, Lima department. Peru. Four culture media were used: M1: MS without growth regulators + 30 g of sucrose, M2: MS + 1 mg/l BAP+0.1 mg/l ANA + 30 g sucrose, M3: MS + 1.5 mg/l BAP+ 0.1 mg/l ANA + 30 g sucrose and M4: MS + 2.5 mg/l BAP+0.1 mg/l ANA + 30 g sucrose. Three *Stevia* genotypes were studied. A protocol was developed for conventional in vitro propagation using the culture medium M1 (MS without growth regulators + 30 g of sucrose) and identifying the genotype IBT1 (Morita II) and IBT3 (Advanced Mutant Line) with the best behavior in the medium M1. Likewise, a protocol was developed for propagation with Temporary Immersion Bioreactors (BIT) with the M2 medium standing out (MS + 1 mg/l BAP+0.1 mg/l ANA + 30 g sucrose) and the genotype with the best performance was IBT1 (Morita II). The IBT3 genotype (Advanced Mutant Line) presents the highest content of rebaudioside and stevioside equal to 17.21 g/100g and g/100g; respectively higher than IBT1 (Morita II) both in plants from conventional propagation in vitro and plants from propagation in BIT. For IBT1, the best values for the evaluated characteristics were observed in the Sullana -Peru environment and an increase in the number of leaves from 13.25 to 57.67 after the first cutting and the content of rebaudioside (16.467 g/100) and stevioside (3,612 g/100) highest was observed in Misiones - Paraguay. The IBT2 (Miskibamba) had better values for most of the

characteristics in Sullana and after the first cut (harvest), an increase in leaves from 23.62 to 45 leaves and with a content of rebaudioside (19.668 g/100g) and stevioside (4,592 g/100g) highest was observed in Misiones and Sullana, respectively. The IBT3 gave the best values of the characteristics evaluated in general in the environment of Misiones- Paraguay, after the first cut (harvest) the best values were found in Sullana, likewise, an increase in leaves from 21.5 to 34 leaves was observed, and the highest content of rebaudioside (20.218 g/100 g) and stevioside (4.588 g/100 g) was observed in Misiones and Sullana, respectively.

Key words: sweetener, *in vitro*, bioreactor, genotype, *Stevia*.

I. INTRODUCCIÓN

La stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es una especie originaria de Paraguay y Brasil es usada como un endulzante o edulcorante natural en la elaboración de bebidas, dulces y otros y con valor medicinal. La stevia tiene sus efectos benéficos en la salud por sus propiedades medicinales que contribuyen a reducir problemas de glicemia e hipertensión. Se señala que su poder es 300 veces más que la sacarosa de la caña de azúcar. *Stevia rebaudiana* es una nueva fuente alternativa emergente de calorías sin edulcorante ganando popularidad en todo el mundo de la salud y en el incremento de la economía de los agricultores y procesadores de este cultivo, como la industria de la comida y la farmacéutica.

En el Perú su cultivo aún no es significativo, pero se considera una alternativa importante para el futuro por la alta demanda de edulcorantes no calóricos y con propiedades medicinales. Su cultivo puede brindar a los agricultores la oportunidad de ser parte de una creciente cadena de suministro que incluye varios otros países de todo el mundo.

La stevia es una planta perenne, sensible al fotoperiodo, alógama y auto incompatible con diminutas flores blancas. Se puede propagar mediante esquejes y semillas; sin embargo, se requiere abundantes plantas madres, mucha mano de obra y depende de la estación del año óptima para su establecimiento y desarrollo. Por otro lado, las semillas son más pequeñas y la frecuencia de germinación es muy baja lo que limita su uso en la propagación de esa especie. Adicionalmente las plantas pueden ser genotipos diferentes por problemas de segregación observado en la propagación por semillas, lo que afecta la concentración de los compuestos de mayor interés. La falta de material de siembra de calidad es un cuello de botella en el cultivo a gran escala de stevia.

Debido a estas limitaciones comprobadas, se han desarrollado técnicas de propagación *in vitro* para su propagación clonal. El cultivo *in vitro*, permite multiplicar muy rápidamente genotipos de alta productividad y calidad, sin que se presente segregación de caracteres genéticos. Hay varios estudios de regeneración *in vitro* realizados en *S. rebaudiana* en la

última década, que se centran principalmente en organogénesis directa y/o indirecta. El uso de sistemas de micropropagación representa una alternativa viable para la propagación masiva de plantas libres de patógenos y que conserven la producción de los glucósidos de interés. El empleo de sistemas de biorreactores de inmersión temporal es un proceso automatizado que provee condiciones de cultivo uniformes y controladas para la planta, se requiere de menos recipientes y se siembra una mayor cantidad de explantes por envase de cultivo que en los frascos usados en los sistemas semisólidos. Por lo que los SIT representan una alternativa que puede potenciar la generación de plantas más vigorosas, con incremento en el tamaño, mayor número de hojas y formación de raíz.

Sin embargo, la variabilidad genética de las variedades, diferentes fuentes de explantes, los períodos de cultivo y las formulaciones de los medios afectan significativamente la regeneración de plantas y la calidad del glucósido por lo que existe aún la necesidad de desarrollar el protocolo apropiado para obtener plantas de alta calidad y la determinación de los esteviósidos en las plantas micropropagadas de diferentes genotipos y aclimatadas en ambientes diferentes.

En base a lo señalado, se planteó la presente investigación para evaluar el comportamiento de líneas avanzadas de stevia obtenidas por mutaciones y variedades introducidas; en dos sistemas de cultivo *in vitro* y en dos ambientes en cámaras edafoclimáticas.

Los objetivos planteados se mencionan a continuación:

Objetivo General

- Contribuir al desarrollo del cultivo de stevia con protocolos mejorados de micropropagación *in vitro* y nuevo material genético para la producción sostenible del cultivo.

Objetivos específicos

- Desarrollar un protocolo de propagación clonal convencional *in vitro* de genotipos de stevia en micropropagación convencional *in vitro*.
- Desarrollar un protocolo para la propagación clonal de genotipos de stevia en un sistema de biorreactores de inmersión temporal.

- Evaluar el contenido de steviosido y rebaudiosido en genotipos propagadas en micropropagación convencional *in vitro* y en sistemas de biorreactores de inmersión temporal.
- Evaluar el efecto de dos ambientes controlados en el rendimiento y calidad de genotipos de stevia.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. IMPORTANCIA DE LA STEVIA

La stevia posee numerosos principios medicinales que la convierten en una especie agrícola potencialmente valiosa. Hay más de 230 especies en el Género *Stevia*; sin embargo, *S. rebaudiana* produce la esencia más dulce. Las hojas de stevia se utilizan para endulzar, tal cual, o secas y pulverizadas, o empapado en agua (licor). Es un edulcorante no calórico que no fermenta en el cuerpo humano. El esteviósido, puede variar del 2 al 10 por ciento (Magalhaes 2000; Lemus- Mondaca *et al.* 2012) y las plantas contienen una resina aromática, que tiene acción tónica sobre los órganos digestivos. También es fuente de giberelina (Duke y De Cellier 1993). La hierba contiene 0.12 – 0.16 por ciento de aceite esencial, que llega hasta 0.43 por ciento en la inflorescencia (Kinghorn y Soejarto 1985). Según Hossain *et al.* (2017), el esteviol es una sustancia que sintetiza la planta de stevia, provee de beneficios para la salud como regulador de la presión arterial, induce al páncreas para que produzca insulina, además tiene efecto antibacterial y anti fúngico. Otros estudios indican que puede ser anticancerígeno, antioxidantes, antiinflamatorios, reductor del riesgo de pérdida de memoria (Ljaz *et al.* 2015).

El cultivo comercial de stevia se realiza principalmente en Asia y América. Entre los principales productores de stevia como plantas y hoja seca se encuentran Paraguay, Argentina, Brasil, Israel, China, Tailandia, y Japón controlando la totalidad de la producción y comercio mundial, aproximándose a los 200 millones de dólares. En el caso del esteviósido refinado solo en Japón, el principal productor mundial, las ventas del comercio interno fueron cercanas a los 130 millones de dólares (Brandle y Rosa 1992 citados por Yadav *et al.* (2011).

Este cultivo ha hecho importantes impactos agrícolas en países como Japón, China, Taiwán, Corea, México, Estados Unidos, Tailandia, Malasia, Indonesia, Australia, Tanzania, Canadá, Abjasia, Rusia, Tailandia, Malasia, Indonesia, Australia, Tanzania, Canadá, Abjasia, Rusia, India (Ramesh 2006).

Según el análisis regional, América del Norte representa el mercado más lucrativo, seguido de América Latina y Asia-Pacífico, excluyendo a Japón (Gomes *et al.* 2017). China tiene una ventaja sobre otros países con respecto a la capacidad de producción y la exportación de stevia a nivel mundial debido al bajo costo de producción y la disponibilidad de recursos calificados lo que es un factor importante que impulsa el crecimiento del mercado (Gomes *et al.* 2017).

A nivel mundial, el mercado de stevia se estimó en US \$347.0 millones en 2014 y US \$565.2 millones para el 2020 (Gomes *et al.* 2017). En términos de volumen de consumo, la stevia alcanzó 8 506.9 toneladas para fines de 2020, registrando un crecimiento anual de alrededor del 7-8 por ciento durante el período de pronóstico. Teniendo en cuenta el contexto brasileño, la producción no es suficiente para satisfacer la demanda interna, con importaciones de más de US \$ 3 millones registradas en esteviósido en 2016 (Gomes *et al.* 2017).

Con Brasil, Paraguay y Argentina como los principales productores de Latino América, se espera que el mercado latinoamericano de stevia crezca a una tasa compuesta anual de alrededor del 8.8 por ciento durante 2020-2025 y que el mercado global alcance los 787 millones de dólares para 2025 (<https://www.informesdeexpertos.com/informes/mercado-latinoamericano-de-stevia>).

En el Perú el cultivo de stevia se inició en el año 1994. Las empresas peruanas que empezaron con el cultivo son Stevia Coronel SAC, Stevia Perú SAC y Stevia Perú, con instalaciones principalmente en la amazonia del norte del país (Delgado 2007). La mayor superficie cultivada se encuentra en el departamento de Cajamarca, provincia de San Ignacio, además, pequeñas áreas en la provincia de Rodríguez de Mendoza y en Huánuco (Chávez 2018). En Piura se prevé la siembra de 60 ha de Stevia.

La inversión en su producción es alta, sin embargo, es una de las mejores alternativas, sobre todo por la creciente demanda tanto en el interior del país como en el extranjero y que asegura mercado a los agricultores involucrados en su cultivo.

2.2. ORIGEN

El Ka'á He'é (en guaraní, hierba dulce), se denomina científicamente *Stevia rebaudiana* es originaria del Paraguay de la zona de la Cordillera de Amambay ubicada entre los 25° y 26° de Latitud Sur entre 200 a 500 msnm y con precipitaciones de 1500 a 1800 mm (Lewis 1992; Yadav *et al.* 2011; Casaccia 2016). Ramesh *et al.* (2006) señalan que este cultivo es originario del valle del Río Monday en el noreste Paraguay y se le encuentra en forma natural en los bordes de las marismas en suelos ácidos infértiles de arena o lodo. También se señala su presencia espontánea en regiones tropicales desde el sur este de Estados Unidos hasta Argentina (Gantait *et al.* 2015).

Fue empleado históricamente por el pueblo de Paraguay como edulcorante y remedio herbal (Lewis 1992). Informes iniciales señalan que la stevia fue conocida por los españoles durante el siglo XVI. Para el año de 1887 el naturalista Dr. Moisés Bertoni, conoce la planta a través de mineros e indios de la región de Caaguazú y Monday de la República del Paraguay, por la misma época el químico paraguayo Ovidio Rebaudi, realiza los primeros estudios del componente dulce de la hoja. En 1904, Bertoni verifica que la planta pertenece al género *Stevia* con lo cual en 1905 se registra definitivamente como *Stevia rebaudiana* Bertoni en honor a estos dos investigadores (Martínez 2015). En 1908 se realiza el primer cultivo extensivo en la zona de Puerto Bertoni-Alto Paraná (Paraguay) (Marín 2004).

En 1955, los japoneses comenzaron a desarrollar cultivos inicialmente en Paraguay, en 1966 se inició su venta en Paraguay, además se registró la patente de Invención del señor De Gásperi sobre la “Utilización de ramas y tallos de *Stevia*” y sobre “Extracto de la hoja” (Cueva 2016). Alrededor de 1970, los japoneses cultivaban stevia en el sur de Japón porque los edulcorantes artificiales estaban regulados y prohibidos a partir de los años 60 (Cueva 2016).

2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

2.3.1. Taxonomía

Dominio: Eucariota

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Eupatorieae

Género: *Stevia*

Especie: *Stevia rebaudiana* Berton

Nombres Comunes:

Paraguay: *Stevia*, Ka'a he'ê (hierba dulce), Azucá-caá (hierba azúcar) (Casaccia *et al.* 2016)

El género *Stevia* consta de más de 240 especies de plantas nativas de Sudamérica, Centroamérica y México, con especies encontradas en lugares tan lejanos como Arizona, Nuevo México y Texas (Martínez 2015). Por siglos las tribus guaraníes de Paraguay y Brasil usaron especies diferentes de *Stevia* y, principalmente, *Stevia rebaudiana*, denominándolas ka'a he'ê o yerba dulce (Martínez 2015).

2.3.2. Morfología

a. Raíz

La raíz es fibrosa, filiforme y perenne con poca ramificación y superficial, distribuyéndose cerca de la superficie del suelo (Casaccia *et al.* 2016).

b. Tallo

El tallo es anual, sub leñoso, más o menos pubescente. Inicialmente no presenta ramificaciones y luego después del primer ciclo puede producir más de 20 tallos en un periodo de tres a cuatro más de 1.50 metro de altura. El contenido de esteviósido es menor al 3por ciento del peso seco. El sistema aéreo rebrota después de cada cosecha (Casaccia *et al.* 2016).

c. Hojas

Las hojas son pequeñas, simples, incompletas debido a la ausencia de la vaina y presentan un peciolo corto. Pueden ser elípticas, lanceoladas u oblongas, aserradas y dulces. Con venas prominentes en el envés (cara abaxial) y sumergidas en el haz (cara adaxial) a excepción de la nervadura central que es prominente en ambas superficies (Rossi *et al.* 2018). A veces forman verticilos. El tamaño promedio aproximado es de 2cm de ancho por 5 cm de longitud. (Casaccia *et al.* 2016).

d. Flores

Las flores son pequeñas y blancas con una garganta de color púrpura pálido de 7 a 15 mm (Casaccia *et al.* 2016). Las diminutas flores blancas son perfectas (hermafroditas), nacidas en pequeños corimbos de dos a seis floretes. Los corimbos están dispuestos en panículas sueltas (Goettemoeller y Ching 1999). La stevia es auto incompatible y probablemente una planta polinizada por insectos y la polinización cruzada varia de 0.7 a 68.7 por ciento (Oddone 1997; Maiti y Purohit 2008; Casaccia *et al.* 2016).

Una planta necesita un mes para producir todas sus flores (Taiariol 2004). Los genotipos de floración temprana tienden a tener un mayor contenido de steviósido pero menor rendimiento total (Megeji *et al.* 2005).

e. Semillas

Son aquenios de unos 3mm de longitud con alrededor de 20 cerdas persistentes (vilano o papus). Las semillas pueden ser claras (estériles) y oscuras (fértils) (Oddone 1997; Yadav *et al.* 2011; Casaccia *et al.* 2016). Se señala que el 28 por ciento de las semillas son oscuras y 72 por ciento son claras (Rossi *et al.* 2018).

Las formas silvestres se reproducen por semillas principalmente, pero la viabilidad de las semillas es pobre y muy variable (Kumar 2013). Las semillas tienen muy poco endospermo y se dispersan con el viento a través de vilanos o papus (Ferreira *et al.* 2011; Yadav *et al.* 2011).

2.3.3. Reproducción

Stevia rebaudiana es un alógamo auto – incompatible y se señala que cierto tipo de hormonas precursoras regulan la formación de semillas viables (Handro y Ferreira 1989). Por tratarse de una planta alógama de polinización cruzada, hay diversidad fenotípica en las poblaciones nativas en Paraguay; con una gran diferencia de contenido de edulcorantes entre las distintas plantas y/o clones.

En campos comerciales las plantas que se origina de semillas son heterogéneas con variabilidad en caracteres importantes como niveles y la composición de edulcorantes (Brandle y Telmer 2007).

2.4. CONTENIDO DE GLUCÓSIDOS DULCES

Existen 10 glucósidos de los cuales el esteviósido y el rebaudiósido son importantes. Los compuestos endulzantes naturales de *S. rebaudiana* no son compuestos calóricos, lo que los hace apropiados para aquellas personas que deben controlar la concentración de azúcar en la sangre (Barba *et al.* 2015; Singh *et al.* 2017). Adicionalmente se señala que controla la hipertensión, que tiene propiedades antioxidantes, anticancerígenos, antibacterianas, anticonceptivas y diuréticas (Durán *et al.* 2013; Salvador-Reyes *et al.* 2014; Hossain *et al.* 2017). Se señala que su poder es 300 veces más que la sacarosa de la caña de azúcar (Schwebel, 2005; Yadav *et al.* 2011).

Los órganos de la planta presentan diferentes cantidades del glucósido dulce, esteviósido, en el siguiente orden de mayor a menor: hojas, flores, tallos, semillas. La raíz no contiene esteviósidos. La dulzura en las hojas es dos veces mayor que en inflorescencia (Dwivedi 1999). La hoja tiene un agradable refrescante sabor dulce que puede permanecer en la boca durante horas. El material contiene los componentes dulces, rodeados por los componentes amargos en las venas (Maiti y Purohit 2008).

Considerando la planta se reporta mayor cantidad de esteviósidos en los brotes jóvenes superiores en crecimiento activo y las más bajas concentraciones en los brotes senescentes y de igual modo la concentración cambio durante las fases fenológicas incrementándose hasta la fase de floración (Bondarev *et al.* 2003b).

La calidad de las hojas varía ampliamente debido a muchos factores, como las condiciones del suelo, los métodos de riego, luz solar, pureza del aire, prácticas agrícolas, control de plagas, procesamiento y almacenamiento (Maiti y Purohit 2008).

La planta en estado natural presenta una composición nutricional como se muestra en la Tabla 1 (DuBois 2000; Jakinovich *et al.* 1990; citados por Miao *et al.* 2016). El steviosido es un glucósido que comprende 60-70 por ciento del contenido total de glucósidos y evaluado como 110-270 veces más dulce que el azúcar, con un gusto algo amargo, o se informa como un sabor o efecto persistente de "regaliz" (DuBois 2000; Jakinovich *et al.* 1990 citados por Miao *et al.* 2016). Mientras, el rebaudiósido A estuvo presente en un 30-40 por ciento del contenido total de glucósidos y evaluado como 180-400 veces más dulce que el azúcar con un sabor dulce más agradable y sin gusto amargo (DuBois 2000 citado por Miao *et al.* 2016).

Una mayor cantidad de rebaudiósido A que esteviósido indica una mejor calidad de dulzor (Yadav *et al.* 2011, citados por Miao *et al.* 2016). La variedad peruana contiene hasta un 80 por ciento de rebaudiósido A. Las stevias tradicionales poseen 30 por ciento de este elemento (Rojas 2009).

2.5. APLICACIONES DE LA *Stevia rebaudiana*

El mercado de stevia se ha expandido a otros campos como el de la Fito sanidad agropecuaria y en el caso del consumo humano, ante la creciente demanda de productos “*light*”, se ha diversificado su uso y sus presentaciones (Martínez 2015). En la actualidad, en el sector agropecuario se utilizan extractos de stevia como fertilizante con el fin de estimular los procesos fotosintéticos de los cultivos y obtener una elevada concentración de azúcares en los frutos; además, aplicando el extracto en el agua de riego, se enriquece la población de los microorganismos benéficos (antagonistas) del suelo y con la aplicación del tallo finamente pulverizado, se logra recuperar un suelo contaminado con los fertilizantes químicos, transformando el mismo en fértil.

2.6. CULTIVO

2.6.1. Clima

La stevia se desarrolla muy bien en temperaturas de 24 °C a más, con buena intensidad de luz para potencializar el porcentaje de esteviósido (Zubaite 2008). Ramírez- Jaramillo *et al.* (2011) señalan que se produce en climas con lluvias que van desde 1400 a 1800 mm anuales y temperaturas entre 15-30 °C. La intensidad de luz alta y los fotoperiodos largos favorecen el desarrollo y crecimiento de los entrenudos y del área foliar.

a. Duración del día / fotoperiodo

La stevia es muy sensible a la duración del día y este influye significativamente en el crecimiento, abundancia de follaje, altura de planta, periodo de floración y acumulación de glucósido. Kudo (1974), describe que la floración de stevia se produjo a los 46 días en días con 11 h de duración y en 96 días en días con 12.5 h de duración. La producción del glucósido de esteviol se incrementa a medida que la planta avanza en el ciclo de vida y se reduce en la floración por lo que el retraso de la floración permite mayor tiempo de acumulación para el glucósido de esteviol. Por lo tanto, la calidad de stevia mejora en ambientes de días largos, donde el crecimiento vegetativo es más prolongado y la producción de glucósidos de esteviol será mayor.

Para Brandle *et al.* (1998), la stevia requiere días largos para acumular mayor cantidad de glucósidos. Metivier y Viana (1979) señalan que el rendimiento de los compuestos edulcorantes presentes en el tejido foliar varía con la duración del día y que los días largos favorecen el desarrollo del área foliar y el rendimiento de hojas y en un 50 por ciento de incremento en la concentración de esteviósido stevia se cultiva como un cultivo perenne en regiones subtropicales, donde los días más largos favorecen el rendimiento de las hojas y el contenido de esteviósido (Goettemoeller y Ching 1999). Los fotoperiodos largos favorecen el desarrollo y crecimiento de los entrenudos y del área foliar (Oviedo-Pereyra *et al.* 2015).

b. Temperatura

Sumida (1980), señala que el rango de temperatura óptimo para el crecimiento de stevia es 15-30 °C, aunque la planta puede tolerar una temperatura crítica de 0-2 °C. Mizukami *et al.* (1983) señalan que la variación de temperatura entre el día y la noche es otro factor determinante para la producción de esteviósido. Obtuvieron el mejor crecimiento y rendimiento de esteviósido por debajo de 25/20 crecimiento y rendimiento de esteviósido por debajo de 25/20 C día / régimen nocturno.

Clemente *et al.* (2021), indican que mientras mayor sean las horas acumuladas de calor al día promueve la acumulación de glucósidos en las hojas, lo cual incrementa la producción. Barathi (2003), reporta que la temperatura máxima del día no debe exceder los 40 °C y la temperatura nocturna no debe caer por debajo de 10 °C para un crecimiento favorable de stevia. Un informe realizado por Midmore y Rank (2002), sobre la introducción de stevia en Australia, indicó que el crecimiento vegetativo se reduce cuando la temperatura es inferior a 20 °C. En la India subtropical, se ha cultivado con éxito a una temperatura régimen de 28-39 °C (Chalapathi *et al.* 1997b).

Hossain *et al.* (2017) señalan que la calidad del producto de stevia depende de la temperatura de secado; las altas temperaturas afectan negativamente la calidad y el valor medicinal. Ljaz *et al.* (2015), indican que los rangos de temperatura apropiados para el desarrollo de la stevia son de 15 a 35°C.

La stevia en su estado natural, crece en la región subtropical, semihúmeda de América, con precipitaciones que oscilan entre 1 400 a 1 800 mm, distribuidos durante todo el año; además, de alta intensidad solar (heliofanía) (Martínez 2015). El exceso de lluvias durante la

polinización puede reducir tanto la producción de semillas como la germinación. Temperaturas que van desde los 24 a 28 °C (Martínez 2015); con un óptimo entre 18 a 30°C, no puede soportar temperaturas invernales por debajo de -6 °C (Cueva 2016); humedad relativa de 75 a 85 por ciento.

c. Luz

Los estudios realizados por Metivier y Viana (1979) habían indicado que, para mantener las plantas en estado vegetativo, se debe tener una intensidad de luz de 0.089 cal cm². La stevia es esencialmente una planta amante del sol, ya que la planta prosperó en un clima cálido, húmedo y soleado (Jia 1984).

En su hábitat natural silvestre crece junto con pastos altos bajo sombra parcial. Por tanto, la productividad es pobre. El efecto negativo de la sombra fue confirmado por las observaciones realizado por Slamet y Tahardi (1988). Confirmaron que la sombra redujo el crecimiento y tasa de floración. Además, alrededor del 60 por ciento de reducción de la luz retardo la floración, disminuyó la producción de biomasa vegetal, disminuyó significativamente el porcentaje de plantas con flores. La intensidad de luz alta favorece el desarrollo y crecimiento de los entrenudos y del área foliar (Oviedo-Pereira *et al.* 2015).

La planta requiere al menos aproximadamente 13 y 14 horas según el ecotipo (Miao *et al.* 2016), ya que promueve la producción de hojas y prolonga el periodo de crecimiento antes de la floración, dado que la síntesis de esteviósidos se reduce justo en la floración o antes de la misma, una floración retrasada permite más tiempo para la acumulación de esteviósido (Cueva 2016). La mayor eficiencia en la conversión de asimilados a la producción de biomasa en la especie ocurre al inicio de la floración, la misma etapa en la que se observan los niveles más altos de esteviósido y rabaudiósido A, debido a la mayor expresión de los genes involucrados (Gomes *et al.* 2017).

2.7. MANEJO DEL CULTIVO

El rendimiento de los compuesto edulcorantes de stevia depende del genotipo, del método de propagación y de las técnicas agronómicas empleadas (Wölwer-Riecker 2012; Pande y Gupta 2013). Las técnicas para el cultivo comercial deben obtener mayor producción por unidad de superficie debiendo darse especial atención al suelo y su composición, trasplante en época adecuada, densidad, fertilización, riego y labores culturales (Molinas 1989).

2.7.1. Suelos

En forma silvestre prospera cerca de arroyos de la parte selvática subtropical del alto Paraná en terrenos arenosos poco fértiles y de buen drenaje (Kujur *et al.* 2010).

La planta se puede cultivar en una amplia gama de suelos, pero tiene poca tolerancia a la salinidad (Chalapathi *et al.* 1997a). Desarrolla muy bien en un clima subtropical caliente y húmedo en suelo ligeramente ácido, arcillo-arenoso, húmedo y bien drenado (Melillo 2000).

Zubaite (2008) reporta que la stevia, es una planta que se adapta bien a diferentes tipos de suelos, como por ejemplo a los del norte del país, en Ecuador y Colombia.

El suelo adecuado para el desarrollo de la planta es de tipo areno-arcilloso, franco y franco-arcilloso, con una porción regular de humus, además se adapta a pH entre 6.5 y 7.5 (Ramírez-Jaramillo *et al.* 2011).

Se desarrolla mejor en suelos profundos franco arenoso y debe tener un buen drenaje con un pH de 4 y 5 bajo en sales (Ruiz *et al.* 2013).

Los suelos óptimos para el cultivo de la stevia, son aquellos con pH 6.5-7, de baja o nula salinidad, con mediano contenido de materia orgánica, de textura franco arenosa a franco, y con buena permeabilidad y drenaje; no tolera suelos con exceso de humedad ni los de alto contenido de materia orgánica, principalmente por problemas fúngicos que pueden causar grandes pérdidas económicas (Martínez 2015).

2.7.2. Semillas u otras estructuras vegetales empleadas en la siembra

En general, la germinación de semillas es un problema en Svevia (Shahid *et al.* 2014; Rossi *et al.* 2018). Los papus como parte de la estructura de las semillas reducen el contacto con el suelo por lo que la absorción del agua es menor reduciendo el porcentaje de germinación (Carneiro y Guedes 1992). Shahid *et al.* (2014) señalan una germinación entre el 10 al 38 por ciento. Rossi *et al.* (2018) reporta una germinación cercana al 37.5 por ciento en semillas negas en un periodo de 12 días en papel de germinación humedecido.

Las etapas de desarrollo de la planta de stevia incluye: la germinación y crecimiento de planta, la germinación de semillas puede ser con el uso de papel germinado (Carneiro 2007).

Esta baja germinación determina el empleo de estructuras vegetativas como los esquejes y por división de raíces (Ramesh *et al.* 2006; Smitha y Umesha 2011). Esta planta se siembra generalmente por esquejes (porción del tallo que se enraíza), de los que se pueden empezar a ver resultados en dos semanas (Cortés 2012) y se corre el riesgo fitosanitario de propagar plantas contaminadas con enfermedades. El uso de esquejes de 15 cm dio un porcentaje de brotación significativamente mayor con un mejor crecimiento de brotes y raíces que esquejes de 7.5 cm (Chalapathi *et al.* 1999, 2001).

Aparentemente el método de propagación influye en la calidad de la stevia. Tamura *et al.* (1984) compararon plantas cultivadas de semillas, esquejes y cultivo de la punta del tallo y concluyó que el rendimiento de los compuestos edulcorantes presentes en el tejido foliar puede variar según el método de propagación.

Tateo *et al.* (1998), señalan que el uso de semillas puede generar variación en el contenido de esteviósido considerando que las semillas provienen de cruza que van ocurriendo en las diferentes generaciones de cultivo por el tipo de polinización cruzada de stevia. Por lo tanto, las plantas desarrolladas a partir de esquejes serían más uniformes y estables en su contenido de esteviósido. Según Cueva (2016), las nuevas técnicas de producción mejoran sustancialmente el rendimiento y la calidad de la hoja, en comparación a los sistemas tradicionales de producción no tecnificados.

2.7.3. Espaciamento / densidad de cultivo

La densidad de siembra y la fecha de trasplante son los factores agronómicos más importantes que puede afectar la calidad y cantidad del rendimiento (Megeji *et al.* 2005).

2.7.4. Época de siembra

Depende de la zona de siembra. Lo importante es evitar la presencia de factores estresantes. Siembras de verano pueden coincidir con climas secos y con poca humedad de suelo que limitarían el establecimiento del cultivo. Siembras a finales de otoño podrían ser afectados por baja temperatura y menos tiempo para el desarrollo de la planta. Por otro lado, las siembras de primavera se ven favorecidas por climas más favorables para el cultivo. Las plantas son más productivas cuando esquejes enraizados se colocan lo más temprano posible en la primavera (Lee *et al.* 1979).

2.7.5. Manejo de nutrientes

Dado que la hoja es la parte económica de este cultivo, se presume que una mayor aplicación de nutrientes puede ayudar a un mayor rendimiento. Los síntomas visuales de la deficiencia de nutrientes en stevia se manifiestan para: N con coloración amarillenta de las hojas, para P como hojas de color verde oscuro y para K como hojas cloróticas y moteadas. Las deficiencias de nutrientes secundarios, se reportan como necrosis apical, clorosis y necrosis en forma de "V" invertida, y pequeñas hojas de color verde pálido para Ca, Mg y S, respectivamente (Utumi *et al.* 1999).

La aplicación de materia orgánica ayuda a incrementar la producción de stevia (Díaz *et al.* 2020). Sin embargo, una fertilización adecuada permite que la planta tenga un buen desarrollo, así como también una mayor síntesis de glucósidos (Kumar *et al.* 2012).

Se informa que existe una estrecha asociación entre el suministro de nutrientes y la acumulación de esteviósido en diferentes estudios realizados. Sheu *et al.* (1987) informan que en experimentos empleando soluciones nutritivas registraron mayores contenidos de esteviósido y rebaudiósido con aplicaciones de boro de 5 ppm. Filho *et al.* (1997) señalan que una deficiencia severa de Ca provocó una reducción en la concentración de glucósidos. Utumi *et al.* (1999), indicaron que las deficiencias de K, Ca y S disminuyeron la concentración de esteviósido en la planta en base al peso seco. Rodríguez *et al.* (2016) reportan que la aplicación de nitrógeno es esencial para el desarrollo de la planta en zonas de clima seco.

Según Benhmimou *et al.* (2018), el mayor contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en el suelo favorece en el desarrollo de la biomasa fresca, producción de hoja fresca y seca.

2.7.6. Manejo de malezas

La stevia tiene poca capacidad para competir con las malezas durante la fase inicial del período de crecimiento. Por estas razones, el manejo de malezas juega un papel vital en las buenas prácticas de manejo del cultivo desde la primera etapa del cultivo. Dentro de los métodos de control cultural se señala el manejo de una alta densidad de plantas y el uso de un mantillo de plástico negro. La elección de herbicida dependerá del espectro de malezas asociado con el cultivo.

2.7.7. Manejo de enfermedades y plagas

Lo que se cosecha de la planta son las hojas, las cuales deben tener un manejo totalmente orgánico (Cortés 2012). En este cultivo se presentan diferentes enfermedades, por ejemplo, manchas causadas por *Septoria sp.*, *Alternaria sp.* lo cual disminuye la calidad comercial (Salazar 2015). Es por ello, que las evaluaciones en este cultivo deben ser constantes, considerando indicadores que permitan tomar decisiones en el momento indicado para el control efectivo de los factores estresantes bióticos.

2.7.8. Requerimientos de agua

En hábitat natural, la esteva desarrolla en lugares con alto nivel de agua subterránea o con suelo continuamente humedecido. Por lo tanto, no puede crecer en condiciones secas. Esta planta presenta poca o moderada resistencia a la sequía, el agua es importante en el rendimiento final de la materia seca, por lo cual el riego, es importante para emprendimientos empresariales que trabajen con este cultivo. La planta desde el momento de la plantación necesita de riego, éste debe de ser diario hasta que se inicie la brotación, luego cuando sea necesario y en cantidad suficiente, tampoco usar más agua de lo necesario, para esto se debe tener en cuenta la relación suelo-agua-planta (Molinas 1989).

El riego por aspersión resulta ventajoso ya que la planta es muy sensible al estrés hídrico y requiere riego frecuente y ligero. Durante el verano, el riego con un intervalo de 3-5 días da los mejores resultados. Para reducir el impacto de sequía y alta temperatura, se recomienda la adición de mantillo alrededor de la planta (<http://assamagibusiness.nic.in/nedfi/map18.pdf>).

Requiere riego abundante después del trasplante, y antes y después de la recolección de las hojas (Andolfi *et al.* 2002). El promedio del requerimiento de agua por día es de 2.33 mm por planta (Goenadi 1983).

Según Behera *et al.* (2013), el riego por goteo es más efectiva, sino también favorece la disponibilidad de nutrientes, lo que favorece al incremento de la biomasa de la planta, bajo estrés hídrico la planta de stevia acumula mayor cantidad de stevioside pero reduce la cantidad de hojas (Benhmimou *et al.* 2017).

Según Fronza y Folegatti (2003), en las etapas iniciales de desarrollo de la planta. El consumo de agua es mayor, así como la evapotranspiración, esto debido a que el área foliar es pequeña.

2.7.9. Cosecha

La stevia, es una planta que cuenta con un ciclo de cultivo y producción que abarca aproximadamente ocho meses (Zubaite 2008). El tiempo de la cosecha depende del tipo de tierra, el tipo de stevia y la temporada de crecimiento. Zubaite (2008) señala que la primera cosecha se inicia a los dos meses, logrando al año siete cosechas con una planta en producción por 5 o 6 años. Por otro lado, Hossain *et al.* (2017) reportaron que la primera cosecha puede ser realizada cuatro meses después de la siembra y luego se cosecha una vez cada 3 meses y la concentración de steviosida en las hojas es mayor cuando las plantas de stevia son cultivadas en días largos y cuando estas plantas se cosechan justo antes de la floración.

Según Osorio (2007), se cosecha regularmente durante todo el año y el rendimiento esperado es de 2 000 a 3 000 kg de hoja seca por año. También señala que en Paraguay se puede llegar a un rendimiento de 3 000 kg/ha, y generar una ganancia bruta de \$1 800/ha, aunque existen agricultores que producen considerablemente más que esto, alcanzando inclusive los 5 000 kg/ha por año. El cultivo puede ser cosechado de dos a cuatro veces por año. Cueva (2016), indica que en altitudes menores a los 1 000 m.s.n.m. los rendimientos alcanzan las 12 t/año considerando un distanciamiento de 0.20 m entre plantas y 0.40 m entre surcos, 8 cosechas al año y terrenos con buenas características edáficas.

La técnica de recolección más sencilla es cortando las ramas con tijeras de podar antes de quitar las hojas. La punta de los tallos se puede cortar, ya que contienen tanto esteviósido como las hojas. En promedio, se pueden obtener tres cosechas comerciales en un año. Es mejor cortar las plantas dejando una porción de tallo de unos 10 cm del suelo para favorecer el rebrotamiento (<http://assamagibusiness.nic.in/nedfi/map18.pdf>).

2.7.10. Secado

El proceso de secado elimina la humedad de las hojas. Un mal secado puede reducir la calidad visual, organoléptica, textura, aroma, contenido de aceite esencial y forma.

La alta temperatura afecta negativamente la calidad final del producto, disminuyendo sus propiedades medicinales y su valor comercial (Cuervo *et al.* 2012).

En producciones de pequeña escala las plantas recién cosechadas se pueden colgar boca abajo y secar a la sombra, unas 12 horas, más tiempo puede afectar la cantidad del esteviósido. Una vez secas las plantas se separan las hojas y se empaquetan y almacenan en un lugar fresco y seco. En producción de gran escala se usan estufas u hornos de secado utilizando un sistema de circulación de aire caliente.

2.8. MICROPROGACIÓN

El porcentaje de germinación de las semillas de *Stevia rebaudiana* es muy bajo y las plantas producidas son heterogéneas, por lo que no es conveniente para la propagación masiva de variedades de alta calidad. De igual modo la propagación vegetativa no produce suficientes plantas de calidad para una producción en gran escala y requiere mucha mano de obra y su éxito depende de la estación del año. Se han desarrollado muchas investigaciones relacionadas al cultivo *in vitro* de stevia que muestran que muchas técnicas permitirían obtener plantas de alta calidad en cantidades requeridas.

Ahymed *et al.* (2007) utilizando segmentos nodales regeneraron brotes de *Stevia rebaudiana* y reportan que la mayor cantidad de brotes se observaron en el medio MS complementado con 1.5 mg l BA + 0.5 mg l Kn y el porcentaje de enraizamiento más alto igual a 97.66 por ciento se registró en medio MS con 0.1 mg l de IAA. Al-zubaidy *et al.* (2020) utilizando medio MS con 2.0 mg.l de ANA y 0.5mg l de TDZ indujo la formación de callos. Según Salem (2020), el tamaño de brotes, número de nudos por brote, número de hojas fue mejor en el medio MS sin reguladores de crecimiento y la concentración de BAP mayor de 0.5 mg.L puede actuar en forma negativa (Aguilar *et al.* 2019).

Muchos autores señalan la importancia de considerar factores que influyen en el éxito del cultivo *in vitro* como la composición del medio de cultivo, los genotipos de los donadores, las diferentes hormonas que incrementan y aceleran la producción *in vitro* de plantas con buenos caracteres agronómicos y buen contenido de esteviosidos en las hojas (Durán *et al.* 2013; Jain *et al.* 2014; Philipe *et al.* 2014).

Oviedo – Pereira *et al.* (2015) muestran un resumen de investigaciones realizadas en micropropagación y aclimatación de stevia en un periodo de cinco años. Informan que el explante más empleado es el segmento nodal y otros como: yema axilar, yema apical, hoja cotiledonal, segmento apical, brote apical, microtallos y segmentos internodales. De igual modo señalan que el medio de cultivo utilizado es el de Murashige & Skoog con los reguladores de crecimiento benciladenina (BA), ácido-3-indolbutírico (AIB), cinetina (KIN), cloruro de clorocolina (CCO:), ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), tiazurón (TDZ), ácido giberélico (AG3), Zeatin: zeatina, 2,4-D: ácido 2,4 diclofenoxiacético. Informan que los sistemas empleados fueron frascos Gerber, tubos de ensayo, RITA^R y BIT^R, matraz y frascos de plástico. Reportan una tasa de multiplicación de 2.68 a 36.9 brotes /explantes. Señalan el uso de diversos sustratos de aclimatación como mezclas de tierra+ abono + arena, tierra + vermiculita, tierra + soilrite, tierra+ arena + vermiculita, tierra + peatmoss R+ vermiculita, tierra + abono, tierra, peatmoss R + agolita, tierra + arena + peat moss R, turba, tierra + arena+ vermicompost, arena + tierra + turba, turba + perlita, coco picado + arena, peat moss R + arena. Finalmente reportan un rango de sobrevivencia de plantas de 65.8 a 97 por ciento.

Bondarev *et al.* (2001) señalan que el contenido de glucósidos de esteviol en material cultivado *in vitro* ha sido de cinco a seis veces menor que en las plantas de crecimiento de campo.

Khan *et al.* (2016), establecieron un protocolo para inducir múltiples brotes en un periodo de 6 meses empleando segmentos nodales y el medio de cultivo fue Murashige and Skoog (MS) por dos semanas posteriormente fortificado con 6 benzyl aminopurine (BAP) con y sin urea (5mg/L) por un periodo de 40 días produciendo 44.56 de brotes de un solo segmento nodal en el medio suplementado con urea muy superior a los 22-44 brotes obtenidos en el tratamiento sin urea. Los análisis genéticos posteriores mostraron que las plantas eran genéticamente iguales.

Yücesan *et al.* (2016) estudiaron la regeneración en un periodo de 6 semanas tomando al azar nudos de plántulas germinadas *in vitro* y cultivadas en medio sólido Murashige y Skoog. (MS) con o sin reguladores del crecimiento (6-bencilaminopurina-BAP o kinetina-KIN) en varias concentraciones (0.1 a 2.0 mg / L). Independientemente de la composición del medio, los resultados mostraron que todos los tratamientos fueron efectivos para la inducción de

brotos, produciendo un promedio de 2 brotes por explante después tres semanas de cultivo. Después del subcultivo subsiguiente en medio MS a intervalos de 3 semanas, todos los brotes regenerados de los nudos se transfirieron a medio MS con o sin ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA) o ácido naftaleno acético (NAA) en dos concentraciones diferentes (0.25 o 0.50 mg / L) para la formación de raíces durante 3 semanas. IAA promovió mejor la formación de raíces, produciendo 7.6 raíces por brote con una frecuencia de enraizamiento del 100 por ciento. Todos los regenerantes (~13.5 cm de longitud) se colocaron en macetas y aclimatado con éxito en un invernadero durante 2 semanas, y luego transferido al campo durante 14 semanas con una alta tasa de supervivencia (> 99 por ciento). De manera similar, las plántulas (8 semanas de edad) derivadas de la germinación de semillas en las macetas también se transfirieron al mismo campo en una parcela diferente. No hubo diferencia significativa en términos de composición morfológica, rendimiento y glucósidos de esteviol entre regenerantes y plántulas muestreadas de dos períodos de desarrollo (período vegetativo tardío y período de floración). Con este estudio se demostró que la propagación clonal utilizando explantes nodales es eficaz para una producción de plantas madre de calidad con alto contenido de Reb-A (11.7 por ciento p / p).

Vives *et al.* (2017) evaluaron la producción de biomasa y glucósidos de esteviol a los 21 días de cultivo en dos tratamientos medio semisólido, medio líquido y BIT® y observaron una mejor calidad morfológica de brotes con peso fresco y seco superiores en el tratamiento BIT® y también un mayor contenido de glucósidos de esteviol en los biorreactores.

La stevia y extractos de stevia son considerados inocuos en su uso como edulcorante de mesa bajo ciertas condiciones. El Organismo Europeo de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda una dosis máxima diaria de 4 mg por kilogramo de peso corporal, para estar seguros, la misma dosis máxima es recomendada por la Organización Mundial de Salud (OMS).

2.9. MEJORAMIENTO

2.9.1. Herencia Genética

Brandle (1999) citado por Yadav *et al.* (2011), reporta un estudio sobre el control genético de dos glucósidos, rebaudiósido-A y rebaudiósido-C. Utilizando una población F2 derivada de cruces entre dos grupos de progenitores con contenidos de glucósidos divergentes. En el primer grupo que la presencia / ausencia de rebaudiosida-A en la F2 está controlada por un

solo gen dominante y que las proporciones reales de rebaudiosida-A son controlados por múltiples loci o alelos. En un segundo grupo, encontraron que las proporciones de rebaudiósido-A y rebaudiósido-C co-segregan y eran controlados por un solo gen aditivo. Este resultado sugirió que tanto el rebaudiósido-A como el -C son sintetizado por la misma enzima.

Brandle y Rosa (1992) citados por Yadav *et al.* (2011), estudiaron la heredabilidad (h^2) de tres caracteres económicamente importantes, como el rendimiento de hojas, relación hoja: tallo y esteviósido (62.1, 78.8 y 76.6, respectivamente) y señalaron que los resultados muestran alta heredabilidad y la posibilidad de mejorar estos caracteres.

Yadav *et al.* (2011), señalan que el esteviósido y rebaudiósido-A están correlacionados negativamente, mientras que rebaudiósido-A y -C están correlacionados positivamente.

2.9.2. Métodos de Mejoramiento Genético

a. Selección e hibridación

Según Yadav *et al.* (2011), el mejoramiento de la calidad de stevia puede ser realizado empleando los métodos convencionales de selección e hibridación en esta especie alógama con alto porcentaje de polinización cruzada. Usando estos métodos se han patentado genotipos con mayor cantidad de glucósidos, como RSIT 94-1306, RSIT 94-75, RSIT 95-166-1.

b. Inducción de mutaciones

Mejoramiento de mutaciones La mutagénesis es una herramienta potencial para ampliar la variabilidad y aislar los caracteres económicos deseables en un período más corto que con el método de hibridación. La irradiación con rayos gamma de cobalto-60 ha se ha utilizado para inducir variación en stevia y se observó que la irradiación gamma no afecta la germinación de las semillas, pero en dosis más altas suprimen el desarrollo de las raíces (Toruan *et al.*1995).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos *in vitro* del Instituto de Biotecnología – IBT, de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en La Molina, provincia Lima, departamento Lima. Perú.

3.2. MATERIAL VEGETAL

Tres genotipos de la colección de stevia (*Stevia rebaudiana*) del IBT.

- IBT-1: variedad Morita II, desarrollada por Toyoshigue Morita e introducida al Perú.
- IBT-2: variedad Miskibamba derivada de Morita II
- Línea avanzada IBT-3: Es un clon mutante derivado de la variedad Miskibamba mediante radiación gamma con la dosis de 20 Gray en el Laboratorio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Agraria La Molina.

3.3. INSUMOS DE LABORATORIO

Se emplearon cuatro medios de cultivo y sus diferencias se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Medios de cultivo usados en la propagación clonal de tres genotipos de stevia (*stevia rebaudiana*)

Medio de cultivo	Composición			
	MS	BAP	ANA	Sacarosa
M1	Completo	-	-	30 g
M2	Completo	1 mg/L	0.1 mg/L	30 g
M3	Completo	1.5 mg/L	0.1 mg/L	30 g
M4	Completo	2.5 mg/L	0.1 mg/L	30 g

MS: Medio Murashige & Skoog (1962). Compuesto por: nitrato de amonio (1650 mg/L), nitrato de potasio (1900 mg/L), cloruro de calcio (332.2 mg/L), y fosfato de potasio (170 mg/L), ácido bórico (6.2mg/L), cloruro de cobalto(0.025mg/l),sulfato de cobre (0.025mg/L) Na₂EDTA(37.26mg/L)sulfato de magnesio (180.7mg/L), sulfato de hierro 7H₂O (27.8mg/L),sulfato de manganeso(16.9)molibdato de sodio (0.025mg/L)Ioduro de Potasio (0.83mg/L)Sulfato de Zinc(8.6mg/L) (tiamina (0.4 mg/L), glicina (2.0 mg/L), ácido nicotínico (0.5 mg/L), piridoxina (0.5 mg/L), ácido fólico (1 mg/L), arginina (4 mg/L). myoinositol (100 mg/l).

La concentración de sacarosa de 30g/l. El pH se ajustará a un pH de 5.8 antes de la esterilización por vapor en la autoclave.

3.4. MATERIALES

- Frascos de vidrio estériles
- Frascos de Erlenmeyer
- Bioreactores (frascos gemelos, Erlenmeyer transparente de 500 ml, un Erlenmeyer vacío estéril para los explantes y otro Erlenmeyer para el medio de cultivo líquido)
- Macetas, sustrato PREMIX 3 estéril y otros

3.5. EQUIPOS

- Cabinas de flujo laminar
- Autoclaves
- Cámaras edafoclimáticas

Las cámaras edafoclimáticas, también llamadas cámaras de pruebas o fitotrones permiten programar climas determinados mediante la programación de luz, temperatura y humedad característicos de una zona o región con total precisión y fiabilidad y permite estudiar la influencia de las condiciones climáticas en el desarrollo de las plantas (Cantero 2014).

A grandes rasgos, las cámaras edafoclimáticas pueden dividirse en cámaras de clima constante y cámaras de clima variable. Las cámaras de clima constante se utilizan normalmente para pruebas de estabilidad a largo plazo y mantienen la temperatura y la humedad en un nivel definido. En las cámaras de clima variable pueden realizarse ciertos programas, en los que la temperatura y humedad cambian automáticamente en intervalos definidos. El tamaño de estas cámaras varía desde 5 000 litros de volumen interior, hasta 25 000 litros o incluso dimensiones a medida diseñados especialmente para la investigación en los campos de la biotecnología (Cantero 2014).

Con el control total y la gran homogeneidad de las condiciones climáticas, estas cámaras pueden proporcionar temperatura, luz, humedad, presión, CO², e incluso simular el viento con el fin de reproducir todas las condiciones climáticas necesarias que la investigación puede requerir. Son fácilmente programables para diferentes simulaciones ambientales (Figura 1). En este estudio se emplearon las cámaras edafoclimáticas Aralab.



Figura 1. Cámara edafoclimática Aralab

Fuente: <http://www.aralab.pt/es/produtosmetodología>

3.6. METODOLOGÍA

3.6.1. Experimento 1

- a. Desarrollo de un protocolo de propagación clonal *in vitro* de tres genotipos de stevia (IBT1 (Morita II), IBT2 (Miskibamba), IBT3(Clon mutante))
 - Se seleccionaron y prepararon los explantes (entrenado con dos yemas) provenientes de plantas madres cultivadas *in vitro* libre de enfermedades.
 - Se preparó y esterilizó los cuatro medios de cultivo.
 - Se colocó 25 ml de los cuatro medios semisólidos esterilizado en frascos de vidrio estéril (7 cm de alto, 6 cm de diámetro).
 - Se programó un periodo de incubación de 30 días con las siguientes características: fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Se emplearon lámparas de luz blanca fluorescente que garantizan un flujo de fotones fotosintéticos de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, humedad relativa entre 60-70 por ciento.
 - Propagación clonal o sub cultivo de plántulas siguiendo el protocolo establecido en cabinas de flujo laminar.
 - Aclimatación. Se realizó con plántulas *in vitro* con 10 cm de altura. Se sacaron de los frascos, se lavaron las raíces de las plántulas eliminado completamente el agar, y fueron sembradas en bandejas de 65 celdas conteniendo el sustrato PREMIX 3 estéril humedecido con agua des ionizada. Las bandejas con las plántulas sembradas fueron colocadas en el invernadero, con túneles provisto de un plástico para evitar la deshidratación.

Tabla 2: Detalle de los medios de cultivo del Experimento 1

Medio de cultivo	Composición			
	MS	BAP	ANA	Sacarosa
M1	Completo	-	-	30 g
M2	Completo	1 mg/L	0.1 mg/L	30 g
M3	Completo	1.5 mg/L	0.1 mg/L	30 g
M4	Completo	2.5 mg/L	0.1 mg/L	30 g

b. Evaluaciones en la fase de propagación *in vitro* en frascos o método convencional

Las evaluaciones se realizaron en 10 plántulas tomadas al azar.

- Altura de plántula (cm): se midió con un vernier electrónico del ápice al cuello de la raíz.
- Número de hojas por plántula: se contó todas las hojas formadas
- Peso fresco de plántula (g): se pesaron las plántulas en una balanza de precisión.
- Número de raíces de cada plántula: se contó todas las raicillas formadas
- Longitud de las raíces de las plántulas (cm): se midió con el vernier electrónico del cuello a la punta de la raíz más larga.
- Número de plántulas generadas por cada explante

c. Evaluaciones en la fase de aclimatación

Se tomaron 20 plantas al azar para esta evaluación a los 30 días después de iniciado el proceso de aclimatación.

- Supervivencia: el porcentaje de supervivencia de las plantas fue medido contando el número de plantas que han logrado sobrevivir, después del trasplante con desarrollo saludable a lo largo del experimento, esta variable fue medida cada 7 días.
- Altura de planta (cm): fue medida con la ayuda de un vernier electrónico, desde la base de la planta hasta el extremo distal de la hoja más joven en forma individual.
- Presencia de raíces: se tomaron al azar las plantas por tratamiento para visualizar la presencia o ausencia de raíces.
- Longitud de raíces (cm): se midió las raíces de las plántulas individualmente con un vernier electrónico.
- Peso Fresco de las plantas aclimatadas (g): Se pesaron con una balanza electrónica.

d. Diseño experimental

Para el análisis estadístico se consideró un diseño completamente al azar. En la etapa *in vitro* se consideró lo siguiente:

- Los tratamientos fueron: IBT-1, IBT-2 y Línea avanzada IBT-3. Además, se consideraron 4 medios de cultivo: M1, M2, M3 y M4.
- Repeticiones: 10 frascos con 25 plantas en cada frasco, para cada medio de cultivo.

Por otra parte, en la etapa de aclimatación se consideró lo siguiente:

- Tratamiento: IBT-1, IBT-2 y Línea avanzada IBT-3. Repeticiones: 100 plantas/tratamiento.

3.6.2. Experimento 2

a. Desarrollo de un protocolo para la propagación clonal de genotipos de stevia en un sistema de biorreactores de inmersión temporal:

- Se seleccionó y preparo los explantes (entrenado con cuatro yemas) de los genotipos provenientes de plantas madres cultivadas *in vitro* libre de enfermedades. Se usaron plántulas del tercer sub cultivo de la fase de multiplicación.
- Preparación y esterilización del medio líquido (Murashige & Skoog 1962) para los bioreactores. Se utilizaron frascos gemelos, Erlenmeyer transparente de 500 ml. Se emplearon los medios M1, M2, M3 y M4.
- En un Erlenmeyer se sembraron 30 entrenados con 4 yemas y en el otro Erlenmeyer se colocó el medio de cultivo líquido. Ambos frascos están interconectados con mangueras de silicona y cerradas herméticamente con tapas de jebe. Se utilizó una inmersión de cinco minutos en intervalos de tres horas regulado por el temporizador (MICRO PC-MOLLER R) que al mismo tiempo controló el fotoperíodo. Se siguió el protocolo establecido por Escalona *et al.* (1999).
- Después de 30 días se sacaron las plántulas ya desarrolladas. Se evaluaron la altura de planta, número de entrenados, número de hojas, peso fresco y peso seco y se sub cultivaron en frascos con medio MS semisólido, 30 explantes por frascos e incubadas a una temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad durante 30 días.

- Respecto a la aclimatación, después de 30 días de incubación se sacaron plántulas con 10 cm de altura de los frascos, se lavaron las raíces de planta eliminando en su totalidad el agar. Se sembraron en bandejas de 65 celdas conteniendo el sustrato PREMIX 3 estéril humedecido con agua des ionizada. Estas bandejas con plántulas fueron colocadas en un invernadero, con túneles provisto de un plástico para evitar la deshidratación.

Tabla 3: Detalle de los medios de cultivo del Experimento 2

Medio de cultivo	Composición			
	MS	BAP	ANA	Sacarosa
M1	Completo	-	-	30 g
M2	Completo	1 mg/L	0.1 mg/L	30 g
M3	Completo	1.5 mg/L	0.1 mg/L	30 g
M4	Completo	2.5 mg/L	0.1 mg/L	30

- b. Evaluaciones en la fase de propagación en biorreactores de inmersión temporal
- Altura de plántula (cm): se midió con un vernier electrónico del ápice al cuello de la raíz.
 - Número de hojas por plántula: Se contó todas las hojas formadas.
 - Peso fresco de plántula (g): se pesaron las plántulas en una balanza de precisión.
 - Número de raíces de cada plántula: se contó todas las raicillas formadas.
 - Longitud de las raíces de las plántulas (cm): se midió con el vernier electrónico del cuello a la punta de la raíz más larga.
 - Número de plántulas generadas por cada explante

c. Evaluaciones en la fase de aclimatación

Se tomaron 20 plantas al azar para esta evaluación a los 30 días después de iniciado el proceso de aclimatación:

- Sobrevivencia: El porcentaje de sobrevivencia de las plantas fue medido contando el número de plantas que han logrado sobrevivir, después del trasplante con desarrollo saludable a lo largo del experimento, esta variable fue medida cada 7 días.
- Altura de planta (cm): fue medida con la ayuda de un vernier electrónico, desde la base de la planta hasta el extremo distal de la hoja más joven de la planta en forma individual.

- Presencia de raíces: se tomaron al azar las plantas por tratamiento para visualizar la presencia o ausencia de raíces.
- Longitud de raíces (cm): se midió las raíces de las plántulas individualmente con un vernier electrónico.
- Peso fresco de las plantas aclimatadas (g): Se pesaron con una balanza electrónica.

d. Diseño Experimental

Para el análisis estadístico se consideró un Diseño Completamente al azar. En la etapa *in vitro* se consideró lo siguiente:

- Los tratamientos fueron: G1.-IBT-1, G2.-IBT-2 y G3.-Linea avanzada IBT-3. Además, se consideraron 4 medios de cultivo: M1, M2, M3 y M4.

Repeticiones: 10 frascos con 25 plantas en cada frasco, para cada medio de cultivo Por otra parte, en la etapa de aclimatación se consideró lo siguiente:

- Tratamiento: G1.-IBT-1, G2.-IBT-2 y G3.-Linea avanzada IBT-3. Repeticiones: 100 plantas / tratamiento.

3.6.3. Experimento 3

a. Evaluación del contenido de esteviósido y el rebaudiósido en genotipos propagadas en micropropagación convencional *in vitro* y en sistemas de biorreactores de inmersión temporal

- Se seleccionó plantas aclimatadas, muy bien desarrolladas, de cada genotipo en los experimentos 1- propagación *in vitro* convencional y del experimento 2 – propagación en biorreactores de temporal.
- En las en las hojas secas de plantas seleccionadas se determinó el contenido de esteviósido y el rebaudiósido, siguiendo el protocolo establecido en los laboratorios de AJE procesos.
- Se determinó el efecto de los dos tipos de propagación clonal en el contenido de esteviósido y el rebaudiósido de los genotipos estudiados

3.6.4. Experimento 4

a. Evaluación del efecto de dos ambientes controlados el rendimiento y calidad de genotipos de stevia

- Se programó las cámaras edafoclimáticas con climas de Sullana-Perú y de Misiones-Paraguay (centro de origen de stevia), tal como se describe en la Tabla 4.
- Se sembraron las plantas aclimatadas de los ensayos 1 y 2 en macetas 500 g con sustrato estéril PREMIX 3.

Tabla 4: Ambientes de Sullana – Perú y misiones - Paraguay y programados en las cámaras edafoclimáticas

Sullana, Perú (Valores Promedios 2021-2022)			Misiones, Paraguay (Valores Promedios 2021-2022)		
Hora (h)	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Hora (h)	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)
0-0	20	80	0-0	21	76
0-6	19.7	81.6	0-6	18.8	83.3
6-11	20.6	77.7	6-11	24.4	58
12-5	28.1	52.7	12-5	35	22.5
6-6	28.7	50.9	6-6	28.7	34.3
7-12	23.8	66.6	7-12	26.3	36

b. Evaluaciones

Se seleccionaron 10 plantas al azar con 60 días de periodo de crecimiento y se realizaron las siguientes evaluaciones:

- Altura de planta (cm): Se midió con la ayuda de una regla desde el ápice hasta el cuello de la raíz.
- Número de tallos / planta.
- Número de hojas por planta.
- Peso fresco de los tallos y hojas (g): Se pesó con una balanza de precisión.
- Peso seco de tallos y hojas (g): Se pesó con una balanza de precisión.
- Vigor de las plantas: Corte de la planta, tiempo de inicio de brotamiento y floración.
- Contenido de esteviósido y el rebaudiósido en las en las hojas secas de plantas seleccionadas se determinó siguiendo el protocolo establecido en los laboratorios de AJE procesos.

c. Diseño experimental

Se consideró un diseño completamente al azar. Los tratamientos fueron: Genotipos: G1.-IBT-1, G2.-IBT-2 y G3.-Linea avanzada IBT-3. Se desarrollaron en dos ambientes: Sullana-Perú y Misiones-Paraguay. Con un total de 25 repeticiones por tratamiento.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se empleó el programa SPSS versión 11.5 (Pérez 2005). Los análisis para las diferentes variables se realizaron a través de una prueba ANOVA de un factor, ANOVA bifactorial o una prueba t, como análisis paramétricos. Después de las pruebas ANOVA de un factor y ANOVA bifactorial se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Se demostró la distribución normal y homogeneidad de varianza con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov (5 por ciento) y Levene (5 por ciento), respectivamente. Los datos de variables discretas se transformaron con la ecuación $y' = (y+0.5)0.5$ y las variables porcentuales según la ecuación $y' = 2\arccos((y/100)0.5)$. Los experimentos (mono-bi) factoriales se realizaron bajo un diseño completamente aleatorizado.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN CLONAL CONVENCIONAL *IN VITRO* DE GENOTIPOS DE STEVIA EN MICROPROPAGACION CONVENCIONAL *in vitro*

4.1.1. Experimento comparativo de cuatro medios de cultivo en micropropagación convencional

En la Tabla 5 se presentan los resultados del análisis de variancia y se puede apreciar en tratamientos diferencias altamente significativas para todas las variables evaluadas. El coeficiente de variación para altura de plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula número de raicillas/plántula fue de 12.56, 14.52, 10.96 y 18.35 por ciento; respectivamente. De igual modo, se halló una media del experimento igual a 8.92 a 4.56 cm para altura de plántula, 20 a 0 hojas/plántula, 0.235 a 0.110 g de peso fresco/plántula y de 5.04 a 0 raicillas/ plántula.

La Prueba de significación Tukey ($\alpha=0.05$) muestra diferencias significativas para todos los caracteres evaluados, como altura de plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula y número de raicillas/plántula (Tabla 6). Para altura de plántula se encontró un rango de 7.0 a 8.95 cm, de 5.55 a 13.00 para número de hojas/plántula, de 0.10 a 0.13 g de peso fresco/plántula y de 4.79 a 7.10 raicillas/plántula. Observando todos los datos evaluados se aprecia que en el medio de cultivo M1 se logra los valores más altos para altura de plántula y número de raíces /plántula y en el medio M3, el número de hojas / plántula y el peso fresco/plántula. Es importante señalar que solo se observaron raicillas en el medio M1.

Tabla 5: Cuadrados medios del ANVA de altura de plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula (G) y número de raíces/plántula de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagados en forma convencional *in vitro* en cuatro diferentes medios de cultivo

Fuente de variación	Grados de libertad	Altura plántula	Número de hojas/plántula	Peso fresco/plántula	Número de raíces/plántula
Tratamiento	3	48.62 ***	841.1 ***	0.03255 ***	63.55 ***
Error	36	0.50	3.20	0.00042	0.05
C.V (%)		12.563	14.521	10.967	18.356
Media		5.623	12.265	0.186	1.260

“***” $\alpha = 0.001$, hay diferencias altamente significativas entre tratamientos

Tabla 6: Valores medios de altura de plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula (G) y número de raíces/plántula de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagados en forma convencional *in vitro* en cuatro diferentes medios de cultivo

Tratamiento	Altura plántula (cm)	Número de hojas/plántula	Peso fresco/plántula (g)	Número de raíces/plántula
M1	8.9287 a	10.70 c	0.110 c	5.042 a
M2	4.4287 b	17.80 b	0.224 a	0.000 b
M3	4.5667 b	20.56 a	0.235 a	0.000 b
M4	4.5667 b	0.00 d	0.174 b	0.000 b

Medias con una misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

4.1.2. Experimento comparativo de micropropagación convencional *in vitro* de tres genotipos de stevia

En la Tabla 7 se presentan los resultados del análisis de variancia y se puede apreciar en tratamientos diferencias altamente significativas para todas las variables evaluadas. Se encontraron un coeficiente de variación para altura de plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula número de raicillas/plántula igual a 13.98 por ciento, 16.07 por ciento, 14.89 por ciento y 9.93 por ciento; respectivamente. De igual modo se halló una media general del experimento igual a 8.12 cm para altura de plántula, de 10.9 de hojas/plántula, 0.12 g de peso fresco/plántula y de 5.99 raicillas/ plántula.

Tabla 7: Cuadrados medios del ANVA de altura de plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula y número de raicillas/plántula de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagados en forma convencional en condiciones *in vitro*

Fuente de variación	Grado de libertad	Altura plántula	Número de hojas/plántula	Peso fresco/plántula	Número de raicillas/plántula
Tratamiento	2	10.166** *	158.6** *	0.003208* *	13.457** *
Error	27	1.288	2.63	0.000317	0.355
C.V (%)		13.98	16.07	14.89	9.93
Media		8.12	10.09	0.12	5.99

“***” $\alpha = 0.001$, hay diferencias altamente significativas entre tratamientos

De igual modo, la Prueba de significación Tukey ($\alpha = 0.05$) muestra diferencias significativas para todos los caracteres evaluados como altura de plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula y número de raicillas/plántula (Tabla 8). Para altura de plántula se encontró un rango de 7.0 a 8.95 cm, de 5.55 a 13.00 para número de hojas/plántula, de 0.10 a 0.13 g de peso fresco/plántula y de 4.79 a 7.10 raicillas/plántula. Observando todos los datos evaluados se aprecia que la línea IBT1 presenta los valores más altos para altura de plántula, número de hojas/plántula y peso fresco/plántula. Por otro lado, la línea IBT2 presenta los valores más bajos con excepción de las raicillas/plántula; difiriendo significativamente todos los valores entre estas dos líneas.

Tabla 8: Valores medios de altura de plántula (cm), número de hojas/plántula, peso fresco/plántula (g) y número de raicillas/plántula de tres genotipos de stevia (*stevia rebaudiana bertoni*) propagados en forma convencional en forma convencional en condiciones *in vitro*

Tratamiento	Altura plántula (cm)	Número de hojas/plántula	Peso fresco/plántula (g)	Número de raicillas/plántula
IBT 1	8.95 a	13.00 a	0.13 a	4.79 c
IBT 2	7.00 b	5.55 b	0.10 b	7.10 a
IBT 3	8.42 a	11.72 a	0.13 a	6.10 b

Medias con una misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

4.13. Fase de aclimatación de plantas propagadas *in vitro* convencional

En la Tabla 9 se presentan los datos obtenidos del ANOVA realizado con datos obtenidos en la fase de aclimatación de plantas de stevia de tres genotipos y se puede apreciar para tratamientos (genotipos) diferencias altamente significativas para altura de planta, número

de raíces/planta, longitud de raíces/planta y peso fresco/planta. El coeficiente de variación fue igual a 13.48 por ciento para altura de planta, de 15.28 por ciento para número de raíces, 13.64 por ciento para longitud de raíces y 14.64 por ciento para peso fresco.

Tabla 9: Cuadrados medios del ANVA de altura de planta, número de raíces/ planta, longitud de raíces/planta y peso fresco/planta de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en proceso de aclimatización

Fuente de variación	Grados de libertad	Altura planta	Número de raíces	Longitud raíces	Peso fresco
Tratamiento	2	33.32** *	104.04	33.31** *	2.1234** *
Error	27	0.87	0.86	0.55	0.0086
C.V (%)		13.484	15.281	13.638	14.644
Promedio		6.932	6.074	5.424	0.633

“***” $\alpha = 0.001$, hay diferencias altamente significativas entre tratamientos

En la Tabla 10 se presenta los valores medios de las características evaluadas y se puede apreciar que en todas ellas los genotipos presentan valores medios con diferencias altamente significativas en la Prueba Tukey ($\alpha = 0.05$). Para altura de planta se observó un rango de 5.36 a 8.93 cm, para número de raíces/planta de 3.43 a 9.67 cm, para longitud de raíces de 3.33 a 6.60 cm y para peso fresco por planta de 0.19 a 1.11 g. El genotipo IBT1 tuvo el mayor valor para altura de planta, el genotipo IBT 2 para número de raíces/planta y el IBT 3 destacó en longitud de raíces/planta y peso fresco /planta.

Tabla 10: Valores medios de altura de planta (cm), N° de raíces/ planta, longitud de raíces/planta (cm) y peso fresco/planta (g) de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en proceso de aclimatización.

Tratamiento	Altura planta (cm)	Número de raíces/planta	Longitud raíces/planta (cm)	Peso fresco /planta (g)
IBT 1	8.93 a	3.43 c	6.24 a	0.60 a
IBT 2	5.36 c	9.67 a	3.33 b	0.19 b
IBT 3	6.50 b	5.13 b	6.70 a	1.11 c

Medias con una misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

En la Tabla 11 se aprecia un porcentaje de sobrevivencia de 84.85 por ciento, de 80 por ciento y de 89.40 por ciento para IBT1, IBT2 y IBT3, respectivamente.

Tabla 11: Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en proceso de aclimatización

Tratamiento	Transplante	7 DDS	14 DDS	21 DDS
IBT 1	100	85	85	85
IBT 2	100	80	80	80
IBT 3	100	89	89	89

Los resultados encontrados en esta investigación se encuentran dentro de lo informado por Galo (2019) y Asmono *et al.* (2021) que obtuvieron plántulas con una altura promedio de 8.30 cm.

Das *et al.* (2011) informaron sobre la micropropagación de *S. rebaudiana* empleando la punta de los brotes e informan que el medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2 mg / Lkinetina era el mejor para la proliferación de múltiples brotes, lo que resultó en más de 11 brotes de un explante de punta de un solo brote dentro de los 35 días de cultivo.

Calderón y Montes de Godoy (2017) multiplicaron esquejes de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en un medio MS (Murashige & Skoog), con macrosales al 50 por ciento y distintas dosis de citoquininas; BAP (Benci-lamino purina) y KIN (Kinetina encontrando una mejor respuesta con las dosis de 2.0 y 2.5mg/L de KIN señalando una mayor altura de planta (13.5cm) con la dosis de 2.0mg/l, y el mayor número de hojas con la de 2.5mg/l.

Aguilar-Jiménez *et al.* (2019) estudiaron la micropropagación de *Stevia rebaudiana* a partir de segmentos nodales sumergidos en el mismo por ocho semanas y señalan que la concentración de 0.5 mg L⁻¹ de 6- Bencilaminopurina fue el tratamiento que originó mayor número de brotes *in vitro* (3.6 ±1.4) y que el medio de cultivo sin soporte (líquido) fue el mejor originando hasta 21.45 nuevos brotes.

De Rueda *et al.* (2006), observaron una mayor aclimatación de plantas micropropagadas usando microtúneles en bolsa plásticas y con un substrato compuesto por Pro-Mix 'BX': arena (1:1) y con las plantas más altas.

Anbzhagan *et al.* (2010) realizaron experimentos para la estandarización de la técnica de cultivo in vitro para la propagación masiva de *Stevia rebaudiana* empleando la punta del brote, el segmento nodal y la hoja en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con diferentes concentraciones de BA, Kn e IAA tanto en forma individual como combinada para la inducción de brotes y los mejores resultados se obtuvieron de Medio MS suplementado con BA + IAA a las concentraciones de 1.0 mg/ly 0,5 mg /l respectivamente señalan que alrededor del 82 por ciento de las plantas se establecieron con éxito en condiciones naturales de campo.

González-Hernández *et al.* (2019) evaluaron la respuesta de las plantas micropropagadas de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en la fase de aclimatización y las compararon con plantas propagadas mediante cortes de esquejes y reportan que se puede usar diferentes combinaciones de sustrato a base de zeolita y compost y que las plantas micropropagadas desarrollaron mayor número de hojas y altura, que las propagadas mediante corte de esquejes.

4.2. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN CLONAL DE GENOTIPOS DE STEVIA EN UN SISTEMA DE BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL

4.2.1. Experimento comparativo de cuatro medios de cultivo en biorreactores de inmersión temporal

Los resultados del análisis de variancia se presentan en la Tabla 12 y se puede apreciar en tratamientos diferencias altamente significativas para todas las variables evaluadas. Se encontró un coeficiente de variación para altura de plántula, número de tallos por plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula y número de raicillas/plántula igual a 11.65 por ciento, 14.50 por ciento, 12.41 por ciento, 12.05 por ciento y 15.98 por ciento respectivamente. De igual modo se halló una media general del experimento igual a 6.85 cm para altura de plántula, 6.96 tallos/plántula, de 30.21 de hojas/plántula, 1.37 g de peso fresco/plántula y de 2.01 raicillas/ plántula.

Tabla 12: Cuadrados medios del ANVA de altura de plántula, número de tallos/plántula, número de hojas/plántula, peso (g) y número de raíces/plántula de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagados en biorreactores en cuatro diferentes medios de cultivo

Fuente de variación	Grados de libertad	Altura plántula	Número de tallos/plántula	Número de hojas/plántula	Peso	Número de raíces/plántula
Tratamiento	3	55.84 ***	265.22 ***	1966.2 ***	2.8109 ***	40.18 ***
Error	1 2	0.64	1.02	14.1	0.0274	0.10
C.V (%)		11.65 2	14.501	12.417	12.059	15.983
Media		6.858	6.967	30.213	1.373	2.017

“***” $\alpha = 0.001$, hay diferencias altamente significativas entre tratamientos

En la Tabla 13 se muestra los valores de las medias para altura de plántula, número de tallos por plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula y número de raicillas/plántula y la prueba de significación Tukey ($\alpha = 0.05$) y se observa diferencias significativas para altura de plántula y número de hojas/plántula. Se puede apreciar para altura de plántula un rango 9.60 a 1.90 cm, para número de tallos un rango de 19.00 a 1.00, para número de hojas/plántula de 32.75 a 7.00, para peso fresco/plántula 2.27 a 0.27 g y para número de raicillas/plántula de 6.66 a 0.

Tabla 13: Valores medios de altura de plántula, número de tallos/plántula, número de hojas/plántula, peso (g) y número de raíces/plántula de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en biorreactores en cuatro diferentes medios de cultivo

Tratamiento	Altura plántula (cm)	Número de tallos/plántula	Número de hojas/plántula	Peso (g)	Número de raíces/plántula
M1	9.600 a	4.167 b	32.750 b	1.675 b	6.667 a
M2	9.880 a	19.000 a	59.467 a	2.270 a	1.400 b
M3	6.053 b	3.700 b	21.633 c	1.270 c	0.000 c
M4	1.900 c	1.000 c	7.000 d	0.277 d	0.000 c

Medias con una misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Los valores más altos de las características evaluadas: altura de plántula, número de tallos por plántula, número de hojas/plántula y peso fresco/plántula se lograron con el medio M2 (MS + 1 mg/l BAP+0.1 mg/l ANA + 30 g sacarosa) y que los siguientes valores para todas las características señaladas se lograron con el medio M1 a excepción del número de

raicillas/plántula cuyo valor más alto se observó con el medio M1 MS sin reguladores de crecimiento + 30 g de sacarosa. Es importante señalar que las plántulas solo formaron raicillas en el medio M1 y M2.

4.2.2. Experimento comparativo de tres genotipos en biorreactores de inmersión temporal

a. Fase *in vitro*

Los resultados del análisis de variancia se presentan en la Tabla 14 y se puede apreciar en tratamientos diferencias altamente significativas para todas las variables evaluadas. Se encontró un coeficiente de variación para altura de plántula, número de tallos por plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula y número de raicillas/plántula igual a 11.02 por ciento, 10.72 por ciento, 12.62 por ciento, 8.01 por ciento y 9.846 por ciento, respectivamente. De igual modo se halló una media general del experimento igual a 9.10 cm para altura de plántula, 3.93 tallos/plántula, de 29.94 de hojas/plántula, 1.65 g de peso fresco/plántula y de 6.74 raicillas/ plántula.

Tabla 14: Cuadrados medios del ANVA de altura de plántula, número de tallos, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula y número de raicillas/plántula de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagados en biorreactores

Fuente de variación	Grados de libertad	Altura plántula	Número de tallos/plántula	Número de hojas/plántula	Peso fresco/plántula	Número de raicillas/plántula
Tratamiento	2	4.053 *	0.208	283.52 ***	0.070 *	0.505
Error	12	1.006	0.178	13.76	0.018	0.4406
C.V (%)		11.02	10.72	12.62	8.01	9.85
Media		9.10	3.93	29.34	1.65	6.74

“***” $\alpha = 0.001$, diferencias altamente significativas entre tratamientos

La Tabla 15 muestra los valores de las medias para altura de plántula, número de tallos por plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula y número de raicillas/plántula y la prueba de significación Tukey ($\alpha = 0.05$) y se observa diferencias significativas para altura de plántula y número de hojas/plántula. Se puede apreciar para altura de plántula un rango 9.90 a 8.13 cm, para número de tallos 4.17 a 3.80, para número de hojas/plántula 36.50 a 21.50, para peso fresco/plántula 1.44 a 1.52 y para número de raicillas/plántula 6.84 a 6.26.

Tabla 15: Valores medios de altura de plántula (cm), número de tallos/ plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula (g) y número de raicillas/plántula de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagados en birreactores

Tratamiento	Altura plántula (cm)	Número de tallos/plántula	Número de hojas/plántula	Peso fresco/plántula (g)	Número de raicillas/plántula
IBT 1	9.90 a	4.17 a	36.50 a	1.73 a	6.80 a
IBT 2	9.28 ab	3.83 a	30.17 b	1.71 a	6.80 a
IBT 3	8.13 b	3.80 a	21.50 c	1.52 a	6.26 a

Medias con una misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$)

Dentro de las líneas de stevia evaluadas se puede observar que la línea IBT1 presenta los valores más altos para altura de plántula, número de tallos por plántula, número de hojas/plántula, peso fresco/plántula y número de raicillas/plántula, y en algunos caracteres valores ligeramente mayores a la línea IBT 2. Estas dos líneas tienen valores superiores a la Línea IBT 3.

b. Fase de aclimatización

En la Tabla 16 se presentan los datos obtenidos del ANOVA realizado con datos obtenidos en la fase de aclimatización de stevia de tres genotipos y se puede apreciar para tratamientos (genotipos) existen diferencia significativa para altura de plántula y diferencias altamente significativas para número de raíces/plántula, longitud de raíces/plántula y peso fresco/plántula. El coeficiente de variación fue igual a 14.02 por ciento para altura de planta, de 14.21 por ciento para número de raíces, de 14.70 por ciento para longitud de raíces y de 9.52 por ciento para peso fresco/plántula.

Tabla 16: Cuadrados medios del ANVA de altura de planta, número de raíces/planta, longitud de raíces y peso fresco/planta de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en etapa de aclimatación provenientes de biorreactores

Fuente de variación	Grados de libertad	Altura planta	Número de raíces/planta	Longitud de raíces/planta	Peso fresco
Tratamiento	2	7.148 *	25.773 ***	6.959 ***	0.322 ***
Error	27	1.305	2.345	0.742	0.004
C.V (%)		14.02	14.21	14.70	9.53
Media		8.15	10.78	5.86	0.66

“***” $\alpha = 0.001$, hay diferencias altamente significativas entre tratamientos

En la Tabla 17 se presenta los valores medios de las características evaluadas y se puede apreciar que en todas ellas los genotipos presentan valores medios con diferencias altamente significativas en la Prueba Tukey ($\alpha = 0.05$). Para altura de planta se observó un rango de 9.11 a 7.52 cm, para número de raíces/planta de 9.71 a 12.63, para longitud de raíces de 4.92 a 6.50 cm y para peso fresco por planta de 0.467 a 0.822 g. El genotipo IBT2 tuvo el mayor valor para altura de planta, longitud de raíces/planta y peso fresco /planta.

Tabla 17: Valores medios de altura de planta (cm), número de raíces/planta, longitud de raíces (cm) y peso fresco/plántula (g) de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en etapa de aclimatación provenientes de biorreactores

Tratamiento	Altura plántula (cm)	Número de raíces/planta	Longitud de raíces/planta (cm)	Peso fresco (g)
IBT 1	7.52 b	12.63 a	4.92 b	0.467 c
IBT 2	9.11 a	10.00 b	6.50 a	0.822 a
IBT 3	7.81 b	9.71 b	6.17 a	0.688 b

Medias con una misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

En la Tabla 18 se aprecia un porcentaje de sobrevivencia de 89.42 por ciento, de 90 por ciento de 100 por ciento para IBT1, IBT2 y IBT3 respectivamente.

Tabla 18: Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagadas en biorreactores de inmersión temporal en proceso de aclimatización

Tratamiento	Trasplante	7 DDS	14 DDS	21 DDS
IBT 1	100	89 %	89%	89%
IBT 2	100	90%	90%	90%
IBT 3	100	100%	100%	100%

Alvarenga y Salazar (2015), empleando micropropagación de stevia con Biorreactores de Inmersión Temporal, observaron plántulas con 23.40 hojas en promedio y un rango de altura de 3.7 a 6.00 cm y ausencia de raíces. En el presente trabajo utilizando medios de cultivo sin reguladores de crecimiento se obtuvo 29.34 hojas en promedio y se logró rango de altura de planta de 9.90 cm a 8.13 cm y presencia de raíces.

Oviedo (2017), trabajó con dos progenies 7 y 3, reporta diferencias significativas en tamaño de planta, número de hojas y brotes, entre progenies, lo que coincide con lo obtenido con los genotipos IBT1 y IBT3 donde se observan respuestas diferentes.

Vives *et al.* (2017) y Ramírez *et al.* (2016), reportan que en la micropropagación en Biorreactores de Inmersión Temporal le logan plántulas con un mejor desarrollo a nivel de brotes, hojas y tallos, debido intercambio gaseoso continuo que favorece una mejor nutrición de las plantas.

Bayraktar (2019) y Melviana *et al.* (2021) indican que los periodos de inmersión de más de 10 segundos son perjudiciales para las plántulas las cuales se tornan cloróticas. En el presente trabajo la inmersión fue de 4 segundos y las plántulas no presentaron clorosis.

Alvarenga y Salazar (2015), reportan la ausencia de callos en plantas propagadas en Biorreactores de Inmersión Temporal y un 80 por ciento de aclimatización. Oviedo (2017), reporta un crecimiento 100 por ciento homogéneo de plantas provenientes de Biorreactores de Inmersión Temporal. Rosales *et al.* (2018), señala que los mejores resultados en el proceso de aclimatización se logaron con el medio de cultivo con 30g/litro de sacarosa, la cual actúa como supresor antimicrobiano. Los resultados de la presente investigación son similares a los reportados logándose un 100 por ciento de sobrevivencia con el genotipo IB3 en la etapa de aclimatización.

4.3. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE STEVIOSIDO Y REBAUDIOSIDO EN GENOTIPOS PROPAGADAS EN MICROPROPAGACIÓN CONVENCIONAL *in vitro* Y EN SISTEMAS DE BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL

Los resultados del análisis de variancia se presentan en la Tabla 19 se puede apreciar en los tratamientos diferencias altamente significativas para todas las variables evaluadas. Se encontró un coeficiente de variación para contenido de rebaudiósido de 1.024×10^{-14} y para esteviosido de 4.63×10^{-15} . De igual modo se halló una media para contenido de rebaudiósido de 14.23 g/100g y contenido esteviosido de 4.64g/100g y diferencias altamente significativas para los métodos de propagación *in vitro*, para genotipo e interacción genotipo y método de propagación.

En la Tabla 20 se muestran los valores de las medias del de rebaudiósido y esteviosido en dos genotipos de stevia y en los dos métodos de propagación y se puede apreciar que hay diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de significación de Tukey ($\alpha = 0.05$). Para el contenido de rebaudiosido se aprecia un rango de 10.31 a 17.21 g/100g

correspondiendo el valor más alto a los tratamientos Método Convencional y BIT con el genotipo IBT3 y el valor más bajo con el tratamiento BIT con el genotipo IBT1. Por otro lado, el contenido de esteviosido vario de 3.68 a 5.28 g/ 100 g correspondiendo el valor más bajo al Método BIT con el genotipo IBT1 y a los tratamientos Método Convencional y BIT con el genotipo IBT3. Se puede apreciar que en los dos métodos de cultivo el genotipo IBT3 presenta los mayores valores de rebaudiósido y esteviosido.

Tabla 19: Cuadrados medios del ANVA del contenido de Rebaudiósido y Esteviosido en dos genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagadas por el método convencional y en biorreactores

Fuente de variación	Grados de libertad	Rebaudiósido	Steviosido
Método de propagación	1	3.57 ***	0.38 ***
Genotipo	1	141.85 ***	6.66 ***
Método de propagación: Genotipo	1	3.57 ***	0.38 ***
Error	12	0	0
C.V (%)		1.024 e-14	4.63 e-15
Media		14.23	4.64

“***” $\alpha = 0.001$, hay diferencias altamente significativas

Tabla 20: Valores medios del contenido de Rebaudiósido y Esteviosido en dos genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagadas por el método convencional y en biorreactores

Método de propagación: Genotipo	Rebaudiósido (g/100g)	Steviosido (g/100g)
MC: IBT1	12.20 b	4.30 b
MC: IBT3	17.21 a	5.28 a
BIT: IBT1	10.31 c	3.68 c
BIT: IBT3	17.21 a	5.28 a

MC: método convencional; BIT: biorreactores. Medias con una misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Student-Newman-Keuls ($\alpha = 0.05$)

Vives *et al.* (2017), evaluaron la producción de biomasa y glucósidos de esteviol a los 21 días de cultivo en dos tratamientos medio semisólido, medio líquido y BIT® y observaron una mejor calidad morfológica de brotes con peso fresco y seco superiores en el tratamiento BIT® y también un mayor contenido de glucósidos de esteviol en los biorreactores. Bondarev *et al.* (2001), señalan que el contenido de glucósidos de esteviol en material cultivado in vitro ha sido de cinco a seis veces menor que en las plantas de crecimiento de campo.

4.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS AMBIENTES CONTROLADOS EN EL CRECIMIENTO Y RENDIMIENTO Y LA CALIDAD DE LÍNEAS AVANZADAS DE STEVIA

4.4.1. EFECTO DE DOS AMBIENTES CONTROLADOS (SULLANA. PERÚ Y MISIONES PARAGUAY) EN EL DESARROLLO DE GENOTIPOS DE STEVIA (IBT1, IBT2 Y IBT3)

En la Tabla 21 se presentan los datos obtenidos del ANOVA realizado con datos obtenidos de plantas de stevia de tres genotipos y se puede apreciar para tratamientos (genotipos) diferencias altamente significativas para altura de planta, número de raíces/planta, longitud de raíces/planta y peso fresco/planta. El coeficiente de variación fue igual a 13.48 por ciento para altura de planta, de 10.23 por ciento para número de raíces, 14.57 por ciento para longitud de raíces 13.82 por ciento y para peso fresco 6.32 por ciento.

Tabla 21: Cuadrados medios del ANVA de altura de plántula, número de hojas, longitud de raíz y peso fresco de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagadas en Sullana y Misiones

Fuente de variación	Grados de libertad	Altura de plántula	Número de hojas	Longitud de raíz	Peso fresco
Ubicación	1	0.12	323.90 ***	5.83	0.05
Genotipo	2	15.35 ***	42.20 *	159.33 ***	0.24 *
Ubicación: Genotipo	2	3.77 *	188.10 ***	7.90	0.23 *
Error	18	1.01	11.40	4.66	0.06
C.V (%)		10.2	14.5	13.8	6.32
Media		3	7	2	
		9.82	23.1	15.6	3.80
			3	2	

“***” $\alpha = 0.001$, hay diferencias altamente significativas, “*” es $\alpha = 0.05$, hay diferencias significativas

En la Tabla 22 se presenta los valores medios de las características evaluadas y se puede apreciar que en todas ellas los genotipos presentan valores medios con diferencias altamente significativas en la Prueba *Student Newman* ($\alpha = 0.05$).

Para altura de planta se observó un rango de 8.125 a 12.050 cm y observándose el valor más bajo en Sullana con la línea IBT3 y el valor más alto en Sullana IBT1. Para número de hojas/planta se encontró un rango de 13.25 a 30 hojas y el valor más bajo fue observado en Sullana con el genotipo IBT1 y el valor más alto en Sullana con el genotipo IBT1. Para

longitud de raíces se determinó valores que variaron de 10.83 a 20 cm observándose el valor más bajo en Sullana con el IBT2 y el valor más alto para Sullana con el IBT3. Para peso fresco por planta de se observó un rango de 3.37 a 4.01 g, y el valor más bajo fue observado en Misiones con el IBT1 y el valor más alto en Misiones con el IBT3.

Tabla 22: Valores medios de altura de plántula, número de hojas, longitud de raíz y peso fresco de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagadas en Sullana y Misiones

Ubicación / Genotipo	Altura de plántula (cm)	Número de hojas	Longitud de raíz (cm)	Peso fresco (g)
SULLANA: IBT1	12.050 a	13.250 c	17.500 a	3.820 a
SULLANA: IBT2	9.500 bc	23.625 b	10.833 b	3.923 a
SULLANA: IBT3	8.125 c	21.500 b	20.000 a	3.785 a
MISIONES: IBT1	10.750 ab	29.668 a	14.238 b	3.375 b
MISIONES: IBT2	9.000 bc	20.750 b	11.238 b	3.878 a
MISIONES: IBT3	9.500 bc	30.000 a	19.900 a	4.008 a

Medias con una misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Student-Newman-Keuls ($\alpha = 0.05$)

Considerando que el producto de cosecha son las hojas se puede apreciar un incremento significativo en el número de hojas en Misiones para las líneas IBT1 e IBT3. El IBT2 tiene una producción similar en ambos ambientes de Sullana y Misiones.

4.4.2. Efecto de dos ambientes controlados (Sullana - Perú y Misiones - Paraguay) en el desarrollo de líneas avanzadas de stevia (IBT1, IBT2 y IBT3) después del primer corte de tallos o cosecha

En la Tabla 23 se presentan los datos obtenidos del ANOVA realizado con datos obtenidos de plantas de stevia de tres genotipos y se puede apreciar para tratamientos (genotipos) diferencias altamente significativas para altura de planta, número de raíces/planta, longitud de raíces/planta y peso fresco/planta. El coeficiente de variación fue igual a 7.86 por ciento para altura de planta, de 15.14 por ciento para número de hojas, 14.41 por ciento para número de brotes, 7.70 por ciento para longitud de raíces y 17.15 por ciento para peso fresco.

Tabla 23: Cuadrados medios del ANVA de altura de plántula (cm), número de hojas/planta, número de brotes/planta, longitud de raíz/planta y peso fresco/planta de tres genotipos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) propagadas en Sullana y Misiones después de 30 días del corte de tallo

Fuente de variación	Grados de libertad	Altura de planta (cm)	Número de hojas/planta	Número de brotes/planta	Longitud de raíz/planta	Peso fresco/planta
Ubicación	1	0.463	3007.6 ***	11.575 ***	114.11 ***	35.31 ***
Genotipo	2	8.948 **	395.1 ***	20.351 ***	188.06 ***	6.07 ***
Ubicación : Genotipo	2	14.787 ***	796.2 ***	1.24	107.72 ***	13.07 ***
Error	18	0.914	27.10	0.43	1.26	0.34
CV		7.86	15.14	14.41	7.70	17.15
Promedio		12.17	34.36	4.53	14.60	3.42

“***” $\alpha = 0.001$, hay diferencias altamente significativas, “**” es $\alpha = 0.01$, hay diferencias significativas

En la Tabla 24 se presenta los valores medios de las características evaluadas y se puede apreciar que en todas ellas los genotipos presentan valores medios con diferencias altamente significativas en la Prueba *Student Newman-Keuls* ($\alpha = 0.05$). Para altura de planta se observó un rango de 9.33 a 13.37 cm y el valor más bajo se observó en el ambiente de Sullana con el IBT1 y el valor más alto con las líneas IBT2 e IBT3. Para número de hojas/planta se observó un rango de 12.50 a 57.66 hojas y el valor más bajo fue encontrado en el ambiente con Misiones con el IBT2. Para el número de brotes se observó un rango de 2 a 7 brotes, correspondiendo el valor más bajo al ambiente Misiones IBT1 y el valor más alto al ambiente Sullana con el IBT2. Para longitud de raíces el rango varió de 10 a 13.66 cm con el valor más bajo fue observado en Misiones con IBT3 y el más alto en Misiones con el IBT2. Para peso fresco por planta se encontró valores de 1.73 a 7.04 g y el valor más bajo fue hallado en Misiones con el IBT2 y el más alto en Sullana con el IBT2. El genotipo IBT2 en Sullana presentó mayor altura de planta, el mayor número de hojas /planta, el mayor número de brotes/planta y el mayor peso fresco/planta.

V. CONCLUSIONES

OBJETIVO 1

- Se desarrolló un protocolo para la propagación convencional *in vitro* empleando el medio de cultivo de cultivo M1 (MS sin reguladores de crecimiento + 30 g de sacarosa) que permitió obtener plántulas vigorosas y con sistema radicular de desarrollo óptimo para las líneas evaluadas y las condiciones del experimento. Por otro lado, el genotipo IBT1 (Morita II) y el IBT3 (Línea Avanzada Mutante) presentaron un mejor comportamiento en el medio M1.

OBJETIVO 2

- Se desarrolló un protocolo para la propagación con Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) sobresaliendo el medio M2 (MS + 1 mg/l BAP+0.1 mg/l ANA + 30 g sacarosa) y el medio M1 (MS sin reguladores de crecimiento + 30 g de sacarosa) podría considerarse como una segunda opción para los genotipos estudiados. El genotipo con mejor comportamiento fue IBT1 (Morita II).

OBJETIVO 3

- El genotipo Línea Avanzada Mutante IBT3 presenta el contenido más alto de rebaudiósido y esteviósido igual a 17.21 g/100 g y 5.28 g/100 g; respectivamente superior al IBT1 (Morita II). Estos valores fueron obtenidos tanto en plantas provenientes de propagación convencional *in vitro* y plantas provenientes de propagación en BIT.

OBJETIVO 4

- Para el IBT1 los mejores valores para las características evaluadas: altura de planta, longitud de raíz y peso fresco fueron observados en el ambiente de Sullana a excepción del número de hojas que fue mayor en el ambiente de Misiones. Después del primer corte (cosecha) todas las características evaluadas, a excepción de altura de planta, presentaron mejores valores en el ambiente de Sullana y se observó un

incremento en el número de hojas de 13.25 a 57.67. El contenido de rebaudiósido (16.467 g/100 g) y esteviósido (3.612 g/100 g) más alto se observó en Misiones.

- El IBT2 tuvo valores ligeramente mayores para todas las características evaluadas a excepción de longitud de raíz en Sullana. Después del primer corte (cosecha), los mejores valores en la mayor parte de las características (excepción de longitud de raíz) se observaron en Sullana y se reporta un incremento de hojas de 23.62 a 45 hojas. El contenido de rebaudiósido (19.668 g/100 g) y estevioso (4.592 g/100 g) más alto se observó en Misiones y en Sullana, respectivamente.
- El IBT3 dio los mejores valores de las características evaluadas a excepción de longitud de raíz en el ambiente de Misiones, Paraguay. Después del primer corte (cosecha) los mejores valores fueron encontrados en Sullana a excepción de la longitud de raíz y de igual modo se observó un incremento de hojas de 21.5 a 34 hojas. El contenido de rebaudiósido (20.218 g/100 g) y estevioso (4.588 g/100 g) más alto se observó en Misiones y en Sullana, respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

- Desarrollar protocolo adicional para la micropropagación clonal de la línea avanzada IBT3, nueva línea avanzada desarrollada por el IBT de la UNALM, la de mayor contenido de rebaudiósido y esteviosido y empezar las pruebas de campo.
- Iniciar los procesos de registro de propiedad intelectual

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, N. 2015. Las potencialidades de la stevia nacional en el mercado nacional. Recuperado el 11 de agosto de 2015. Disponible en: Web del Centro de Análisis y Difusión de la Economía Paraguaya: «Copia archivada». Archivado desde el original el 23 de septiembre de 2015.
- Aguilar, S; Laitón, L; Mejía, F; Barrera, C. 2016. Desarrollo de un protocolo para el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* variedad Bertoni Morita II. Revista de Investigación Agraria y Ambiental, 7(2):99-106.
- Aguilar, D; Rodríguez, J. L; Piña J; Silva, V. 2019. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* y análisis preliminar de esteviósidos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(1):197–204.
- Alvarenga, S; Salazar, T. 2015. Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertonien sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*, 36(3):50-57.
- Al-zubaidy, N; Ibrahim, M; Musstta, M. 2020. The Effect of Growth Regulators and Different Concentrations of Sucrose in Callus Induction of Sugar Leaf Plant *Stevia Rebaudiana* and its Content of Stevoiside. *Plant Archives*, 20(2):4492–4496.
- Ahmed, M.B; Salahin, M; Karim, R; Razvy; M.A; Hannan, M.M; Sultana, R; Hossain, M; Islam, R. 2007. An Efficient Method for *in vitro* Clonal Propagation of a Newly Introduced Sweetener Plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Bangladesh. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 2 (2): 121-125.

- Andolfi, L; Ceccarini, L; Macchia, M. 2002. Bioagonomic characteristics of *Stevia rebaudiana*. Inf. Agrario, 58: 48-51.
- Anbazzhagan, M; Kalpana, M; Rajendran, R; Natarajan, V; Dhanavel, D. 2010. *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Emir. J. Food Agric., 22(3):216-222. <http://ffa.uaeu.ac.ae/ejfa.shtm>
- Asmono, S. L; Djenal, D; Rahmawati, R. 2020. In Vitro Regeneration of *Stevia Rebaudiana* Bertoni from internode and leaf explants using different concentrations of BAP (6-Benzyl Amino Purine). Earth and Environmental Science, 411:1–6. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/411/1/012004>
- Barba, F. J; Gimi, N; Vorobiev, E. 2015. Evaluating the potential of cell disruption technologies for gene selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. J. Food Eng, 149:222–228.
- Barathi, N. 2003. Stevia—the calorie free natural sweetener. Natural Product Radiance 2, 120–122.
- Benhmimou, A; Ibriz, M; Douaik, A; Lage, M; Al Faiz, C; Chaouqi, S; Zouahri, A. 2018. Effect of NPK Fertilization on the Growth, Yield, Quality and Mineral Nutrition of New Sweet Plant in Morocco (*Stevia rebaudiana* Bertoni). American Journal of Biology and Life Sciences, 6(3):36–43.
- Behera, M; Verma, O; Mahapatra, P; Singandhupe, R; Kumar, A; Kannan, K; Brahmanand, P. 2013. Effect of fertigation on Stevia (*Stevia rebaudiana*) under drip irrigation. Indian Journal of Agronomy, 58(1):72–79.
- Bondarev, N; Reshetnyak, O; Nosov, A. 2001. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Sci., 161:155–163.
- Bondarev, N; Reshetnyak, O; Bondareva, T; Ilin, M. 2019. Impact of cultivation factors in vitro on the growth and the biosynthesis of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* cell cultures. Physiol Mol Biol Plants, 25(4):1091–1096.

- Brandle, J.E; Telmer, P.G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*. 68:1855–1863.
- Calderón, A; Montes de Godoy, M. 2017. Propagación in vitro de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): un edulcorante natural a partir de segmentos nodales. *Anuario de investigación* 2017, 6:2227-4235. Universidad Católica de El Salvador.
- Cantero, E. 2014. Influencia hormonal en el uso eficiente del agua y en respuesta el estrés hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Recuperado de: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/134936/TECN.pdf?sequence=1>
- Carneiro, J. W. P; Guedes, T. A. 1992. Influence of the contact of stevia seeds with the substrate, evaluated by means of the Weibull function. *Rev. Brasil. Sementes*, 14:65-68.
- Casaccia, J; Britos, R; Bozzano, G; Sanabria, A; Cantero, F. 2016. Ka'a he'ë *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni: La dulce planta de Paraguay para el mundo, alternativa para la diversificación de la finca/Rosanna Britos, Jongdae Park, eds. Caacupé, Py, IPTA, CIHB, KOPIA: 116 p.
- Chávez, W. 2018. Potencial de exportación de la Stevia al mercado de Japón y su incidencia económica en los agricultores del departamento de Cajamarca. Maestría en Ciencias. Universidad Nacional de Cajamarca. Escuela de Posgrado.
- Chalapathi, M. V; Shivaraj, B; Rama Krishna Prama, V. R. 1997a. Nutrient uptake and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) as influenced by methods of planting and fertilizer levels. *Crop Res.*, 14:205-208.
- Chalapathi, M. V; Thimmegowda, S; Rama Krishna Prama, V. R; Prasad, T. G. 1997b. Natural non-calorie sweetener stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): A future crop of India. *Crop Res.*, 14:347–350.

- Chalapathi, M. V; Thimmegowda, S; Kumar, N. D; Chandraprakash, J; Rao, G. G. 1999. Vegetative propagation of stevia (*Stevia rebaudiana*) underfield conditions. Crop Res., 18: 319-320.
- Chalapathi, M. V; Thimmegowda, S; Kumar, N. D; Rao, G. G. E; Mallikarjuna, K. 2001. Influence of length of cutting and growth regulators on vegetative propagation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). Crop Res., 21: 53- 56.
- Clemente, C; Angelini, L; Ascrizzi, R; Tavarini, S. 2021. *Stevia rebaudiana* (Bertoni) as a multifunctional and sustainable crop for the mediterranean climate. Agriculture (Switzerland), 11:1–17.
- Sheu, B. W; Tamai, F; Motoda, Y. 1987. Effects of boron on the growth, yield and contents of stevioside and rebaudioside A of *Stevia rebaudiana*. J. Agricultural Sci. (Japan), 31,265–272.
- Cuervo, P; Rincón, S; Hensel, O. 2012. Effect of Drying Temperature on the Quality of *Stevia rebaudiana*. Tropentag, September 19-21.
- Cueva, V. 2016. Estudio de rentabilidad del cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) en Trujillo, La Libertad.
- Cortés, J. 2012. Análisis de crecimiento del cultivo de stevia (*Stevia rebaudiana* B.) con proyección agroindustrial en el Valle del Cauca. Tesis bachiller Santiago de Cali – Colombia. Universidad de San Buenaventura Cali. pp. 32-35.
- Das, A; Gantait, S; Mandal, N. 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. Int. J. Agric. Res., 6:40-48.
- Delgado, D. 2007. Estudio de pre-factibilidad para la industrialización y comercialización de la stevia. Tesis inédita de licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima.

- De Rueda, D; Del Valle, W; Cifuentes, E; Ramia, N.C. 2006. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a Partir de Segmentos Nodales. Ceiba, 47(1-2):11-18.
- Díaz, C; Trillos, Á; Villa, V; Silva, Z; Acevedo, L; Arroyave, C; Peláez, C. 2020. Altitude and fertilization type: concentration of nutrients and production of biomass in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Plant Nutrition, 44(3):322–336.
- Duke, J. A; De Cellier, J. C. 1993. *Stevia rebaudiana* (Bert.). In: CRC Handbook of Alternative Cash Crops. J. Duke, Ed.), pp. 422–424. CRC Press Inc., London.
- Durán, A; Rodríguez, M.P; Cordón, A.K; Record, C.J. 2013. Estevia (*Stevia rebaudiana*) edulcorante natural y no calórico. Rev Chil Nutr., 39(4):203 – 206.
- Dwivedi, R. S. 1999. Unnurtured and untapped super sweet nonsacchariferous plant species in India. Current Sci. (Bangalore) 76:1454-1461.
- Ferreira, A.G; Cassol, B; Rosa, S.G.T; Silveira, T.S; Stival, A; Silva, A. 2001. Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil. Acta Bot Bras., 15:231-242.
- Filho, L. O. F; Malavolta, E; Filho, O. F. D. L. 1997. Symptoms of nutritional disorders in stevia (*Stevia rebaudiana*). Scientia Agricola 54,53–61.
- Fronza, D; Folegatti, M. 2003. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. Scientia Agricola, 60(3):595–599.
- Gantait, S; Das, A; Mandal, N. 2015. Stevia: a comprehensive review on ethno pharmacological properties and in vitro regeneration. Sugar Techno, 17: 95-106.
- Goenadi, D. H. 1983. Watertension and fertilization of *Stevia rebaudiana* Bertoni on Oxic Tropudalf. Menara Perkebunan, 51: 85-90.
- Goettemoeller, J; Ching, A. 1999. Seed germination in *Stevia rebaudiana*. In: Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA.

- Gomes, E; Moterle, D; Biasi, L; Koehler, H; Kanis, L; Deschamps, C. 2017. Plant densities and harvesting times on productive and physiological aspects of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown in southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(4): 3249-3264.
- Gonzales-Hernández, F. 2019. Micropropagación de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de explantes ex vitro.
- Handro, W; Ferreira, C. M; Floh, E. 1993. Chromosomal variability and growth rate in cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Plant Sci.* 93,169.
- Hossain, M.F; Islam, M.T; Islam, M.A; Akhtar, S. 2017. Cultivation and uses of *Stevia rebaudiana*: A review. *Afr. J. Food Agric.Nutr.*, 17(4):12745-12757. DOI: 10- 18697/ajfand.80.16595
- Jain, P; Kachhwaha, S; Kothari, S.L. 2014. Biotechnology and metabolic engineering of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Perspective and Possibilities. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research.*, 3:25.
- Jia, G. N. 1984. An experiment on the cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Shanxi Agric. Sci.* 1: 2021. [in Chinese, English abstract.].
- Khan, S. J; Khan, H. U; Khan, R. D; Iqbal, M. M; Zafar, Y. 2000. Development of sugarcane mutants through *in vitro* mutagenesis. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 3,1123-1125.
- Kinghorn, A. D; Soejarto, D. D. 1985. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: H. Wagner, H. Hiking, and N. R. Farnsworth, eds. *Economic and medical plant research*. Academic Press, London, UK.
- Kujur, R.S; Singh, V; Ram, M; Yadava, H.N; Singh, K.K; Kumari, S; Roy, B.K. 2010. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan- induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res.*, 2:258-63.

- Kudo, M. 1974. *Stevia rebaudiana* (Bert.). Science and Cultura 34, 2.
- Kumar, R. 2013. Seed Germination of *Stevia rebaudiana* Influenced by Various Potting Media. Octa Journal Biosciences., 1:143–146.
- Lee, J.I; Kang, K; Lee, E. U. 1979. Estudios sobre la nueva planta de origen edulcorante stevia (*Stevia rebaudiana*) en Corea. En: Efectos de las fechas de trasplante, toma de esquejes y siembra en las características de crecimiento y rendimiento de hojas secas, [Corea]. Informes de investigación de la Oficina de Desarrollo Rural, Crop, 1979. 21: p. 21
- Lemus-Mondaca, R; Vega-Gálvez, A; Zura-Bravo, L; Ah-Hen, K. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chem., 132: 1121-1132.
- Ljaz, M; Pirzada, A. M; Saqib, M; Latif, M. 2015. *Stevia rebaudiana*: An alternative sugar crop in Pakistan - A review. Zeitschrift Fur Arznei- Und Gewurzpflanzen, 20(2):88–96.
- Lewis, W. H. 1992. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. Econ. Bot., 46: 336-337.
- Magalhaes, P.M. 2000. Agrotecnología para el cultivo de estevia o hierba dulce. En: ‘‘Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas,’’ pp. 441–450. CYTED-CAB, Bogotá.
- Maiti, R. K; Purohit, S. S. 2008. Stevia: A miracle plant for human health. Agobios (India) Jodhpur, India.
- Marín, W. 2004. Sondeo de mercado de la Estevia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Bogotá Colombia. file:///C:/Users/LuzG/AppData/Local/Temp/347_Sondeo_del_Mercado_de_Estevia.pdf

- Martínez, M. 2015. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una revisión. *Cultivos Tropicales*, 36:5-15.
- Megeji, N.W; Kumar, J.K; Sing, V; Kaul, V.K; Ahuja, P. 2005. Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. *Current Science*; 88(10):801-804.
- Melillo, P. 2000. Agrotecnología para el cultivo de estevia o hierba dulce. En: Martínez JV, Yesed H Y, Cáceres A, editores. *Fundamentos de Agrotecnología de Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Santa Fe de Bogotá, Colombia: Convenio Andrés Bello. 441-500 pp.
- Melviana, A; Esyanti, R; Setyobudi, R; Mel, M; Adinurani, P; Burlakovs, J. 2021. Gene Expression Related to Steviol Glycoside Synthesis Produced in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Shoot Culture Induced with High Far-Red LED Light in TIS RITA® Bioreactor System. *Sarhad Journal of Agriculture*, 37(1):1–8.
- Metivier, J; Viana, A. M. 1979. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins, sugars and stevioside in leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. *J. Exp. Bot.*, 30:1211-1222.
- Miao, C; Kok, L; Sobri, H; Janna, A. 2016. A Review on Induced Mutagenesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews*. Universiti Putra Malaysia Press. 2(3): 77-85.
- Midmore, D. J; Rank, A. H. 2002. A new rural industry stevia to replace imported chemical sweeteners, RIRDC Pub No. W02/22, p. 55.
- Mizukami, H; Shiba, K; Ohashi, H. 1983. Effect of temperature on growth and stevioside formation of *Stevia rebaudiana*. *Shoyakugaku Zasshi* 37,175–179.
- Molinas, S. 1989. Fortuna Stevia del Paraguay S.R.L. Promoción, cultivo, industrialización y comercialización de la *Stevia rebaudiana* Bertoni (Ka´a hé´e). Asunción, Paraguay. 22-24 pp.

- Núñez, E. 2011. *Stevia rebaudiana* Bertoni, un sustituto del azúcar. Área Ciencia de las Plantas y Recursos Naturales Maestría en Producción Vegetal – Ciclo de Seminarios.
- Oddone, B. 1997. How to grow stevia. Technical manual. Guarani Botanicals, Pawtucket, CT.
- Osman, M; Samsudin, N. S; Faruq, G; Nezhadahmadi, A. 2013. Factors affecting micro cuttings of *Stevia* using a mist-chamber propagation box. The Sci. World J. ID. 940201.
- Oviedo-Pereira, D; Alvarenga-Venutolo, S; Evangelista-Lozano, S; Sepúlveda-Jiménez, G; Rodríguez-Monroy, R. 2015. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un Cultivo Promisorio para México. BioTecnología, 19(2):14 – 27.
- Oviedo, P, D. 2017. Comparación de los parámetros de crecimiento y contenido de edulcorantes y antioxidante entre plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni propagadas en biorreactores de inmersión temporal y por esquejes. Tesis. Instituto Politécnico Nacional Yautipec de Zaragoza. México. 56 p.
- Pande, S. S; Gupta, P. 2013. Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. J. Pharm cog. Phytother, 5:26–33.
- Philippe, R.N; De Mey, M; Anderson, J; Ajikumar, P.K. 2014. Biotechnological production of natural zero-calorie sweeteners. Current Opinion in Biotechnology, 26: 155-161.
- Ramírez-Jaramillo, G; Avilés-Baeza, W. I; Moguel-Ordoñez, Y. B; Góndora-González, S. F; May-Lara, C. 2011 *Estevia (Stevia rebaudiana Bertoni)*, un cultivo con potencial productivo en México. En: *Estevia (Stevia rebaudiana Bertoni)*, un cultivo con potencial productivo en México. Primera edición. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Mérida, Yucatán, México pp. 65–70.
- Ramesh, K; Singh, V; Megahit, N.W. 2006. Cultivation of *Stevia [Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni]*: A comprehensive review. Advances in Agronomy, 89:137-177.

- Ramírez, M; Iglesias, L; Ramírez, G; Hernández, E. 2016. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. in temporary immersion systems and evaluation of genetic fidelity. South African Journal of Botany, 106:238–243. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.07.015>
- Rodrigues, M; Afonso, S; Ferreira, I; Arrobas, M. 2016. Response of stevia to nitrogen fertilization and harvesting regime in northeastern Portugal. Archives of Agronomy and Soil Science, 63(5):626–637
- Rojas, S. 2009. Stevia edulcorante orgánico del siglo XXI. 1^{era} edición. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Rosales, C; Brenes, J; Salas, K; Arce, S; Abdelnour, A. 2018. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* en sistemas de inmersión temporal para incursionar en la producción hortícola. Revista Chapingo, Serie Horticultura, 24(1):69–84. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2017.08.028>
- Ruiz, C; Medina, G; Gonzáles, A; Flores, H; Ramírez, O; Ortiz, T; Martínez, P. 2013. Stevia. En: Requerimientos agroecológicos de cultivos (2nd ed., pp. 437– 440). México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.
- Rossi, M. L; Souza, E.H; Ganer, E.M; De Almeida, M; Martinelli, A.P. 2018. Post-seminal development and morph anatomy of vegetative and reproductive organs in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Asteraceae). Anais da Academia Brasileira de Ciências 90(2:1):2167-2177.
- Salvador-Reyes, R; Sotelo-Herrera, M; Paucar-Menacho, L. 2014. Estudio de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. Scientia Agropecuaria, 5: 157-163.
- Shahid, K; Roshan, Z; Nisar, A. 2014. Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Saudi J. Biol. Sci., 21(6):566-573.

- Secretaría de Agricultura de Antioquia. 2000. Informe preliminar sobre adaptación de la especie *Stevia rebaudiana* en la región tropical. Gobernación de Antioquia, Medellín, Colombia. 25 p.
- Schwebel, R. 2005. Stevia, el edulcorante natural sudamericano con cero calorías. Visitado el 11 de junio 2005. Disponible en: [http:// www.fm.unt.edu.ar/ftp/Health_I_G_News/Dic1998.doc](http://www.fm.unt.edu.ar/ftp/Health_I_G_News/Dic1998.doc).
- Singh, M; Saharan, V; Dayma, J; Rajpurohit, D; Sen, Y; Sharma, A. 2017. In vitro Propagation of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): An Overview. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 6(7):1010-1022.
- Slamet, I. H; Tahardi, S. 1988. The effect of shading and nitrogen fertilization on the flowering of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Menara Perkebunan* 56: 34-37.
- Smitha, G.R; Umesha, K. 2011. Vegetative propagation of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.] through stem cuttings. *Journal of Tropical Agriculture*, 50:72–75.
- Sumida, T. 1980. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a possible new crop for sweetening resource in Japan. *J. Central Agricultural Exp. Stn.*, 31:1–71
- Taiariol, D. R. 2004. Characterization of the *Stevia rebaudiana* Bert. [Online] Available: http://www.monogafias.com/trabajos_13/stevia/stevia.html
- 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 glycosides. *Plant Cell Rep.*, 3:180-182.
- Tateo, F; Mariotti, M; Bononi, M; Lubian, E; Martello, S; Cornara, L. 1998. Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguay. *Italian J. Food Sci.*, 10: 261-267.

- Toruan-Mathius, N; Pratiwi, T; Hutabarat, T. 1995. Somaclonal variations in *Stevia rebaudiana* Bertoni irradiated with Co-60 gamma rays. *Menara Perkebunan*, 63:33-42.
- Utumi, M. M; Monnerat, P. H; Pereira, P. R. G; Fonts, P. C. R; Godinho, V. D. 1999. Macronutrient deficiencies in Stevia: Visual symptoms and effects on growth, chemical composition, and stevioside production. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 34:1039-1043.
- Vives, R; Andújar, I; Lorenzo, JC; Concepción, O; Hernández, M; Escalona, M. 2017. Comparison of different in vitro micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). *Plant Cell Tiss Organ Cult*. DOI 10.1007/s11240-017-1258-8
- Wölwer-Rieck, U. 2012. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *J. Agric Food Chem.*, (60):886–895.
- Yadav, AK; Singh, S; Dhyani, D; Ahuja, S. 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can J Plant Sci.*, 91:1-27.
- Yoneda, Y; Shimizu, H; Nakashima, H; Miyasaka, J; Ohdoi, K. 2017. Effects of light intensity and photoperiod on improving steviol glycosides content in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) while conserving light energy consumption. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*,
- Yücesana, B; Mohammed, A; Büyükgöçmen, R; Altug, C; Kavas, Ö; Gürel, S; Gürel, E. 2016. In vitro and ex vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni with high Rebaudioside- A content—a commercial scale application. *Scientia Horticulturae*, 203: 20- 28.
- Zubaite, F. 2008. Manual del cultivo de la stevia (Hierba Dulce). Universidad Agraria La Molina, Lima. Recuperado de: www.lamolina.edu.pe.