

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**



**“DESINFECCIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO PARA LA  
MICROPROPAGACIÓN DE UNA ACCESIÓN Y UN  
MUTANTE DE *Stevia rebaudiana* Bertoni”**

**Presentada por:  
LIZ JULIETA LLIHUA QUISPE**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**Lima - Perú**

**2023**

## Document Information

<b>Analyzed document</b>	TESIS PA CON CARÁTULA NUEVA (5to).docx (D144385560)
<b>Submitted</b>	9/19/2022 7:04:00 PM
<b>Submitted by</b>	Rember Emilio Pinedo Taco
<b>Submitter email</b>	rpinedo@lamolina.edu.pe
<b>Similarity</b>	2%
<b>Analysis address</b>	rpinedo.unalm@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

<b>SA</b>	<b>TALLER+2B+BIODIVERSIDAD.pdf</b> Document TALLER+2B+BIODIVERSIDAD.pdf (D142379276)		<b>7</b>
<b>SA</b>	<b>1559679226_442__Efecto_de_2_auxinas.pdf</b> Document 1559679226_442__Efecto_de_2_auxinas.pdf (D53501054)		<b>2</b>
<b>SA</b>	<b>Eficiencia de la multilicaci3n de Juglans neotr3pica (nogal) en BIT .docx</b> Document Eficiencia de la multilicaci3n de Juglans neotr3pica (nogal) en BIT .docx (D23917915)		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>submission.docx</b> Document submission.docx (D111268933)		<b>1</b>

## Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
 ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
 "DESINFECCIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE UNA ACCESIÓN Y UN MUTANTE DE Stevia rebaudiana Bertoni"  
 Presentada por: LIZ JULIETA LLIHUA QUISPE  
 TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
 Lima - Perú 2022 UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
 ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
 "DESINFECCIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE UNA ACCESIÓN Y UN MUTANTE DE Stevia rebaudiana Bertoni"  
 TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO MAGISTER SCIENTIAE  
 Presentada por: LIZ JULIETA LLIHUA QUISPE  
 Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:  
 Mg.Sc. Gilberto Rodríguez Soto Mg.Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa PRESIDENTE ASESOR  
 Mg.Sc. Jorge Tobaru Hamada Ph.D. Rember Pinedo Taco MIEMBRO MIEMBRO  
 DEDICATORIA  
 A mi madre agricultora y comerciante quien influyó en mí interés por el estudio de las plantas. A mi familia por estar siempre presente y motivándome a seguir avanzando.  
 AGRADECIMIENTOS Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:  
 A la empresa Grupo AJE, por el financiamiento económico brindado, y al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina por permitirme realizar la tesis es sus instalaciones.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**“DESINFECCIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO PARA LA  
MICROPROPAGACIÓN DE UNA ACCESIÓN Y UN  
MUTANTE DE *Stevia rebaudiana* Bertoni”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:**

**LIZ JULIETA LLIHUA QUISPE**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Mg.Sc. Gilberto Rodríguez Soto  
**PRESIDENTE**

Mg.Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa  
**ASESOR**

Mg.Sc. Jorge Tobaru Hamada  
**MIEMBRO**

Ph.D. Rember Pinedo Taco  
**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

*A mi madre agricultora y comerciante quien influyó en mi interés por el estudio de las plantas.*

*A mi familia por estar siempre presente y motivándome a seguir avanzando.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A la empresa Grupo AJE, por el financiamiento económico brindado, y al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina por permitirme realizar la tesis en sus instalaciones.

Al Ing. Angel Eduardo Añaños Jeri, por sus valiosas recomendaciones para el buen desarrollo del trabajo de investigación.

A mi asesora Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa, quien fue un gran apoyo por sus consejos en el proceso de la experimentación y en la redacción del presente trabajo.

A mi comité evaluador integrado por el Mg.Sc. Gilberto Rodríguez Soto, el Ph. D. Rember Pinedo Taco y el Mg.Sc. Jorge Tobaru Hamada, por las valiosas observaciones a la redacción del trabajo.

A la Ing. Rossana Falcón, por compartirme su experiencia relacionada al manejo del laboratorio y por sus orientaciones en algunos procesos de producción *in vitro* de diferentes cultivos.

A la técnica Milagros Manchay, por ser muy atenta y apoyarme en la preparación de medios de cultivo.

A mis dos grandes amigos Popo y Panda, por su apoyo moral y compañía durante todo el proceso experimental y redacción del presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....1</b>
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....3</b>
2.1.	STEVIA .....3
2.1.1.	Origen y distribución.....3
2.1.2.	Clasificación taxonómica.....4
2.1.3.	Descripción botánica y distribución .....5
2.1.4.	Producción agrícola.....7
2.1.5.	Formas de propagación .....9
2.1.6.	Requerimientos climáticos.....12
2.1.7.	Siembra.....13
2.1.8.	Cosecha.....13
2.1.9.	Principales enfermedades.....13
2.2.	COMPOSICIÓN QUÍMICA DE STEVIA .....14
2.3.	APLICACIONES DE STEVIA .....17
2.4.	MEJORAMIENTO GENÉTICO .....20
2.5.	MEJORAMIENTO CON RADIACIÓN .....21
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....24</b>
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN .....24
3.2.	MATERIALES .....24
3.2.1.	Material vegetal.....24
3.2.2.	Equipos, reactivos e insumos.....25

3.3.	METODOLOGÍA .....	26
3.3.1.	Método.....	26
3.3.2.	Diseño experimental.....	29
3.3.2.	Variables de evaluación .....	33
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
4.1.	INTRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> : DESINFECCIÓN DE EXPLANTES DE STEVIA ACCESIÓN MISKIBAMBA.....	37
4.2.	INTRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> : MEDIO DE INICIO DE STEVIA ACCESIÓN MISKIBAMBA .....	39
4.3.	INTRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> : FACTOR ENVASE DE SIEMBRA PARA STEVIA ACCESIÓN MISKIBAMBA.....	40
4.4.	MULTIPLICACIÓN <i>IN VITRO</i> DE STEVIA ACCESIÓN MISKIBAMBA.....	42
4.5.	ENRAIZAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE STEVIA ACCESIÓN MISKIBAMBA .....	46
4.6.	COMPARACIÓN DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO <i>IN VITRO</i> DE MISKIBAMBA ORIGINAL Y MUTANTE.....	51
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>57</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Composición nutricional de la stevia en estado natural .....	16
Cuadro 2. Nombres químicos de algunos componentes de la hoja de stevia .....	16
Cuadro 3. Aplicaciones de stevia en los diferentes campos de acción .....	18
Cuadro 4. Empresas con ventas de productos a base de stevia.....	19
Cuadro 5. Tratamientos de desinfección superficial .....	29
Cuadro 6. Tratamientos de medios de inicio según consistencia y macronutrientes .	30
Cuadro 7. Factor envase para la siembra de nódulos de stevia.....	30
Cuadro 8. Medios de multiplicación.....	31
Cuadro 9. Medios de enraizamiento .....	32
Cuadro 10. Miskibamba original y mutante en los mejores medio de cultivo .....	32
Cuadro 11. Comparación de tratamientos de desinfección de diferentes autores .....	38
Cuadro 12. Medios de inicio sobre la longitud, números de nudos y brotes de plántulas .....	39
Cuadro 13. Masa fresca, materia seca y humedad de plántulas en los diferentes tratamientos .....	42
Cuadro 14. Masa fresca, materia seca y humedad de plántulas obtenidas en los diferentes tratamientos de enraizamiento .....	46
Cuadro 15. Comparación de peso fresco, seco y humedad de explante Miskibamba original y un mutante .....	51
Cuadro 16. Resultado de número de brotes, nudos, hojas, longitud de plántula y raíz	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Países de Sudamérica donde crece espontáneamente <i>S. rebaudiana</i> .....	6
Figura 2. Regiones del mundo donde es posible cultivar <i>S. rebaudiana</i> . .....	7
Figura 3. Estructura del esteviol. ....	17
Figura 4. Proceso de introducción <i>in vitro</i> de stevia: a) Colección de explante de invernadero, b) Lavado en detergente, c) Predesinfección en Benomil, d) Sumergimiento en hipoclorito de sodio, e) Siembra en los explantes desinfectados .....	27
Figura 5. Porcentaje de contaminación y de supervivencia.....	38
Figura 6. Plántulas de stevia en diferentes medios de inicio: a) Plántula en medio sólido con 100% de sales de MS, b) Plántula en medio sólido con 50% de sales de Ms, c) Plántula en medio líquido con 100% de sales de MS, d) Plántula en medio líquido con 50% de sales de MS .....	39
Figura 7. Gráfica de barras de la influencia del factor envase: a) Sobre la longitud de la plántula, b) Sobre el número de brotes y nudos formados.....	40
Figura 8. Nudos, hojas y brotes de plántulas obtenidas en los diferentes tratamientos .....	43
Figura 9. Longitudes de plántulas obtenidas en los diferentes tratamientos. ....	44
Figura 10. Coloración de hojas de plántulas desarrolladas en los diferentes tratamiento .....	45
Figura 11. Influencia de los medios de enraizamiento sobre las longitudes de plántulas .....	47

Figura 12.	Desarrollo de nudos, hojas y brotes de las plántulas en los tratamientos de enraizamiento .....	48
Figura 13.	Evaluación del desarrollo de raíz en los diferentes tratamientos: a) Plántulas con raíz desarrolladas en los diferentes tratamientos de enraizamiento, b) Longitud de raíz.....	49
Figura 14.	Coloración de las hojas de las plántulas en los tratamientos de enraizamiento .....	50
Figura 15.	Interacción de Explante * Medio de cultivo en la formación de número de hojas de Miskibamba original y el mutante.....	53
Figura 16.	Interacción de Explante * Medio de cultivo en la longitud de plántulas desarrolladas de Miskibamba original y el mutante.....	54
Figura 17.	Interacción de Explante * Medio de cultivo en la longitud de raíces desarrolladas de Miskibamba original y el mutante.....	54
Figura 18.	Comparación de la variable clorosis de Miskibamba original y un mutante .....	55

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Resumen de los análisis estadísticos de la introducción <i>in vitro</i> – Desinfección. .....	65
Anexo 2. Resumen de los análisis estadísticos de la introducción <i>in vitro</i> – Medio de inicio .....	66
Anexo 3. Resumen de los análisis estadísticos de la introducción <i>in vitro</i> – Factor envase .....	68
Anexo 4. Stevia sembradas en frasco y tubo .....	69
Anexo 5. Resumen de los análisis estadísticos de la multiplicación <i>in vitro</i> de stevia accesión Miskibamba.....	69
Anexo 6. Análisis estadístico de Enraizamiento <i>in vitro</i> de stevia accesión Miskibamba... .....	73
Anexo 7. Análisis estadístico de la comparación de crecimiento y desarrollo <i>in vitro</i> de stevia Miskibamba original y mutante .....	78
Anexo 8. Plántulas desarrolladas en diferentes medios de multiplicación: a) 1,3 mg/L Kinetina en medio MS, b) 4 mg/L Kinetina en medio MS, c) 6 mg/L Kinetina en medio MS, d) 1,3 mg/L Kinetina en medio MS/2, e) 4 mg/L Kinetina en medio MS/2, f) 6 mg/L Kinetina en medio MS/2, g) Medio MS (Libre de regulador de crecimiento). .....	82
Anexo 9. Plántulas desarrolladas en diferentes medios de enraizamiento: a) 0.5 mg/L de AIB, b) 1 mg/L de AIB, c) 2 mg/L de AIB, d) 0.1mg/L de ANA, e) 0.2 mg/L de ANA, f) 0.5 mg/L de ANA, g) Control (Libre de regulador de crecimiento).....	83

Anexo 10. Comparación de plántulas de stevia mutante y original: a) Plántula mutante sembrado en medio MS, b) Plántula original sembrado en MS, c) Plántula mutante sembrado en MS+0.2 mg/L de ANA, d) Plántula original sembrado en MS+0.2 mg/L de ANA.....84

## RESUMEN

El cultivo *in vitro* es un método de propagación vegetativo que permite obtener plántulas uniformes, rápida multiplicación clonal e ideal para conservar características genotípicas. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la influencia de la desinfección superficial y medios de cultivo en cada una de las etapas de micropropagación *in vitro* (inicio, multiplicación y enraizamiento) para una accesión y un mutante de stevia. En la desinfección superficial se desarrollaron ocho tratamientos (3; 5; 10; 25 minutos de sumergimiento en 1 % y 1,8 % de NaClO). Se evaluó la consistencia (líquido y sólido) y concentración (50 % y 100 %) de sales del medio MS como medio de inicio. También se comparó el tipo de envase para la propagación. En la etapa de multiplicación *in vitro* se determinó la influencia de kinetina (0,3; 4 y 6 mg/L) sembrados en medios sólido con 50 % y 100 % de sales de MS. En la etapa de enraizamiento *in vitro* se evaluó la de auxina (0,5; 1 y 2 mg/L de AIB y 0,1; 0,2 y 0,5 mg/L de ANA). Finalmente se comparó algunas características morfológicas de la accesión Miskibamba y un mutante en el mejor medio obtenido. Para la desinfección resultó mejor sumergir durante 3 minutos en 1,8 % de NaClO. Los medios de inicio elegidos fueron con 50 % y 100 % de sales de MS sólido. El uso de los frascos de vidrio fue ideal para la propagación *in vitro*. El medio de cultivo para la multiplicación y enraizamiento *in vitro* fue MS + 0,2 mg/L de ANA, porque permitió obtener plántulas con mayor longitud, número de entrenudos, hojas y raíz, y en consecuencia mayor número de explantes para subcultivar. Las plántula mutantes tuvieron mejor longitud, hojas y raíz en medio de MS sin regulador de crecimiento, mientras el original en MS + 0,2 mg/L de ANA.

**Palabras claves:** Stevia, micropropagación, *in vitro*, medio de cultivo, explante.

## ABSTRACT

*In vitro* culture is a vegetative propagation method that allows obtaining uniform seedlings, fast clonal multiplication and ideal for preserving genotypic characteristics. The objective of this work was to determine the influence of surface disinfection and culture media in each of the stages of *in vitro* culture (initiation, multiplication and rooting) for an accession and a stevia mutant. In surface disinfection, eight treatments were developed (3; 5; 10; 25 minutes of immersion in 1 % and 1,8 % NaClO). The consistency (liquid and solid) and concentration (50 % and 100 %) of salts of the MS medium as starting medium were evaluated. The type of container for propagation was also compared. In the *in vitro* multiplication stage, the influence of kinetin (0,3; 4 and 6 mg/L) seeded in solid media with 50 % and 100 % MS salts was determined. In the *in vitro* rooting stage, auxin was evaluated (0,5; 1 and 2 mg/L of IBA and 0,1; 0,2 and 0,5 mg/L of ANA). Finally, some morphological characteristics of the Miskibamba accession and a mutant were compared in the best medium obtained. For disinfection it was better to immerse for 3 minutes in 1,8 % NaClO. The chosen starting media were 50 % and 100 % solid MS salts. The use of the glass vials was ideal for *in vitro* propagation. The culture medium for *in vitro* multiplication and rooting was MS + 0,2 mg/L ANA, because it allowed obtaining seedlings with greater length, number of internodes, leaves and roots, and consequently a greater number of explants to subculture. The mutant seedlings had better length, leaves and root in MS medium without growth regulator, while the original in MS + 0,2 mg/L of ANA.

Keywords: Stevia, micropropagation, *in vitro*, culture medium, explant.

## I. INTRODUCCIÓN

La stevia presenta importancia agrícola y comercial y, además, es considerada como un alimento seguro para la ingesta humana por (FAO 2008). Este cultivo posee un alto potencial para convertirse en una importante fuente de edulcorantes naturales para el creciente mercado de alimentos naturales en el futuro y ser un sustituto del azúcar comercial, debido a la actividad de sus componentes activos que funcionan como edulcorantes y contienen propiedades funcionales, no calórico y apto para el consumo por parte de pacientes diabéticos (Miao *et al.* 2016). Además, ofrecería beneficios agrícolas que permitirían cultivarla en terrenos pobres y obtener una producción comercial continua por su capacidad de rebrote (Cueva 2016).

Los componentes activos de mayor importancia en la planta de stevia son los rebaudiósidos por su gran dulzor y no presentan el gusto amargo, aunque están presentes en menor proporción. Una alternativa para mejorar la cantidad de rebaudiósidos sería aplicando mejoramiento genético de la planta, como la mutación por radiación (Jarma *et al.* 2005), que consiste en desarrollar nuevas variedades con modificaciones por radiación en su composición o funcionalidad genética.

Las modificaciones y las características deseables de los mutantes se pueden identificar comparando su crecimiento y desarrollo con la planta original, (Khalil *et al.* 2014). Esta comparación no es conveniente realizarla en el campo o por semillas porque se dificultaría controlar los factores edafoclimáticos o se generaría segregación de genes y variabilidad (Esfana 2011; Tapia 2019), además, su colecta es muy lenta, y el porcentaje de germinación es muy bajo (Alvarenga y Salazar 2015). Ante ello, una mejor alternativa sería aplicar la micropropagación, que consiste en la reproducción asexual, con uniformidad y permite perdurar las características deseables del cultivo (Delvalle *et al.* 2001).

El establecimiento de la micropropagación *in vitro* implica cultivar el explante en medios de cultivo artificiales, por lo que es necesario desarrollar medios de cultivo óptimos desde la introducción hasta la etapa de enraizamiento para producir mayor biomasa de plántulas *in vitro* y contrastarlo con un medio basal (CIAT 1991) y en condiciones estériles porque la presencia de los microorganismos contaminantes puede influir en el crecimiento, la necrosis tisular, la proliferación reducida de brotes y el enraizamiento (Delvalle *et al.* 2001). Es difícil determinar los procedimientos estándar de esterilización que se aplican a todas las plantas (Halim *et al.* 2016), se debe desarrollar un método de desinfección específico para cada tipo de explante (Halim *et al.* 2016).

Para el establecimiento *in vitro*, también es necesario tomar en cuenta otros factores como la concentración de macroelementos del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962), la consistencia del medio (sólido y líquido), el tipo y nivel de citoquinina o de auxina (Delvalle *et al.* 2001; Suárez y Salgado 2008; Taware *et al.* 2010; Arpita *et al.* 2011). Por la naturaleza heterogénea de esta planta se requiere establecer protocolos de micropropagación *in vitro* para cada genotipo (Perez *et al.* 2013; Vázquez *et al.* 2014).

Tomando en consideración lo mencionado, el presente trabajo tiene los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

- Determinar la influencia de la desinfección y medios de cultivo en la producción *in vitro* de una accesión y un mutante de stevia.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la influencia de la desinfección superficial en la etapa de introducción *in vitro* de una accesión de stevia.
- Determinar la influencia del tipo de medio de cultivo en la etapa de introducción *in vitro* de una accesión de stevia.
- Determinar la influencia del tipo de medio de cultivo en la etapa de multiplicación *in vitro* de una accesión y un mutante de stevia.
- Determinar la influencia del tipo de medio de cultivo en la etapa de enraizamiento *in vitro* de una accesión y un mutante de stevia.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. STEVIA

#### 2.1.1. Origen y distribución

*Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta originaria del Sudeste de Paraguay, de la parte selvática subtropical de Alto Paraná. Esta planta fue usada ancestralmente por sus aborígenes, como edulcorante y medicina. Sin embargo, el género *Stevia* consta de más de 240 especies de plantas nativas de Sudamérica, Centroamérica y México, con muchas especies encontradas en lugares 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*; ellos la llamaron ka'a he'ê o yerba dulce (Martínez 2015).

El botánico suizo Moisés Santiago Bertoni fue el primero que la describió, en 1887, detallando su sabor dulce. En 1900 el químico paraguayo Ovidio Rebaudi, logró aislar dos principios activos: uno amargo y otro dulce. Posteriormente, estos compuestos fueron llamados esteviósido y rebaudiosido, que son de 200 a 300 veces más dulces que la sacarosa, estables al calor y no fermentan. De ahí la denominación de la planta “*Stevia rebaudiana* Bertoni”, en honor a estos dos investigadores (Martínez 2015).

En 1955, los japoneses comenzaron a desarrollar cultivos inicialmente en Paraguay (Martínez 2002). 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” en el año 1966 (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).

En la actualidad, el cultivo comercial de stevia ocurre principalmente en Asia y América. 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. El bajo costo de producción y la disponibilidad de recursos calificados es un factor importante que impulsa el crecimiento del mercado (Gomes *et al.* 2017).

A nivel mundial, el mercado de stevia se estimó en \$ 347.0 millones en 2014 y se esperó que alcance los \$ 565.2 millones para el 2020 (Gomes *et al.* 2017). En términos de volumen de consumo, se esperó que la stevia pueda alcanzar 8 506.9 toneladas para fines de 2020, registrando un crecimiento anual de alrededor del 7 - 8 % 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 \$ 3 millones registradas en esteviósido en 2016 (Gomes *et al.* 2017).

### **2.1.2. Clasificación taxonómica**

La stevia presenta la siguiente clasificación taxonómica (propuesta por APG III – IV):

Reino Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asterorideae

Tribu: Eupatorieae

Género: *Stevia*

Especie: *Stevia rebaudiana* Bertoni

Nombres comunes: Stevia, hoja dulce de Paraguay, *caa él éé, jheéé de kaa, ca un jhei, Ka'a He'ê ca un yupi, azucacaa, caa de eira, doce de capim, doce de erva*, hierba de dulce, yerba de miel, *honeyleaf, waan de yaa*, honey leaf, hoja de dulces (Garay 2007).

### 2.1.3. Descripción botánica y distribución

Es una planta herbácea perenne, de tallo erecto, levemente pilosa en las extremidades, subleñoso, pubescente; durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo, llegando a producir hasta 20 tallos en tres a cuatro años; puede alcanzar hasta 90 cm de altura en su hábitat natural y en los trópicos puede llegar a tener alturas superiores a 100 cm; la raíz es pivotante, filiforme y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie (Martínez 2015).

La stevia presenta hojas pequeñas, lanceoladas, muy dulces, opuestas en verticilos alternados, sésiles. La parte más pequeña de la hoja se encuentra en la parte superior. Su flor es hermafrodita de pocas apariencias dispuestas en pequeños capítulos terminales o axilares, agrupadas en panículas corimbosas, entre dos a seis flores de cinco mm de longitud por inflorescencia, el pedicelo de uno a dos mm, la corola tiene forma campanular de color blanco (Garay 2007).

La planta es autoincompatible (protandria), por lo que la polinización es entomófila; se dice que es de tipo esporofítico y clasificada como apomíctica obligatoria. El fruto es un aquenio que puede ser claro (estéril) u oscuro (fértil) y es diseminado por el viento. Existen otras especies como: *Stevia eupatoria, S. obata, S. plummerae, S. salicifolia* y *S. serrata* (Martínez 2015).

La *Stevia rebaudiana* pertenece a la familia Asteraceae. Cabe señalar que *S. rebaudiana* cuenta con más de 144 variedades a nivel mundial, destacando a Morita 2; además, esta especie presenta numerosos ecotipos; también la variedad Ariete es actualmente muy cultivada, debido a su mayor edulcoración (Martínez 2015). Estas variedades pueden exhibir una alta diferenciación morfológica e incluso niveles de ploidía, que se traducen en plantas de mayor porte, incremento en el tamaño de los órganos y de las células e incluso mejor

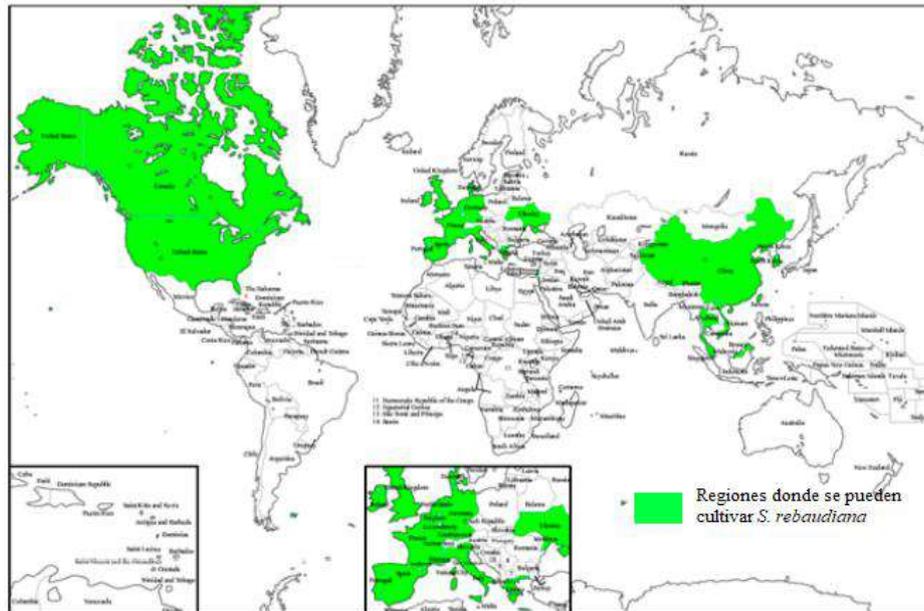
adaptabilidad. Los caracteres morfo-anatómicos vegetativos con valor taxonómico para la identificación de las especies de stevia, corresponden a tipos de tricomas, ubicación de estomas, cavidades secretoras asociadas a los haces vasculares de la nervadura central y peciolo, presencia de granos de almidón en el parénquima asociado a los haces vasculares y colénquima cercano a los haces vasculares. Los índices de empalizada y estomáticos, pueden ser utilizados como elementos de apoyo para identificar la autenticidad de hojas de stevia rebaudiana, comercializadas actualmente en diferentes centros de venta del Paraguay, además de la caracterización propia del tejido epidérmico, tanto adaxial como abaxial, tipos y ubicación de estomas (Sanchez *et al.* 2017).

Es un arbusto perenne, que crece espontáneamente en los hábitats subtropicales, mesotérmicos y húmedos de América del Sur (Figura 1), y se cultiva en al menos en tres continentes (Figura 2), particularmente en Asia, desde China hasta Tailandia (Fabrizio *et al.* 2015).



**Figura 1. Países de Sudamérica donde crece espontáneamente *S. rebaudiana***

Fuente: Fabrizio *et al.* (2015)



**Figura 2. Regiones del mundo donde es posible cultivar *S. rebaudiana***

Fuente: Fabrizio *et al.* (2015)

#### **2.1.4. Producción agrícola**

Desafortunadamente, la stevia fracasó como cultivo comercial cuando se introdujo por primera vez en Malasia a mediados de la década de 1970 a falta de una variedad adecuada (Miao *et al.* 2016). La stevia se clasifica como una planta de día corto con una duración del día crítica de al menos aproximadamente 13 y 14 horas según el ecotipo (Miao *et al.* 2016). La corta duración del día en Malasia (menos de 13 horas) conduce a una floración temprana en la stevia, con un menor porcentaje de contenido de edulcorantes. Estudios previos demostraron que el crecimiento vegetativo y el contenido de esteviósidos de la stevia disminuyeron cuando la duración del día era menor a las 13 horas críticas (Miao *et al.* 2016).

La planta fue introducida al Perú hace una década y actualmente se ha incorporado en el portafolio de cultivos en pequeñas extensiones en algunas zonas como Cajamarca, Amazonas, San Martín, Huánuco, Huacho, Ucayali, y Apurímac de manera orgánica (Cruz y Maurate 2018). Además de Piura, donde la empresa de nacionalidad belga, Stevia One, ha estado invirtiendo para la siembra y el procesamiento de stevia (La República 2020).

Las nuevas técnicas de producción permiten mejorar sustancialmente el rendimiento y la calidad en comparación al sistema tradicional de producción no tecnificado. Esto es posible si se aplican los conocimientos técnicos relacionados al manejo del cultivo, en condiciones que pueden desarrollar el potencial de producción que poseen, tal es así que a altitudes

menores a 1000 msnm los rendimientos alcanzan hasta las 12 t/año considerando un distanciamiento de 0.40 m entre surcos y 0.20 m entre plantas.

El rendimiento está en función al mayor número de cortes, además de las características edáficas y climáticas. En las zonas más bajas de la selva, el número de cortes es mayor, llegándose a cosechar hasta ocho cortes al año. En tal sentido las zonas donde se recomienda masificar su producción es en la zona de selva, y en condiciones de sierra en los valles interandinos a altitudes menores de 1800 msnm (Cueva 2016).

La stevia puede cultivarse en terrenos relativamente pobres. Estas plantas pueden utilizarse para producción comercial durante varios años (cinco o seis años) por su capacidad de rebrote de la planta cada vez que es cortada (Cueva 2016). Por otro lado, se ha reportado que en condiciones donde el clima es húmedo y suelo fértil, mayor crecimiento de plantas, producción de biomasa y extracción nutrimental, mientras que un clima seco y los suelos son pobres en nutrientes, mayor producción de terpenos totales (Romero *et al.* 2020).

El factor principal que afecta el contenido de glucósidos diterpénicos en la stevia es la floración (Gomes *et al.* 2017). La radiación también es extremadamente importante y se ve considerablemente afectada por las densidades de siembra, siendo determinante en la producción de biomasa y compuestos edulcorantes (Gomes *et al.* 2017).

Estudios previos confirmaron que el contenido máximo de Glucósidos Steviol en la stevia se logró justo antes de la floración, y la floración tardía con días largos proporciona una mayor duración de la acumulación de glucósidos de esteviol (Miao *et al.* 2016).

Diferentes estudios demostraron que la germinación de las semillas de stevia y el corte de tallos no son enfoques adecuados para la producción de biomasa saludable y Steviosidos. Debido a que las semillas de stevia perdieron su viabilidad durante el almacenamiento, el corte de tallos necesita un stock de insumos más alto y laborioso (Khalil *et al.* 2014).

Teniendo en cuenta la importancia económica del cultivo, se han realizado estudios para definir las prácticas de manejo más adecuadas para aumentar los rendimientos de biomasa y los contenidos de los compuestos de interés (Jarma *et al.* 2010, Mandal *et al.* 2013, Moraes *et al.* 2013, Pal *et al.* 2013, Serfaty *et al.* 2013, Kumar *et al.* 2014, Barbet-Massin *et al.* 2015, citados por Gomes *et al.* 2017). Entre las diferentes prácticas de manejo para el cultivo, la densidad de las plantas y el tiempo de cosecha parecen tener una influencia decisiva en la producción tanto de biomasa como de glucósidos diterpénicos (Gomes *et al.* 2017).

Con respecto a la influencia del espaciado de plantas, se recomiendan densidades entre 83 000 y 111 000 plantas/ha para rendimientos más altos de biomasa y compuestos edulcorantes (Madan *et al.* 2010, Serfaty *et al.* 2013, Kumar *et al.* 2014, citados por Gomes 2017).

Actualmente, en el Perú existen tres empresas peruanas que la producen: Stevia Coronel SAC, Stevia Perú SAC y Steviaperú (Rojas 2009). Además, cuatro empresas de capitales extranjeros Stevia Biotech (de origen suizo, en 4000 Has) Stevia One (en 10000 Has), VKP Américas (en 10000 Has) y un grupo económico de origen coreano (en 100 Has, en Puno) y dos peruanas (100 Has cada una, en Tumbes) que analizaron el estudio de mercado y proyectan invertir en Perú \$ 10,3 millones. Se considera que la producción podría dar 4 cosechas por año y tener una vida útil de 8 años y se podría obtener por hectárea hasta 6 TM (Rojas 2009).

### **2.1.5. Formas de propagación**

#### **a. Sexual**

La stevia se reproduce sexualmente por aquenios, observándose alta heterogeneidad en las poblaciones resultantes, debido a la polinización cruzada; gran parte de sus aquenios son estériles, livianos y de fácil dispersión por el viento (Melillo 2000, citado por Martínez 2015).

La producción natural es por semillas, pero la recolección de la semilla es lenta y difícil debido a que la floración no es uniforme, lo que afecta a la maduración de la semilla; estas deben guardarse en condiciones de baja temperatura y humedad relativa, preferentemente en la oscuridad y en envases herméticos; sin embargo, el porcentaje de germinación es bajo, entre 10 y 38 % (OMS 1992, citado por Martínez 2015).

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

### **b. Asexual**

Debido a la alta heterogeneidad de las plantas obtenidas a través de semillas, la propagación agámica es la mejor, ya que conserva las características de la planta madre. Ésta puede ser por retoños, estacas, cultivo de tejidos (Martínez 2015), entre otras.

La propagación por estacas es el método de propagación asexual, para tratar de obtener materiales homogéneos; pero, el hábito de crecimiento y el tamaño limitado de la planta hacen la propagación por estacas lenta e ineficiente para producir grandes cantidades, y se obtiene bajo número de individuos por planta (Alvarenga y Salazar 2015); para esto es importante tener una buena plantación madre con sanidad vegetal, que va a proveer del material vegetativo inicial y complementar con otro método de saneamiento. Bonilla *et al.* (2007), compararon la siembra de estacas apicales y basales de stevia, de ello concluyeron que resulta mejor la siembra de estacas apicales y en sustrato carbonilla-arena 1:1, volumen.

### **c. Asexual – Cultivo de tejidos**

El cultivo de tejidos es otro método de propagación vegetativa que permite plantaciones más uniformes; además, se obtiene una rápida multiplicación clonal, con un mayor número de plantas por superficie utilizada, mayor control sanitario, fácil transporte para intercambio internacional de materiales y la posibilidad de multiplicar rápidamente especies en peligro de extinción (Martínez 2015).

En las técnicas de cultivo de tejidos a veces se observa una variación en la morfología entre las plantas regeneradas *in vitro*, el cual es explicado como variación somaclonal (Larkin y Scowcroft 1981, citados por Gosh *et al.* 2018). El término somaclonal hace referencia a plantas derivadas de cualquier forma de cultivo celular, y variación somaclonal es la variación fenotípica mostrada entre tales plantas, debido a la exposición reciente a algún regulador de crecimiento exógeno u otro factor ambiental, y es de importancia significativa porque posiblemente altere la propagación comercial o la conservación del germoplasma (Debnath *et al.* 2012, citados por Gosh *et al.* 2018); algunos autores como Larkin y Scowcroft (1981), citados por Gosh *et al.* (2018), han sugerido que este fenómeno puede resultar tener algún valor como herramienta en el mejoramiento de las plantas,

La propagación *in vitro* o micropropagación es un método del Cultivo de tejidos, se define como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en las plantas de

órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas “limpias”, contrario a la propagación vegetativa no aséptica o convencional (Martínez 2015).

La micropropagación consta de cinco etapas; la etapa 0 o inicial para seleccionar una planta madre; la etapa I de iniciación o establecimiento para el cultivo inicial o primario; la etapa II de multiplicación de brotes; la etapa III de enraizamiento o pre-trasplante para producir una planta autotrófica que sobreviva en las condiciones de trasplante del suelo y la etapa IV de transferencia final al medio ambiente (Martínez 2015).

Sin embargo, en trabajos de multiplicación realizados en Ecuador se han variado las etapas tradicionales del cultivo de tejidos; selección del explante (etapa 0); de introducción en cultivo inicial (etapa I); multiplicación *in vitro* (etapa II); multiplicación en sistema autotrófico hidropónico, en sustrato de coco (etapa III); enraizamiento y aclimatación (etapa IV) en bandejas de multiplicación (Martínez 2015).

La selección del mejor explante (secciones de hojas, micro-estacas, raíces, meristemos, entre otros) es muy importante ya que de esto dependerá la futura propagación. En Ecuador se ha realizado la introducción mediante el uso de micro-estaca con yemas laterales y apicales (Martínez 2015), pero otros investigadores recomiendan la aplicación de explantes nodales (Seyis *et al.* 2017).

En la etapa de introducción en cultivo inicial explante se realiza la desinfección, con soluciones de jabón líquido; solución de yodo, y finalmente por un fungicida. Luego, se enjuagan con agua destilada estéril y se llevan los explantes a la cámara de flujo laminar, donde se realiza una desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) variando su concentración y tiempo de sumergimiento (Aguilar *et al.* 2016).

Finalmente se introduce en el medio de cultivo, que consta de las sales MS suplementado con 20-30 gramos de sacarosa, y de agar; el pH se ajusta a 5,6 (Martínez 2015). Para este medio inicial antes de emplear se puede optimizar el medio variando la consistencia y la concentración de los macroelementos (Espinal *et al.* 2006).

La etapa de multiplicación *in vitro* se realiza en la cámara de flujo laminar, donde se cortan con tijera segmentos apicales y uninodales; estos se seleccionan y se siembran en diferentes en nuevos envases que contienen medios de cultivo MS el cual se suplementa de la misma forma que la fase anterior, con la diferencia de que la concentración de agar, se reduce de 4 al 4,5 % y el pH se ajusta 5,7-5,8 (Martínez 2015). En esta etapa se puede adicionar

reguladores de crecimiento vegetales al medio de cultivo, como en los siguientes casos que obtuvieron mejor formación de brotes múltiples y largos a partir de segmentos nodales empleando un medio MS suplementado con BAP (0.5 mg / L) + Kn (0,5 mg /L) o vitaminas con Ácido giberélico 0,5 mg /L (Verma *et al.* 2011) o 6  $\mu$ M de kinetina (Espinal *et al.* 2006).

Para la etapa de enraizamiento *in vitro*, diferentes experimentos recomiendan suplementar los medios de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento vegetales en (Seyis *et al.* 2017). Los reguladores de crecimiento, en especial las auxinas, en general pueden servir para inducir el enraizamiento; Suarez y Quintero (2014) obtuvieron mejor enraizamiento empleando 10,74  $\mu$ M de ANA.

### **2.1.6. Requerimientos climáticos**

La stevia en su estado natural, crece en la región subtropical, semihúmeda de América, con precipitaciones que oscilan entre 1400 a 1800 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 18-30°C, no puede soportar temperaturas invernales por debajo de -6°C (Cueva 2016); humedad relativa de 75 a 85 %. Esta 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).

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. Esta planta 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).

### **2.1.7. Siembra**

Ramírez (2005), citado por Martínez (2015), recomienda sembrarla a distancias de 20 cm entre hileras y 16 cm entre plantas, lo que equivale a una densidad de plantas por hectárea de 180 000. Es importante para tener un mejor manejo de la plantación, trazar caminos amplios de tres metros de ancho, cada 100 metros.

### **2.1.8. Cosecha**

En la stevia la parte útil con fines comerciales son las hojas frescas, las cuales se toman cuando las plantas presenten como máximo un cinco por ciento de botones florales, haciendo un corte entre los seis y ocho centímetros del suelo, tomando todas la hojas frescas y sanas disponibles y dejando en la planta de dos a tres pares de hojas. El mayor rendimiento del cultivo se presenta en los tres primeros años y, si las condiciones ambientales y de mercado son favorables, se realizan hasta cuatro cosechas al año (Martínez 2015).

### **2.1.9. Principales enfermedades – agentes causales**

Las plagas más frecuentes de stevia son los ácaros e insectos masticadores, raspadores y succionadores. Los insectos masticadores *Diabrotica sp.*, *Pseudoplusia includens*, *Spodoptera sp.* y *Schistocerca sp.* ocasionan daños directos en la producción. Se recomienda no sembrarse en áreas cercanas a plantaciones de cucurbitáceas, leguminosas o gramíneas (maíz). Las plagas chupadoras y raspadoras (Hemiptera, Homoptera, Acari y Thysanoptera) causan daño indirecto, pues se alimentan de la savia o del jugo celular, disminuyendo el crecimiento de la planta por reducción de foto asimilados disponibles (Martínez 2015). Aunque, Yadav (2011) afirman que la planta puede presentar cierta repelencia a insectos debido a su dulzura que se concentran en las hojas y de esta forma no requieren insecticidas en una base esencial como en otros cultivos, el cual favorece la producción orgánica.

Los problemas fitopatológicos mayores son los ocasionados por hongos y nematodos. Los tres primeros grupos de enfermedades (marchitamiento, manchas necróticas y ennegrecimiento y cancro) son los que mayores daños ocasionarían a la producción de este rubro. Los hongos *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.* y *Sclerotium sp.* ocasionan la muerte de las plantas, y las manchas foliares son producidas por *Septoria sp.* y *Alternaria sp.*, los que podrían reducir en mayor medida el volumen y la calidad de las hojas comerciales. Las manchas necróticas influyen negativamente en la calidad del producto, dando lugar a que las

hojas se clasifiquen en una categoría inferior y de menor precio. Los daños en el tallo reducirían el tamaño de las plantas, debido a la muerte progresiva de los ramos (Martínez 2015).

Hasta la actualidad, han sido identificados 11 géneros de fitonemátodos que afectan al cultivo de la stevia. El género *Meloidogyne sp.* es el que mayor incidencia negativa, debido a la dificultad en su control, lo que ha provocado daño a un gran número de especies hortícolas que se producen asociadas a este cultivo y a la misma. Para minimizar la fuente de inóculo de los patógenos se recomienda no sembrar cercano a áreas de producción de plantas aleoginosas, y para reducir el efecto de los nemátodos, se recomienda no establecer el cultivo en un suelo donde anteriormente se han cultivado hortalizas, así como evitar realizar la producción de plántulas aprovechando los locales utilizados en las huertas familiares o comerciales. Otra medida es la de evitar el trasplante de mudas provenientes de lugares infestados (Martínez 2015).

## **2.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE STEVIA**

La planta en estado natural presenta una composición nutricional como se muestra en el Cuadro 1 (DuBois 2000, Jakinovich *et al.* 1990; citados por Miao *et al.* 2016).

Las hojas de stevia contienen una mezcla compleja de glucósidos diterpeno-esteviósidos naturalmente dulces (4-13% de hoja seca), rebaudiósido A (2-24%), rebaudiósido C (1-2%), dulcósido A (0,4 – 0,7%), esteviolbíosido y rebaudiósido B, D, E, F y M (niveles de trazas) responsables del sabor dulce de la planta: esteviósido, rebaudiósido A, B, C, O, E y F, dulcosida A, rubusosida y steviolbiosida (Bursac *et al.* 2018). En el Cuadro 2 se presentan las estructuras químicas de esteviosidos, rebaudiósidos A y B, y ducósidos.

El steviosido es un glucósido que comprende 60-70% 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% 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, citados 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% de rebaudiósido A. Las stevias tradicionales poseen 30% de este elemento (Rojas 2009).

El rebaudiósido A no sólo se convierte en un preciado elemento por su sabor y cualidades nutraceuticas (cada tonelada de la variedad Criolla cuesta hasta US\$ 5000). Desde que la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) haya aprobado su uso en el 2008, la hace también atractiva, especialmente para las principales marcas mundiales de gaseosas (Rojas 2009).

La planta de stevia y su extracto 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).

La stevia contiene una mezcla de edulcorantes responsables de aportar un marcado sabor dulce a las hojas de la planta; los cuales son glucósidos de diterpenos que consisten en una mezcla de compuestos que contienen un esqueleto de esteviol (Figura 3) conjugado con cualquier número o combinación de los principales restos de azúcar (glucosa, ramnosa, xilosa, fructosa, arabinosa, galactosa y desoxiglucosa) en cualquiera de las orientaciones. El esteviol vendría a ser la aglicona de los glucósidos esteviósidos por lo que contiene extremos libre ( $R_1=R_2=H$ ). De dichos compuestos, más de 30 fueron reportados hasta la fecha, los más conocidos son el steviósido y rebaudiósido A (Wölder 2012).

Los glucósidos steviósidos se concentran más en las hojas, seguidas de flores, tallos y semillas, mientras que la raíz es el único órgano que no contiene glucósidos (Miao *et al.* 2016). Entre las principales propiedades de estos glucósidos se encuentran su alta solubilidad en agua y estabilidad en condiciones ácidas; fue aprobado por la FDA para usar como alternativa de azúcar debido a su sabor dulce; presenta escaso aporte calórico (FAO 2017, González *et al.* 2014).

La stevia posee varios beneficios terapéuticos como prevenir la caries dental, como antifúngico, antiviral, antihipertensivo, antihiperglucémico, antiinflamatorio, sus compuestos bioactivos son anticancerígenos, antidiarreico, diurético y efectos inmunomoduladores (Miao *et al.* 2016). Son útiles para los pacientes diabéticos porque la stevia presenta azúcares no asimilables y se pueden consumir como un edulcorante o

complemento alimenticio como lo emplean en Canadá, China, Indonesia, Japón, Corea, México, América del Sur, Reino Unido y Estados Unidos (Khalil *et al.* 2014).

**Cuadro 1. Composición nutricional de la stevia en estado natural**

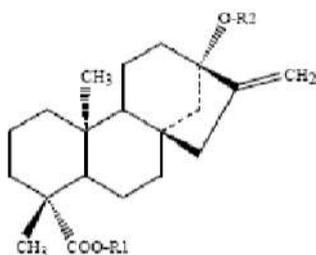
Componente	VALOR (g/100g)
Carbohidratos	60
Fibra	15
Polipéptido	16
Lípido	4
Potasio	1
Calcio	1
Magnesio	1
Fósforo	1
Cromo	<0,01
Cobalto	<0,01
Hierro	<0,01
Magnesio	<0,01
Selenio	<0,01
Zinc	<0,01

Fuente: Llanos (2006), citado por Llacta (2014)

**Cuadro 2. Nombres químicos de algunos componentes de la hoja de stevia**

Nombre	Estructura Química
Esteviósidos	13-[(2-O-β-D-glucopiranosil- β-D-glucopiranosil)oxi] ácido Kaur -16-en 18oico, β-D-glucópiranosil Éster
Rebaudiósido A	13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-3- β-D-glucopiranosil- β-D-glucopiranosil)oxi] ácido Kaur -16-en 18-oico, β-D-glucópiranosil Éster
Rebaudiósido B	13-[(2-O-a-L-glucopiranosil-3- β-D-glucopiranosil)oxi] ácido Kaur -16-en 18-oico, β-D-glucópiranosil Éster
Ducósido A	13-[(2-O-a-L-glucopiranosil- β-D-glucopiranosil)oxi] ácido Kaur -16-en 18oico, β-D-glucópiranosil Éster

Fuente: European Stevia Association Eustas (2006), citado por Llacta (2014)



**Figura 3. Estructura del esteviol**

Fuente: FAO (2017)

### 2.3. APLICACIONES DE LA STEVIA

Recientemente ha aumentado el uso alimenticio del extracto de *Stevia rebaudiana*, debido a la importancia nutricional y farmacéutica atribuida a este edulcorante natural, además de que la industria alimentaria ha enfatizado y promovido su consumo por el contenido de 0 calorías (Vázquez *et al.* 2017).

Por su contenido en compuestos fenólicos, la stevia actúa también como un excelente antioxidante y anticancerígeno; asimismo se ha demostrado que posee propiedades antibacterianas, anticonceptivas y diuréticas (Salvador *et al.* 2014).

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. Actualmente se realizan investigaciones para la alimentación de ganado vacuno, pollos y truchas con stevia (Katayama *et al.* 1976, citados por Martínez 2015). También se elaboran cremas dérmicas como cicatrizantes, en el Cuadro 3 se describen algunas de las aplicaciones de la stevia.

**Cuadro 3. Aplicaciones de stevia en los diferentes campos de acción**

<b>Campo de acción</b>	<b>Aplicaciones</b>
Farmacéuticas y nutracéuticas	Antioxidante natural.
	En personas diabéticas (no dependientes de la insulina), disminuye los niveles de glucosa en la sangre.
	En el tratamiento de la obesidad, reduce la ansiedad por la comida y el deseo de ingerir dulces o grasas.
	Diurético suave (ayuda a bajar los niveles de ácido úrico).
	Beneficioso para personas con hipertensión.
	Combate la fatiga y la depresión.
	Mejora las funciones gastrointestinales.
En alimentación humana	Mejora la resistencia frente a resfriados y gripes.
	Para el tratamiento de quemaduras, heridas, eczemas, seborrea, psoriasis, dermatitis.
Aplicaciones en Agricultura	Endulzante de alimentos: café, infusiones, chicles, caramelos, entre otros.
	Sustituto del azúcar en bebidas de bajo contenido calórico, salsas y repostería.
	Extracto de stevia con agua de riego o pulverizado. Revitaliza a los microorganismos benéficos del suelo y permite recuperar la fertilidad.
	Mejora el enraizamiento de las plantas, estimulando el crecimiento radicular.
	Purifica el suelo contaminado por agroquímicos y otras sustancias químicas.
	Aumenta la resistencia de las plantas al ataque de plagas y enfermedades.
	Mejora el estado sanitario del cultivo y por tanto aumenta su rendimiento.
En el área pecuaria	Contribuye a prevenir la caída de los frutos.
	Previene el agotamiento, por fructificación excesiva y el envejecimiento de la planta.
	Aumenta el contenido de azúcares de frutos y mejora su sabor.
	Aumenta el contenido de vitaminas minerales y otros nutrientes de las hortalizas.
	Mediante su acción antioxidante, mejora considerablemente la durabilidad de los productos en pos-cosecha.
	Saborizante de piensos (para animales de granja y domésticos).
	Dentro de algunos estudios se ha aplicado como alimento para animales en los que se ha visto el aumento de la producción, como vacunos, cerdos y aves.
Estimula el apetito.	
En el área pecuaria	Previene enfermedades reduciendo el uso de antibióticos.
	Mejora el sabor de la carne y su calidad (menor exudación y mejor conservación).
	Disminuye la cantidad de huevos rotos en ponedoras.
	Previene la erosión y ulceración de la molleja en pollos (por el estrés y exceso de producción de la histamina).

<<Continuación>>

<b>Campo de acción</b>	<b>Aplicaciones</b>
Aplicaciones medioambientales	<p>Acelera la producción de abono orgánico (compost), a partir de residuos orgánicos.</p> <p>Reduce la concentración de nitratos, dioxinas, restos de fertilizantes y pesticidas del suelo.</p>
Aplicaciones cosméticas	<p>Complemento en los tratamientos de celulitis.</p> <p>Elaboración de cosméticos y enjuagues para la higiene bucal.</p> <p>Ayuda a eliminar manchas, suaviza arrugas y embellece la piel.</p>

Fuente: Martínez (2015)

Actualmente las empresas competidoras relacionadas con la venta de productos a base de stevia en el Perú que están inscritas en el Registro Sanitario de Alimentos (Cuadro 4) son Stevia Coronel S.A.C., Nutra Stevia EIRL, Stevia Peru S.A.C., Stevia One Peru S.A.C., Stevia Salud S.A.C. (MINSA 2020).

**Cuadro 4. Empresas con ventas de productos a base de stevia**

<b>Empresa</b>	<b>Producto</b>	<b>Estado</b>	<b>Establecimiento</b>
STEVIA CORONEL S.A.C.	Mezcla en polvo de café y stevia.	Vigente	
	Mezcla en polvo de hierba luisa y stevia.	Vigente	
	Mezcla en polvo de flor de jamaica y stevia.	Vigente	
	Mezcla en polvo de moringa y stevia.	Vigente	
	Stevia atomizada.	Vigente	
	Hojas de stevia deshidratada molida.	Vigente	Mz. A Lote. 23 Co. Villa
	Filtrante para infusión de hojas de stevia.	Vigente	Vilcabamba, Ate, Lima
	Hojas de stevia deshidratada liofilizada.	Vigente	
	Hojas deshidratadas de stevia enteras y molidas.	Vigente	
	Jarabe a base de hojas de stevia.	Vigente	
NUTRA STEVIA EIRL	Mezcla en polvo de stevia y maltodextrina.	Vigente	
	Bebida a base de stevia.	Vigente	
	Bebida a base de stevia con sabor a chocolate.	Vigente	
	Concentrado en líquido de hojas de stevia.	Vigente	A.V. Resid. San Francisco Cal. 1
	Filtrales de hojas de stevia.	Vigente	Mza. B Lote. 15, San Martín De
	Hojas de stevia deshidratadas enteras y molidas.	Vigente	Porres, Lima

<<Continuación>>

<b>Empresa</b>	<b>Producto</b>	<b>Estado</b>	<b>Establecimiento</b>
NUTRA STEVIA EIRL	Mezcla a base de azúcar blanca con glicósidos de esteviol.	Vigente	A.V. Resid. San Francisco Cal. 1 Mza. B Lote. 15, San Martín De Porres, Lima
	Mezcla a base de azúcar rubia con glicósidos de esteviol.	Vigente	
	Mezcla en polvo a base de hojas de stevia con lactosa.	Vigente	
	Mezcla en polvo a base de hojas de stevia con celulosa.	Vigente	
	Mezcla en polvo a base de hojas de stevia y maltodextrina.	Vigente	
	Mezcla en polvo con glicósidos de esteviol sabor fresa.	Vigente	
STEVIA PERU S.A.C.	Mezcla de stevia y maltodextrina.	Vigente	Jr. Santa Cruz Mza. I Lote. 28 ,
	Concentrado de stevia "k' ji".	No vigente	P.J. Bella Durmiente , Rupa- Rupa, Leoncio Prado, Huánuco
STEVIA ONE PERÚ S.A.C.	Hojas deshidratadas de stevia.	No vigente	Jr. De alvarado 1041,
	Hojas de stevia deshidratadas molidas.	No vigente	Moyobamba, Moyobamba, San
	Filtrantes de hojas de stevia.	No vigente	Martín
STEVIASALUD S.A.C.	Estevia "steviasalud"	No vigente	Huerto del Eden S.R.L. Mz. V Lote 16, Ate, Lima

Fuente: MINSA (2020)

#### **2.4. Mejoramiento genético**

El mejoramiento vegetal contribuye al desarrollo de la agricultura desde el inicio de esta hasta la actualidad empleando métodos convencionales y nuevas técnicas biotecnológicas modernas (Quintana 2018).

En los programas de mejoramiento de cultivos de interés agrícola es necesario contar con una amplia base genética que garantice suficiente variabilidad para tener probabilidades de seleccionar los genotipos. Esencialmente este programa consiste en tres fases: generación de la variabilidad genética, selección de genotipos y evaluación de los genotipos seleccionados con caracteres agronómicos ideales. Se requiere un sistema que involucre herramientas complementarias al sistema de mejora convencional, buscando el aprovechamiento adecuado de la variabilidad genética con la que se cuenta. En este grupo de herramientas se

encuentran el cultivo de tejidos *in vitro*, la inducción de mutaciones y la transformación genética (Nakayama *et al.* 2018).

## 2.5. MEJORAMIENTO CON RADIACIÓN

Una mutación se define como un cambio heredado en la información genética: los descendientes pueden ser células o individuos. Las mutaciones sirven como herramientas importantes para el análisis genético: la solución para casi cualquier problema genético comienza con un buen juego de mutantes. Las mutaciones son el origen primario de la variabilidad genética y, por lo tanto, cierto control sobre su frecuencia y/o espectro puede considerarse una herramienta de gran valor para el mejoramiento de las plantas cultivadas (Nakayama *et al.* 2018).

En la naturaleza la variabilidad ocurre por adquisición de nuevas características, ya sea través de mutaciones ocurridas en el propio individuo, o bien, por recombinación genética entre individuos. Además, se puede producir de forma natural, pero cuando éstas no pueden proporcionar una fuente para un rasgo particular, es necesario recurrir a otras fuentes de variación. En tales casos, las técnicas de mutación, como por ejemplo mutación por radiación gamma, pueden proporcionar herramientas para la creación rápida de las características deseadas (Gonzales 2004).

La inducción de la mutación por la técnica de radiación gamma, ha demostrado ser útil para generar variaciones genéticas, así como para desarrollar nuevas variedades de plantas que expresan los rasgos o características deseables (Miao *et al.* 2016), como mayor resistencia a plagas, mejor adaptación a ciertos climas, mayor producción de metabolitos secundarios o simplemente con nuevas formas o colores, ayudando en algunos casos disminuir los costos de producción y en otros a elevar las ventas (Gonzales 2004).

En general cuando la radiación interacciona con un material, penetra y deposita en él toda o parte de su energía inicial. La manera en que se cuantifica esta energía es recurriendo al concepto de dosis, y se clasifican en general en tres dosis absorbida, equivalente y efectiva:

La dosis absorbida es la energía de una radiación corpuscular o electromagnética depositada en una unidad de masa; sus unidades son el gray (el gray expresa el efecto real de una radiación, es decir cuánta de su energía se depositó en el cuerpo), que corresponde a 1J/Kg.

La dosis equivalente es la suma de los productos correspondientes de la Dosis media absorbida por el factor de ponderación (éste es característico de cada radiación) y sus unidades son el Siever que corresponde a 1J/kg. La dosis efectiva que se define como la suma de los productos entre las dosis equivalentes y sus correspondientes factores de ponderación (éste es característico del órgano que recibe la radiación). Sus unidades son el Siever. También se hace uso de la tasa de la dosis efectiva, la cual indica su variación en el tiempo (mS/h, S/h, uS/h) (Mercado 2007, Alcaraz y Yagarí 2003).

La energía ejerce un efecto diferente de acuerdo al tipo y dosis de radiación y, todas ejercen su efecto sobre las macromoléculas de ADN. En particular, el alto poder de penetración de la radiación gamma produce una gran cantidad de alteraciones, aunque de manera azarosa, por lo que incrementa la probabilidad de que se induzca la mutación deseada. Sin embargo, no basta seleccionar el tipo de radiación a usar sino que deben tomarse en consideración otros factores como la radiosensibilidad, el tiempo de irradiación y la forma de aplicación. Algunos investigadores sugieren que la radiosensibilidad está relacionada con el número de cromosomas, así como con el estado de madurez que presente la parte de la planta que se irradie (Gonzales 2004).

Para el mejoramiento por radiación es necesario establecer las dosis de irradiación con mayor probabilidad de producir mutaciones efectivas y se busquen las dosis óptimas (las que induzcan los cambios deseados) que estén dentro del intervalo entre 0.1 y 1000 gray. Diversos investigadores concuerdan en que existe mayor probabilidad de producir mutaciones efectivas para hacer mejoramiento genético con dosis donde mueren el 50% de los individuos irradiados; esto es conocido como dosis letal media (DL50), es decir, se reduce el crecimiento en 50 por ciento de los individuos irradiados. Por otra parte, el genoma sufre múltiples impactos con dosis altas que producen aberraciones o cambios negativos comúnmente (Álvarez *et al.* 2017).

Por lo anterior, debe llevarse a cabo una gran cantidad de investigaciones para poder producir una mutación favorable, cuya persistencia debe comprobarse al menos en las ocho generaciones subsecuentes. Es aquí donde la combinación con otras técnicas, como la micropropagación, resulta importante, pues con ello se pueden producir varias generaciones de individuos en menos tiempo del que se requiere en condiciones de cultivo normales.

Los trabajos reportados en Cañihua (Mayta 2016) han seleccionado candidatos con mutaciones de vigor, tamaño de hoja, mayor periodo vegetativo y forma de hoja, que

podieran servir en estudios posteriores para la obtención de mutantes con resistencia a factores abióticos como la sequía o salinidad del suelo (Gonzales 2004).

Por otro lado Khalil *et al.* (2014) irradiaron semillas y callos de stevia con diferentes dosis de rayos gamma y LD50 (8,75 Gy) y el valor de GR50 (13,33 Gy) y observaron una mayor germinación (20%) en las semillas irradiadas con 2,5 Gy, y concluyeron que los brotes irradiados y luego cultivados *in vitro* ( $2,808 \pm 0,70$  mg / g-DW) sirven para obtener los mejores órganos foliares para el contenido de steviosido y rebaudiosido-A.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

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; cuya ubicación geográfica es la siguiente: 12° 05” latitud sur, 76° 57” latitud oeste y de 238 msnm de altitud.

#### **3.2. MATERIALES**

##### **3.2.1. Material vegetal**

- Miskibamba

Se trabajó con plantas de *Stevia rebaudiana* accesión Miskibamba acondicionadas en los laboratorios e invernaderos del Instituto de Biotecnología – IBT, de la Universidad Nacional Agraria La Molina. El proveedor de las mismas comentó que, “La accesión Miskibamba fue una población seleccionada de cultivos de la variedad Morita 2 establecidas en la selva peruana”. Las características específicas de selección aún no han sido publicadas a la comunidad académica.

- Mutante de Miskibamba

El material vegetal mutante fue obtenido por radiación gamma de plantas *in vitro* de la accesión Miskibamba, que sobrevivieron a la dosis media letal y a una etapa de multiplicación.

### **3.2.2. Equipos, reactivos e insumos**

#### **a. Equipos**

- Autoclave
- Potenciómetro
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Horno microondas
- Refrigeradora
- Estufa
- Agitador magnético
- Destilador

#### **b. Reactivos**

- Agua destilada
- Alcohol 96% y 70%
- Hipoclorito de sodio
- NaOH/HCl 1N
- Medios de cultivo
- Tween 20

#### **c. Insumos**

- Tijeras de podar
- Tubos de ensayo de vidrio 25x200mm y 25x150mm
- Frascos
- Tapas de tubos de propileno
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10mL
- Probetas graduadas de 10, 100, 500 y 1000mL
- Detergente
- Hojas de bisturí N° 10 y N° 11
- Mango de bisturí N° 7

- Tijera de podar
- Pinzas grandes, medianas y de punta fina
- Mechero de alcohol
- Papel toalla
- Mascarilla
- Guantes

### 3.3. METODOLOGÍA

#### 3.3.1. Método

##### a. Introducción *in vitro*: desinfección de explantes de stevia accesión miskibamba

Se trabajó con segmentos nodales (tallo corto que contiene nudo) de stevia accesión Miskibamba cultivadas en invernadero (Figura 4a). Estos explantes se lavaron con detergente y abundante agua destilada (Figura 4b). Se realizó una pre-desinfección empleando un fungicida y un bactericida. En primer lugar, los explantes fueron sumergidos en la solución fungicida Benlate (Figura 4c) a una concentración 10g/L durante 15 minutos, luego de los cuales fueron enjuagados tres veces con agua destilada. En segundo lugar, se les sumergió en un bactericida a base de sulfato de cobre penta-hidratado denominado Phyton a una concentración 10g/L durante 15 minutos y se les enjuagó tres veces con agua destilada.

Luego se les llevó a condiciones asépticas, en cámara de flujo laminar, para realizar la desinfección superficial empleando alcohol de 70° y solución de hipoclorito. Primero se les sumergió en alcohol de 70° durante un minuto y seguidamente, en soluciones de NaClO (Figura 4d) con diferentes concentraciones y tiempos de sumergimiento. Finalmente se les enjuagó con agua destilada estéril, por lo menos tres veces.

Cada nódulo desinfectado se sembró (Figura 4e) en un tubo con medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (1962) y se llevó a incubación a  $25\pm 2$  °C con un ciclo fotoperiódico de 16 horas de luz de 1000 lux y 8 horas de oscuridad, hasta aproximadamente tres semanas posteriores a la siembra, tiempo en el que se registraron las variables en estudio para este experimento.



**Figura 4. Proceso de introducción *in vitro* de stevia: a) Colección de explante de invernadero, b) Lavado en detergente, c) Sumergimiento en Benomil, d) Sumergimiento en hipoclorito de sodio, e) Siembra en los explantes desinfectados.**

**b. Introducción *in vitro*: medio de inicio de stevia accesión miskibamba**

En condiciones asépticas y en cámara de flujo laminar se sembraron los nódulos *in vitro* en tubos de ensayo con diferentes medios de cultivo, según la consistencia del medio (sólido o líquido), la concentración de macroelementos (50 ó 100 %) de Murashige y Skoog (1962); a un pH 5,8 y con 30 g/L de azúcar. Se evaluaron luego de los 25 días de incubación a  $25\pm 2$  °C con un ciclo fotoperiódico de 16 horas de luz de 1000 lux y 8 horas de oscuridad.

**c. Introducción *in vitro*: factor envase de siembra para stevia accesión miskibamba**

Se sembraron nódulos *in vitro* tanto en tubos cónicos Falcon de 50 ml como en frascos de vidrio, en condiciones asépticas, bajo cámara de flujo laminar.

**d. Multiplicación *in vitro* de stevia accesión miskibamba**

Se trabajó con plántulas ya desarrolladas instaladas en condiciones *in vitro* que estaban sembradas en el medio basal de Murashige y Skoog (1962), de 15 días de edad.

El proceso consistió en extraer los nódulos y sembrar a frascos que contenían medios de cultivo sólido con Kinetina (de concentración según tratamiento planteado); sales de Murashige y Skoog (1962) y enriquecido con 30g/L sacarosa.

Luego de la siembra, se incubó a  $25\pm 2$  °C con un ciclo fotoperiódico de 16 horas de luz de 1000 lux y 8 horas de oscuridad, Después de 15 días de incubación se evaluaron las variables.

**e. Enraizamiento *in vitro* de stevia accesión miskibamba**

Se cogieron los nódulos y se sembraron a frascos que contenían medios de cultivo sólido con diferentes concentraciones de auxina [AIB (Ácido indolbutírico) o ANA (Ácido 1-naftalenacético)] según tratamiento; sales de Murashige y Skoog (1962) y enriquecido con 30g/L sacarosa.

Estos materiales sembrados se incubaron por un periodo de tres o cuatro semanas a una temperatura  $25\pm 2$  °C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Las evaluaciones se realizaron luego de 15 días de incubación.

**f. Comparación de crecimiento y desarrollo *in vitro* de miskibamba original y mutante**

Se trabajó a partir de plántulas de Miskibamba y un mutante establecidas *in vitro* en un medio basal. Se extrajeron los nódulos y se sembraron en frascos que contenían el medio de cultivo basal y dos mejores medios de multiplicación – enraizamiento.

El mejor medio de multiplicación – enraizamiento fue elegido de las etapas anteriores descritas.

Se incubaron en un ambiente de condiciones de  $25\pm 2$  °C de temperatura, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Las evaluaciones se realizaron luego de 15 días de incubación.

### 3.3.2. Diseño experimental

#### a. Introducción *in vitro*: desinfección de explantes de stevia acesión miskibamba

Para el análisis estadístico se aplicó un Arreglo Factorial Completamente Aleatorizado, con los factores “Concentración de NaClO” y “Tiempo” de sumergimiento. La combinación de los niveles resultó en 8 tratamientos (1 %, 1,8 % de NaClO en combinación con 3; 5; 10; 25 minutos), y el ensayo se realizó con cuatro réplicas, cada réplica con 15 tubos de ensayo como unidad experimental (Cuadro 5). La unidad experimental correspondió a un explante sembrado en un tubo.

**Cuadro 5. Tratamientos de desinfección superficial**

Código	Factores		Unidad experimental (n)	Repeticiones
	[NaClO] (%)	Tiempo (minutos)		
<b>T1</b>	1	3	15	4
<b>T2</b>	1	5	15	4
<b>T3</b>	1	10	15	4
<b>T4</b>	1	25	15	4
<b>T5</b>	1,8	3	15	4
<b>T6</b>	1,8	5	15	4
<b>T7</b>	1,8	10	15	4
<b>T8</b>	1,8	25	15	4

**b. Introducción *in vitro*: medio de inicio de stevia accesión miskibamba**

Se aplicó un Arreglo Factorial Completamente Aleatorizado, cuatro tratamientos [consistencia del medio (sólido o líquido), concentración de macronutrientes Murashige y Skoog (50 ó 100 %)]. Diez unidades experimentales (10 explantes) y tres réplicas (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Tratamientos de medios de inicio según consistencia y macronutrientes**

Código	Factores		Unidad experimental	Repeticiones
	Consistencia	Macronutrientes (%)	(n)	
D1	Sólido	50	10	3
D2	Sólido	100	10	3
D3	Líquido	50	10	3
D4	Líquido	100	10	3

**c. Introducción *in vitro*: factor envase de siembra para stevia accesión miskibamba**

El análisis estadístico se realizó aplicando Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), dos tratamientos, 10 unidades experimentales para cada caso (10 explantes), tres réplicas (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Factor envase para la siembra de nódulos de stevia**

Código	Tratamientos	Unidad experimental (n)	Repeticiones
E1	Tubo	10	3
E2	Frasco	10	3

#### **d. Multiplicación *in vitro* de stevia acesión miskibamba**

Se aplicó un Diseño Completamente Aleatorizado, 6 tratamientos, de la combinación de dos mejores medios de inicio (Medios sólidos con 100 % y 50 % de macronutrientes de MS) y tres concentraciones de kinetina (1,3; 4; 6 mg/L), además del control. Se realizó, cada réplica con 20 unidades experimentales (20 plántulas evaluadas por frasco) y cinco réplicas (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Medios de multiplicación**

<b>Código</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Unidades experimentales (n)</b>	<b>Repeticiones</b>
<b>F1</b>	1,3 mg/L Kinetina + 1 MS	20	5
<b>F2</b>	4 mg/L Kinetina + 1 MS	20	5
<b>F3</b>	6 mg/L Kinetina + 1 MS	20	5
<b>F4</b>	1,3 mg/L Kinetina + 0,5 MS	20	5
<b>F5</b>	4 mg/L Kinetina + 0,5 MS	20	5
<b>F6</b>	6 mg/L Kinetina + 0,5 MS	20	5
<b>F7</b>	1 MS	20	5

#### **e. Enraizamiento *in vitro* de stevia acesión miskibamba**

Se aplicó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), 6 tratamientos [dos tipos de auxina con tres niveles cada una AIB (0,5; 1; 2 mg/L), o ANA (0,1; 0,2; 0,5 mg/L)] y tratamiento control; cada réplica con 20 unidades experimentales (20 plántulas evaluadas por frasco) y cinco réplicas (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Medios de enraizamiento**

<b>Código</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Unidades experimentales (n)</b>	<b>Repeticiones</b>
<b>G1</b>	0,5 mg/L AIB + 1 MS	20	5
<b>G2</b>	1 mg/L AIB + 1 MS	20	5
<b>G3</b>	2 mg/L AIB + 1 MS	20	5
<b>G4</b>	0,1 mg/L ANA + 1 MS	20	5
<b>G5</b>	0,2 mg/L ANA + 1 MS	20	5
<b>G6</b>	0,5 mg/L ANA + 1 MS	20	5
<b>G7</b>	1 MS	20	5

**f. Comparación de crecimiento y desarrollo *in vitro* de miskibamba original y mutante**

Se utilizó un Diseño en Arreglo Factorial Completamente Aleatorizado (DCA factorial), 4 tratamientos (tipo de explante, original y mutante sembrados en dos tipos de medios de cultivos, MS y MS con 0,2 mg/L de ANA); diez unidades experimentales (10 explantes) y tres repeticiones (Cuadro 10).

**Cuadro 10. Miskibamba original y mutante en los mejores medio de cultivo**

<b>Código</b>	<b>Factores</b>		<b>Unidad experimental (n)</b>	<b>Repeticiones</b>
	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Tipo de explante</b>		
<b>H1</b>	MS	Mutante	10	3
<b>H2</b>	MS	Original	10	3
<b>H3</b>	MS + 0,2 mg/L ANA	Mutante	10	3
<b>H4</b>	MS + 0,2 mg/L ANA	Original	10	3

### 3.3.3. Variables de evaluación

#### a. Introducción *in vitro*: desinfección de explantes de stevia accesión miskibamba

Las variables que se evaluaron fueron: Porcentaje de contaminación (Cantidad de plántulas contaminadas por bacterias u hongos expresada en porcentaje) y porcentaje de supervivencia (Cantidad de plántulas vivas de coloración verde, sin necrosis o contaminación y que lograron desarrollar al menos un brote, expresada en porcentaje); a las tres semanas de desinfección.

$$\text{Porcentaje de contaminación} = \left( \frac{\text{Plantulas con bacterias u hongos}}{\text{Número total de plantas desinfectadas}} \right) \times 100\%$$

$$\text{Porcentaje de supervivencia} = \left( \frac{\text{Plántulas vivas de coloración verde}}{\text{Número total de plantas desinfectadas}} \right) \times 100\%$$

#### b. Introducción *in vitro*: medio de inicio de stevia accesión miskibamba

Se evaluaron la longitud de plúmula (Longitud medida desde la base del medio de cultivo hasta el extremo superior de la plántula), número de brotes (Cantidad de ramas, con o sin yemas, desarrolladas a partir de las yemas de un nudo del eje principal) y número de nudos (cantidad de zonas del eje central de la plántula en las que se localiza un par de hojas o un par de yemas) de las plántulas desarrolladas por efecto del medio de cultivo, luego de los 25 días de incubación.

$$\text{Longitud promedio (mm)} = \left( \frac{\text{Suma de longitudes de 10 plantas}}{10} \right)$$

$$\text{Numero de brotes promedio} = \left( \frac{\text{Número total de brotes de 10 plantulas}}{10} \right)$$

$$\text{Número de nudos promedio} = \left( \frac{\text{Número total de nudos de 10 plantulas}}{10} \right)$$

**c. Introducción *in vitro*: factor envase de siembra para stevia accesión miskibamba**

Se evaluaron la longitud de plántula, número de brotes y de nudos de las plántulas desarrolladas, luego de los 15 días de incubación.

$$\text{Longitud promedio (mm)} = \left( \frac{\text{Suma de longitudes de 10 plantas}}{10} \right)$$

$$\text{Numero de brotes promedio} = \left( \frac{\text{Número total de brotes de 10 plantulas}}{10} \right)$$

$$\text{Número de nudos promedio} = \left( \frac{\text{Número total de nudos de 10 plantulas}}{10} \right)$$

**d. Multiplicación *in vitro* de stevia accesión miskibamba**

Se evaluaron las siguientes características: Longitud de plántula, número de brotes, número de nudos, coloración de hojas, peso fresco (se pesó cada plántula fresca en una balanza y se promedió los pesos de las 10 plántulas) y peso seco (se pesó un grupo de 10 plántulas secas en una balanza y se dividió entre diez) de las plántulas desarrolladas de Miskibamba, transcurrido 15 días de iniciado el proceso de multiplicación. Para el secado de las plántulas, se pusieron 10 plántulas frescas sobre papel kraft, dentro de una estufa a 75 °C, durante 20 horas.

$$\text{Longitud promedio (mm)} = \left( \frac{\text{Suma de longitudes de 20 plantas}}{20} \right)$$

$$\text{Numero de brotes promedio} = \left( \frac{\text{Número total de brotes de 20 plantulas}}{20} \right)$$

$$\text{Número de nudos promedio} = \left( \frac{\text{Número total de nudos de 20 plantulas}}{20} \right)$$

$$\text{Coloración de hojas} = \left( \frac{\text{Suma de longitudes de 20 plantas}}{20} \right)$$

$$\text{Peso fresco} = \left( \frac{\text{Peso de 20 plántulas frescas}}{20} \right)$$

$$\text{Peso seco} = \left( \frac{\text{Peso de un grupo de 20 plantulas secas}}{20} \right)$$

**e. Enraizamiento *in vitro* de stevia accesión miskibamba**

Se evaluaron las características como la longitud de plántula, el número de nudos y número de brotes, la coloración de hojas, longitud de radícula, peso fresco y peso seco de las plántulas desarrolladas, transcurrido 3 ó 4 semanas de iniciado el trasplante.

$$\text{Longitud promedio (mm)} = \left( \frac{\text{Suma de longitudes de 20 plantas}}{20} \right)$$

$$\text{Numero de brotes promedio} = \left( \frac{\text{Número total de brotes de 20 plantulas}}{20} \right)$$

$$\text{Número de nudos promedio} = \left( \frac{\text{Número total de nudos de 20 plantulas}}{20} \right)$$

$$\text{Coloración de hojas} = \left( \frac{\text{Suma de longitudes de 20 plantas}}{20} \right)$$

$$\text{Peso fresco} = \left( \frac{\text{Peso de 20 plántulas frescas}}{20} \right)$$

$$\text{Peso seco} = \left( \frac{\text{Peso de un grupo de 20 plantulas secas}}{20} \right)$$

**f. Comparación de crecimiento y desarrollo *in vitro* de miskibamba original y mutante**

Se compararon las siguientes variables de Miskibamba original y un mutante en el mejor tratamiento de enraizamiento y en el medio basal de MS: Longitud de plántula, el número de nudos y número de brotes, la coloración de hojas, longitud de radícula, peso fresco y peso seco de las plántulas desarrolladas, transcurrido 3 ó 4 semanas de iniciado el trasplante.

$$\text{Longitud promedio (mm)} = \left( \frac{\text{Suma de longitudes de 10 plantas}}{10} \right)$$

$$\text{Numero de brotes promedio} = \left( \frac{\text{Número total de brotes de 10 plantulas}}{10} \right)$$

$$\text{Número de nudos promedio} = \left( \frac{\text{Número total de nudos de 10 plantulas}}{10} \right)$$

$$\text{Coloración de hojas} = \left( \frac{\text{Suma de longitudes de 10 plantas}}{10} \right)$$

$$\text{Peso fresco} = \left( \frac{\text{Suma de los pesos de diez plántulas frescas}}{10} \right)$$

$$\text{Peso seco} = \left( \frac{\text{Peso de un grupo de 10 plantulas secas}}{10} \right)$$

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

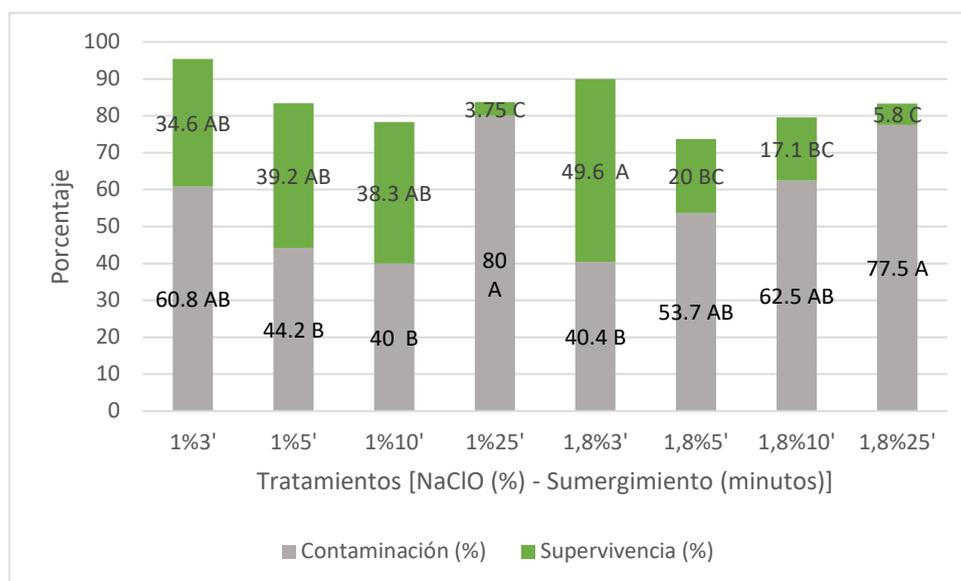
### **4.1. INTRODUCCIÓN *IN VITRO*: DESINFECCIÓN DE EXPLANTES DE STEVIA ACCESIÓN MISKIBAMBA**

De acuerdo a los análisis estadísticos se obtuvieron diferencias entre los diferentes tratamientos de desinfección aplicados y se puede afirmar que el tratamiento a 1 % de NaClO durante 10 minutos presentó menor contaminación (40,4 %). Similares resultados se obtuvieron en los tratamientos 1 % de NaClO con 5 minutos (44,2 %) y 1,8% de NaClO con 3 minutos (40,4 %). Éste último, además de presentar menor contaminación, también presentó el mayor porcentaje de supervivencia (49,6 %).

Por otro lado, los tratamientos 1 % y 1,8 % de NaClO durante 25 minutos presentaron mayor contaminación (80 % y 77,5 %), y menor supervivencia (3,75 % y 5,8 %), respectivamente (Figura 5).

Otros autores (Cuadro 11) encontraron como mejor tratamiento de desinfección el aplicar 1 % de NaClO durante 5 minutos (Martínez 2016), 1 % de NaClO durante 13 minutos (Abu 2019), o 1,8 % de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  durante 10 min (Rosales *et al.* 2018). Sin embargo, en el presente trabajo, se obtuvieron menor porcentaje de contaminación y mayor supervivencia al aplicar 1 % o 1,8 % de NaClO durante 10 min o 3 min, respectivamente.

Se ha observado en los tratamientos con 1,8 % de NaClO, a medida que aumenta el tiempo de sumergimiento (de 3' a 25'), la contaminación aumenta, desde 40 % hasta 78 %, y se reduce la supervivencia de 50 % a 6 %. Sin embargo, algunos autores como Aguilar *et al.* (2016) y Urbi y Zainuddin (2015) les funcionó bien el elevar la concentración a 5 % NaClO. Estas diferencias de resultados entre los diferentes autores podría deberse al sometimiento de diferentes pre-desinfecciones y explantes trabajados.



**Figura 5. Porcentaje de contaminación y de supervivencia**

**Cuadro 11. Comparación de tratamientos de desinfección de diferentes autores**

Autor (Año)	Explante	Pretratamiento	Desinfección superficial	Resultados
Trabajo presente	Explantos nodales de stevia cultivadas en invernadero	10 g/L del fungicida Benlate durante 15 minutos y 10 g/L de bactericida Phyton durante 15 minutos	Alcohol 70 ° un minuto, 1,8 % de NaClO durante 3 minutos	40,4 % de contaminación y 59,6 % de supervivencia
Aguilar <i>et al</i> 2016	Segmentos nodales de stevia, variedad Morita II cultivadas en un huerto	1,5 ml/L Fungibiol	Tween 80 for 30 minutos. 5 % de NaClO durante 20 minutos	23,25 % de contaminación y 58,91 % que brotaron
Zannat y Zarina 2015	Segmentos nodales de stevia, accession MS007provenientes del campo	Con un tratamiento previo con 0,2 % de carbendazim (fungicida)	5 % de NaOCl durante 10 minutos	18,9 % para nodos. 76,7 % de supervivencia
Abu 2019	Segmentos nodales de stevia, cultivar Spanti y China-1	—	1 % de NaOCl durante 13 minutos	Establecimiento <i>in vitro</i>

Rosales <i>et al.</i> 2018	Brotos de stevia, cultivares Morita II y Silvestre	Agrimicina (5 g /L) y benlate (5 g/L) durante 60 min	1,8% de hipoclorito de calcio durante 10 min.	Establecimiento <i>in vitro</i>
-------------------------------	--	---	--	------------------------------------

Los resultados obtenidos demuestran que a una concentración de NaClO y tiempo adecuado de sumergimiento se logra inhibir el crecimiento de microorganismos y permitir la supervivencia de las plántulas bajo condiciones *in vitro*.

#### **4.2. INTRODUCCIÓN *IN VITRO*: MEDIO DE INICIO DE STEVIA ACCESIÓN MISKIBAMBA**

Estadísticamente no se identificaron diferencias entre los tratamientos con respecto a la altura, número de nudos y número de brotes de las plántulas desarrolladas. Por consiguiente se eligieron a los medios con 50 % de sales de MS sólido y 100 % de sales de MS sólido como medios adecuados de inicio.

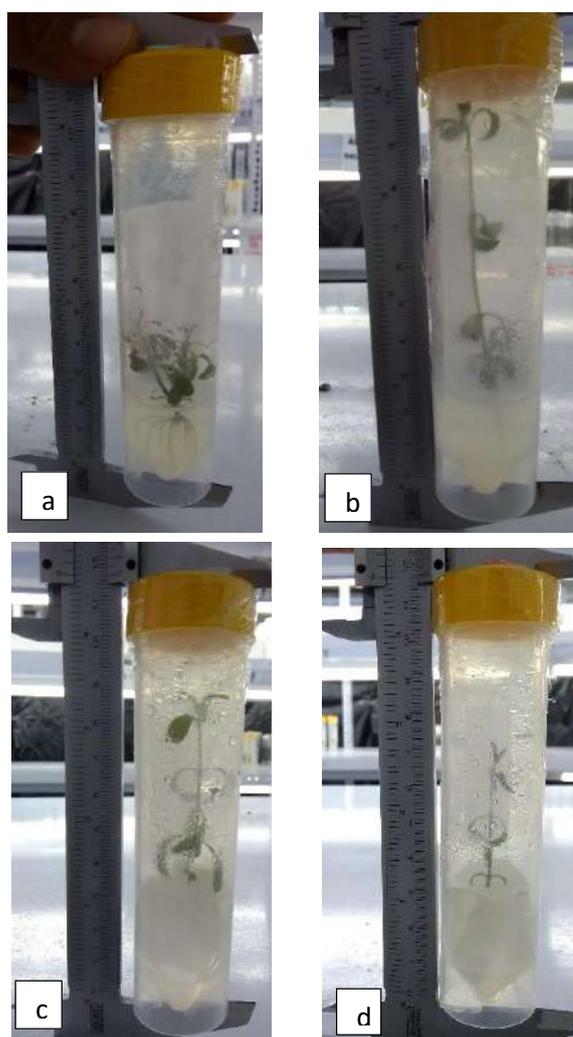
Se menciona que el tratamiento que permitió el desarrollo de plántulas más altas (de hasta 20,4mm) y con mayor número de nudos (4,7 nudos) fue el medio de 50 % de sales de Murashige y Skoog (1962) en consistencia sólida (Figura 6b), y el que presentó más número de brotes (2,2 brotes) fue el medio 100 % MS en consistencia sólida (Cuadro 12).

En el estudio de Delvalle (2001) y de Espinal *et al.* (2006), las mejores respuestas se lograron utilizando 50 % de macroelementos en el medio MS líquido. Sin embargo Bondarev (2019), observó que al emplear 100 % de sales MS se incrementa significativamente la masa fresca y seca del cultivo, además del contenido de glucósidos esteviósidos (200 lg/g de masa seca principalmente de esteviósido), diez veces más en relación al uso de 50 % MS.

**Cuadro 12. Medios de inicio sobre la longitud, números de nudos y brotes de plántulas**

Código	Factores		LONGITUD (mm)	BROTOS (unidades)	NUDOS (unidades)
	Consistencia	Macronutrientes (%)			
<b>D1</b>	Medio sólido	100 % Sales MS	12,1 ± 5 <sup>A§</sup>	2,2 ± 0,7 <sup>A§</sup>	4,5 ± 1,9 <sup>A§</sup>
<b>D2</b>	Medio sólido	50 % Sales MS	20,4 ± 4,9 <sup>A</sup>	2 ± 0,3 <sup>A</sup>	4,7 ± 0,7 <sup>A</sup>
<b>D3</b>	Medio líquido	100 % Sales MS	16,9 ± 9 <sup>A</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>A</sup>	3,7 ± 1,7 <sup>A</sup>
<b>D4</b>	Medio líquido	50 % Sales MS	10,9 ± 2,4 <sup>A</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>A</sup>	2,9 ± 0,9 <sup>A</sup>

<sup>§</sup> Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ( $P \geq 0.05$ ).

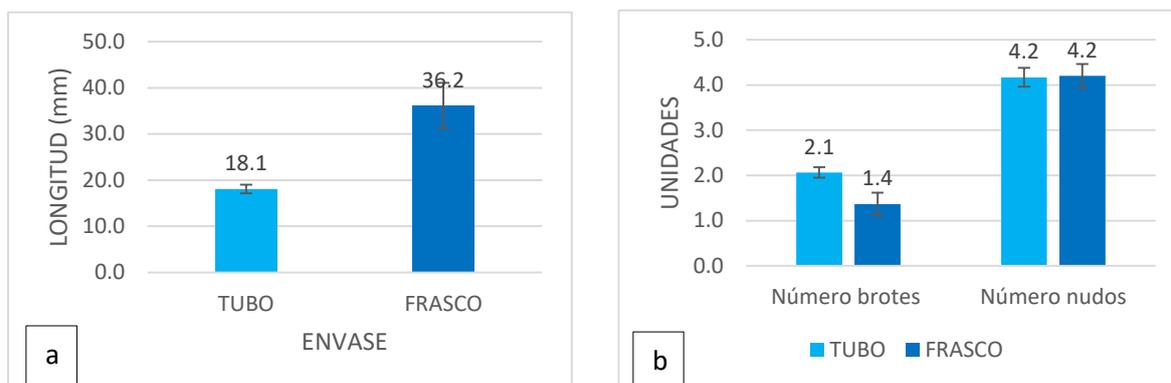


**Figura 6: Plántulas de stevia en diferentes medios de inicio: a) Plántula en medio sólido con 100 % de sales de MS, b) Plántula en medio sólido con 50 % de sales de Ms, c) Plántula en medio líquido con 100 % de sales de MS, d) Plántula en medio líquido con 50 % de sales de MS.**

### **4.3. INTRODUCCIÓN *IN VITRO*: FACTOR ENVASE DE SIEMBRA PARA STEVIA ACCESIÓN MISKIBAMBA**

Empleando frascos de vidrio para la siembra de explantes se obtuvieron plántulas con mejor longitud 36,2 mm (Figura 7a) en relación a las plántulas cultivadas en los tubos, aunque en

ambos casos se observó un desarrollo similar del número de nudos (Figura 7b). Si bien en los tubos las plántulas presentaron el doble de número de brotes (2,1 unidades), pero la mitad de longitud (18,1 mm) que en los frascos y en su mayoría sin hojas bien formadas, lo cual no era adecuado la micropropagación de estos explantes.



**Figura 7. Gráfica de barras de la influencia del factor envase: a) Sobre la longitud de la plántula, b) Sobre el número de brotes y nudos formados**

García *et al.* (2016) evaluaron el efecto de la densidad de inóculo sobre la morfología y fisiología de brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistemas de inmersión temporal, los estudios revelaron que el número de brotes, la longitud del brote principal, el número de hojas y la clorofila aumentaron con la densidad del inóculo de 12 explantes. Sin embargo, el aumento de la densidad del inóculo hizo que disminuyera la acumulación de clorofila total, el contenido de masa seca de los brotes y aumentara el contenido de agua. Así mismo, Jin *et al.* (2013) señalaron que a una densidad inadecuada, se tendría un pequeño número de hojas con coloración verde claro.

Puede que la densidad de plántulas sembradas haya influenciado en el número de brotes del frasco y tubo. La densidad de plántulas sembradas en frasco resultó mejor, las plántulas presentaron mejor longitud y mayor número de nudos, que cuando se sembró un explante en tubo, en éste, la plántula tenía varios brotes pero muy pequeños. Para la multiplicación es preferible mayor longitud y de entrenudos, porque permite obtener mayor número de explantes para subcultivar.

Por todo ello, se vio conveniente sembrar los explantes en frascos que en tubos para la producción masiva de cultivo *in vitro* de stevia porque presentaban mejores características

morfológicas para la multiplicación, además de brindar mayor cantidad de explantes óptimos obtenidos por espacio utilizado. Así mismo el ingreso de luz en los tubos de falcon fue menor que en los frascos de vidrio.

#### 4.4. ETAPA DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE STEVIA ACCESIÓN MISKIBAMBA

Haciendo uso de 4m g/L de kinetina en MS/2 se obtuvo mayor biomasa producida. En términos de las variables evaluadas, este medio permitió el desarrollo de plantas con mayor masa fresca (0,149 g) y materia seca (0,012 g), como se puede observar en el Cuadro 13.

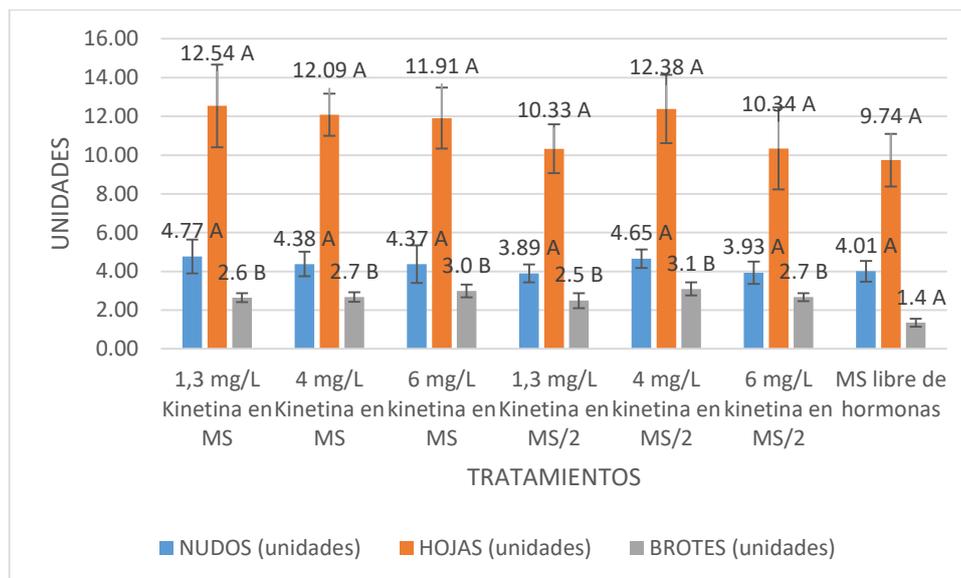
**Cuadro 13. Masa fresca, materia seca y humedad de plántulas en los diferentes tratamientos**

Código	Tratamientos	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Humedad (%)
F1	1,3 mg/L Kinetina + 1 MS	0,09 <sup>A§</sup> ± 0,02	0,009 <sup>A§</sup> ± 0,001	90,15 <sup>A§</sup> ± 1,36
F2	4 mg/L Kinetina + 1 MS	0,11 <sup>B</sup> ± 0,018	0,010 <sup>B</sup> ± 0,001	90,46 <sup>A</sup> ± 0,32
F3	6 mg/L Kinetina + 1 MS	0,12 <sup>A</sup> ± 0,013	0,011 <sup>A</sup> ± 0,001	91,31 <sup>A</sup> ± 0,71
F4	1,3 mg/L Kinetina + 0,5 MS	0,08 <sup>A</sup> ± 0,009	0,007 <sup>A</sup> ± 0,001	90,21 <sup>A</sup> ± 0,36
F5	4 mg/L Kinetina + 0,5 MS	0,15 <sup>A</sup> ± 0,022	0,012 <sup>A</sup> ± 0,003	91,82 <sup>A</sup> ± 0,68
F6	6 mg/L Kinetina + 0,5 MS	0,10 <sup>A</sup> ± 0,02	0,009 <sup>A</sup> ± 0,002	91,45 <sup>A</sup> ± 0,53
F7	1 MS	0,10 <sup>A</sup> ± 0,01	0,008 <sup>A</sup> ± 0,001	91,11 <sup>A</sup> ± 1,09

<sup>§</sup> Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ( $P \geq 0,05$ ).

Con los tratamientos 4 mg/L de Kinetina en MS/2 y 6 mg/L de Kinetina en MS/2 las plántulas presentaron mayor porcentaje de humedad (91,82 % y 91,45 %, respectivamente), aunque no se evidenció diferencia significativa estadísticamente entre los tratamientos. Es favorable que presenten mayor humedad ya que ello permite una mejor vigorosidad del cuerpo de la planta además de mejores condiciones de hidratación para sus posteriores subcultivos.

En cuanto a las variables, número de nudos (Figura 8), los valores se encontraban desde 3,9 hasta 4,8 nudos y desde 9,7 hasta 12,5 hojas, éstos fueron independientes de los tratamientos, no hubo diferencia significativa con el control.



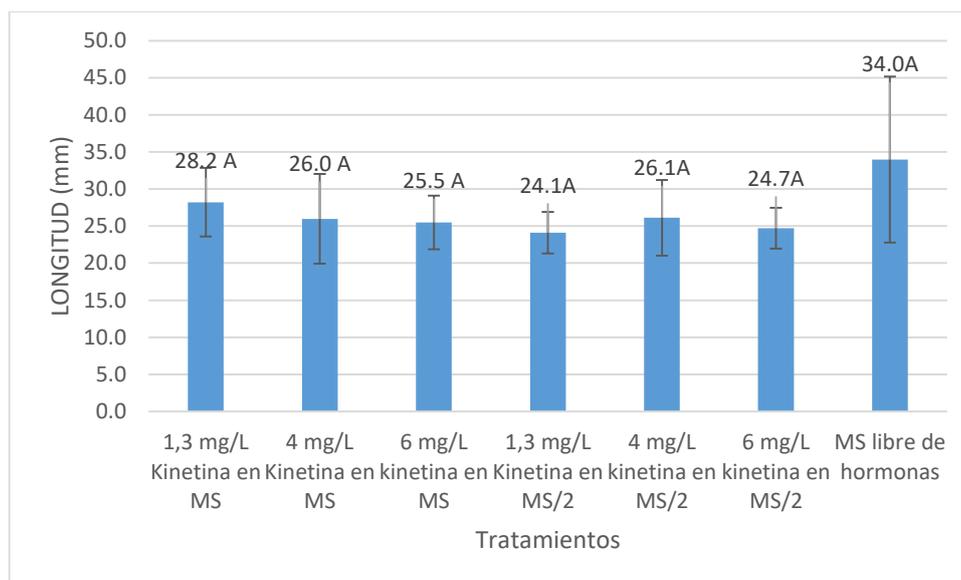
**Figura 8. Nudos, hojas y brotes de plántulas en función a la concentración de kinetina**

Las longitudes de las plántulas se encontraban desde 24,1 hasta 34mm (Figura 9), con el tratamiento control (MS libre de regulador de crecimiento) se obtuvo plántulas con mayor longitud (34mm), aunque no hubo diferencia significativa con los otros tratamientos. Estos resultados difieren con los encontrados por Javed *et al.* (2019) quienes obtuvieron mejor longitud y número de sus brotes, empleando 1,5 mg/L de kinetina y 0,5 mg/L de benzil amino purina. Thilakarathne *et al.* (2019) también obtuvieron mayor número de brotes empleando 1,5 mg/L de kinetina pero en combinación con 1 mg/L de 6-benzil amino purina. En general los tratamientos que contenían kinetina presentaron menor longitud ( $\leq 28,2$  mm) que el tratamiento control (34mm), además de un acortamiento de la distancia entre los nudos (datos no medidos, sino observados), por lo que la kinetina induce estas características y puede que hace falta reducir su concentración o combinar con auxinas o gibelinas para la elongación de las plántulas.

Por otro lado, en los medios de cultivo de multiplicación donde se adicionaron Kinetina en todas las concentraciones consideradas en este trabajo indujeron mayor formación de brotes que el medio control, con diferencia significativa, los valores medios obtenidos fueron de 1,4 a 3,1 unidades de brotes, aproximadamente, con el tratamiento 4mg/L de Kinetina en MS/2, se tuvo plántulas con mayor cantidad de brotes (3,1), seguido por el tratamiento 6m g/L en MS (3 brotes). Pero no alcanzaron una longitud que les consideraran como útiles para el proceso de repique o enraizamiento en un sistema de producción comercial. Respuestas

similares han sido descritas con anterioridad por Martínez *et al.* (2016), quienes observaron el incremento de brotes pero con una reducción de su longitud.

En otros estudios como el de Delvalle (2001) también tuvo mejor respuesta en un medio con Kinetina a 6  $\mu\text{M}$  y en medio con 50 % de macroelementos MS. Vázquez *et al.* (2014) obtuvieron mayor formación de brotes por planta (2,68 unidades) en medios con menor concentración (1,3 mg/L) de kinetina.



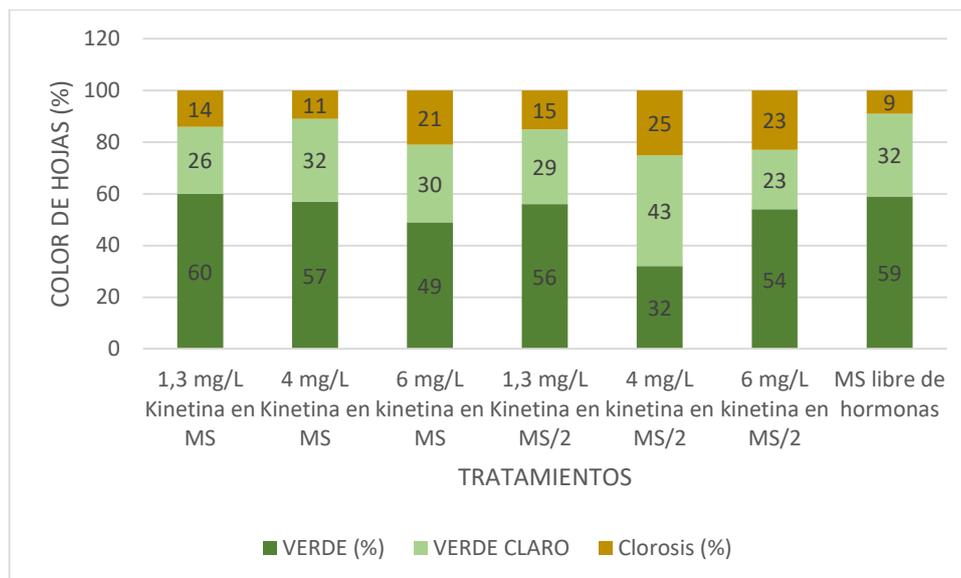
**Figura 9. Longitudes de plántulas en función a la concentración de kinetina**

En el estudio de Razak *et al.* (2014) emplearon bajas concentraciones de kinetina (0,2 a 1,5 mg/L) y obtuvo mejor crecimiento de los brotes desde 2,9 cm a 5,05 cm de longitud.

Vázquez *et al.* (2014) emplearon 1,3 mg/L de Kinetina y obtuvieron mejores resultados en la inducción de brotes adventicios (76,47 % de plantas con brotes y 2,68 de brotes por planta).

Como una evaluación adicional se describió el color de las hojas de las plantas desarrolladas (En la Figura 10 se tienen los resultados de esta evaluación). Se clasificaron en tres niveles de color (Verde, verde claro y amarillo) según percepción visual.

En el Anexo 7 se pueden ver imágenes de las plántulas desarrolladas en todos los tratamientos.



**Figura 10. Coloración de hojas de plántulas en función a la concentración de Kinetina**

Del análisis estadístico, se afirma que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos. Cada tratamiento presentó los tres niveles de color y con porcentaje ligeramente variado entre los tratamientos.

Eventualmente, se observó una coloración marrón-rojiza en hojas e incluso en los tallos de algunas plántulas (consideradas como cloróticas), lo que podría explicarse por el acortamiento de su longitud, como consecuencia de la estimulación y desarrollo de brotes secundarios a partir de yemas axilares (Martínez *et al.* 2016) o por la falta de luz, ya que la luz let o blanca no llega con la misma intensidad que la luz solar en el aire libre.

Tomando en cuenta los resultados analizados se podría afirmar que el tratamiento con 4 mg/L de kinetina en MS/2 presentó mejores características en cuanto a peso, humedad y brotes, pero con brotes pequeños evaluados a los quince días, los cuales no servían como explantes para micropropagación, a menos que se dejara más tiempo (> 15días) en incubación. Por lo que el tratamiento control (MS libre de regulador de crecimiento) resultaría mejor como medio de multiplicación (alcanzó hasta 34 mm de longitud).

#### 4.5. ETAPA DE ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE STEVIA ACCESIÓN MISKIBAMBA

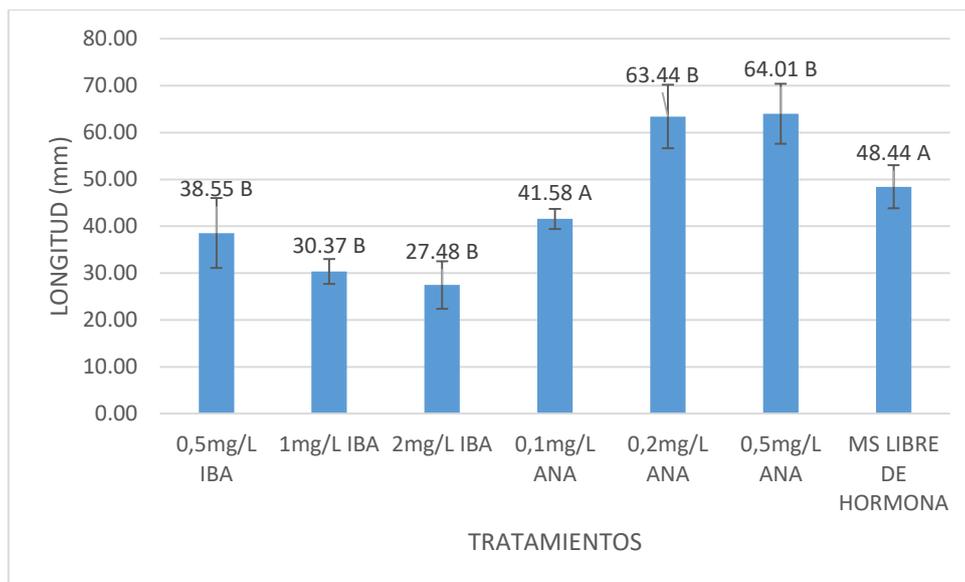
Los tratamientos 0,5 mg/L ANA y 0,5 mg/L IBA presentaron plantas con mayor masa fresca (0,185 g y 0,146 g, respectivamente, Cuadro 14); también, el tratamiento 0,5 mg/L ANA también presentó plantas con mayor materia seca (0,014 g). Además, los medios con los tratamientos 0,2 mg/L ANA y 0,5 mg/L ANA presentaron mayor contenido de humedad por planta, 92,9 % y 92,7 %, respectivamente. Esto quiere decir, que empleando 0,5 mg/L ANA se obtuvieron plantas bien hidratadas y que hubo mejor crecimiento celular (por la acumulación de masa seca 0,014 g).

**Cuadro 14. Influencia del medio de cultivo de enraizamiento sobre la masa fresca, materia seca y humedad de plántulas obtenidas**

Código	Tratamientos	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Humedad (%)
G1	MS + 0,5mg/L AIB	0,146 <sup>B§</sup> ± 0,018	0,012 <sup>A§</sup> ± 0,002	91,91 <sup>A§</sup> ± 0,79
G2	MS + 1 mg/L AIB	0,123 <sup>A</sup> ± 0,032	0,012 <sup>A</sup> ± 0,003	90,50 <sup>A</sup> ± 1,42
G3	MS + 2 mg/L AIB	0,116 <sup>A</sup> ± 0,035	0,011 <sup>A</sup> ± 0,002	90,37 <sup>A</sup> ± 1,42
G4	MS + 0,1 mg/L ANA	0,131 <sup>A</sup> ± 0,008	0,011 <sup>A</sup> ± 0,001	91,37 <sup>A</sup> ± 0,47
G5	MS + 0,2 mg/L ANA	0,143 <sup>A</sup> ± 0,013	0,010 <sup>A</sup> ± 0,001	92,90 <sup>B</sup> ± 0,27
G6	MS + 0,5 mg/L ANA	0,185 <sup>B</sup> ± 0,021	0,014 <sup>B</sup> ± 0,002	92,67 <sup>A</sup> ± 0,22
G7	MS	0,105 <sup>A</sup> ± 0,026	0,009 <sup>A</sup> ± 0,002	91,20 <sup>A</sup> ± 0,53

<sup>§</sup> Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ( $P \geq 0,05$ ).

El rango de las longitudes de plántulas alcanzadas fue desde 27,5 mm a 64 mm (Figura 11). Los tratamientos que mostraron mejor longitud fueron 0,2 mg/L de ANA (63,4 mm) y 0,5 mg/L de ANA (64 mm), con diferencia significativa estadísticamente. Las longitudes con AIB (27,5 a 38,55 mm) resultaron ser los menores que el resto de los tratamientos. En el Anexo 8 están las imágenes de las plántulas desarrolladas de todos los tratamientos.

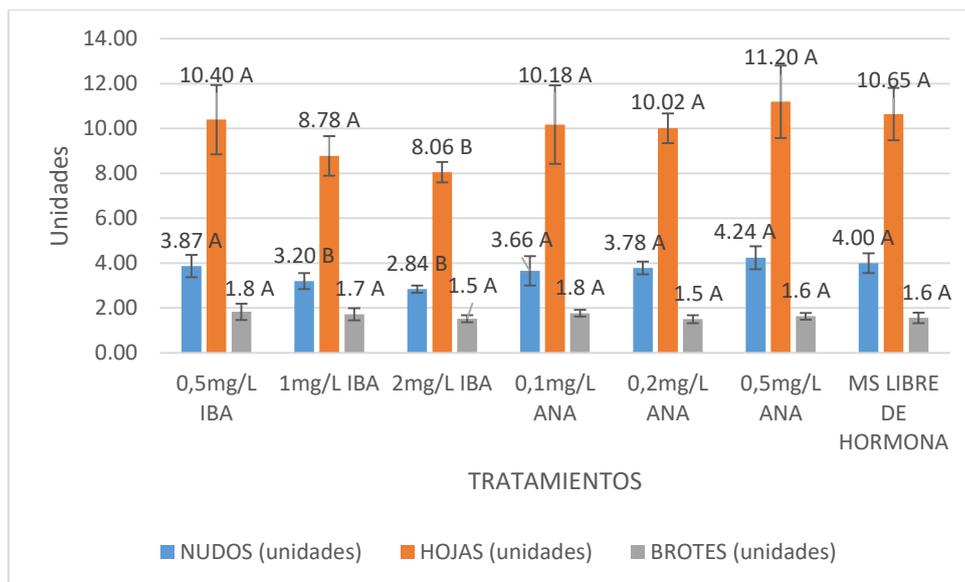


**Figura 11. Influencia de los medios de enraizamiento sobre las longitudes de plántulas**

Los tratamientos de medios MS con 1m g/L o con 2 mg/L de AIB presentaron plantas con menor número de nudos (3,2 y 2,8 nudos) con diferencia significativa estadísticamente (Figura 12). El intervalo de los valores de número de nudos estuvo de 2,8 a 4,2. Los máximos valores se obtuvieron empleando los tratamientos 0,5 mg/L y 0,2 mg/L de ANA.

No hubo diferencia significativa entre los tratamientos con respecto al control en la evaluación de número de hojas, excepto por el tratamiento con 2 mg/L de AIB, éste último, obtuvo el menor valor (8,1). Y es importante resaltar que los máximos valores se obtuvieron con los tratamientos control y 0,5 mg/L de ANA (10,7 y 11,2 unidades de hojas, respectivamente).

No hubo diferencia de número de brotes entre los tratamientos. Los valores medios de número de brotes estuvieron dentro del intervalo de 1,5 a 1,8 unidades por planta. Aunque el valor máximo de brote se obtuvo con el tratamiento 0,5 mg/L AIB. El desarrollo de brotes es independiente de la presencia del regulador de crecimiento ANA o AIB en las concentraciones evaluadas.



**Figura 12. Desarrollo de nudos, hojas y brotes de las plántulas en los tratamientos de enraizamiento**

Los tratamientos 0,5 mg/L ANA, 0,2 mg/L ANA y 0,5 mg/L AIB permitieron desarrollar mayor cantidad de plantas con raíz 100 %, 99 %, 98 %, respectivamente (Figura 13a).

Se observó una mayor formación de tejido callogénico, un pobre desarrollo radicular y reducción del número de plantas con raíces a medida que aumentaba la concentración de AIB dentro de la escala evaluada, a 0,5 mg/L de AIB, fue 98 %; a 1 mg/L de AIB, 77 %, y 2 mg/L de AIB, 68 %. Esto concuerda con Espinal *et al.* (2006), quienes observaron que el porcentaje bajó a medida que aumentaba la concentración de AIB, y el máximo porcentaje al emplear esta hormona fue con 0.5 mg/L obteniendo un 60% de plantas con raíces desarrolladas.

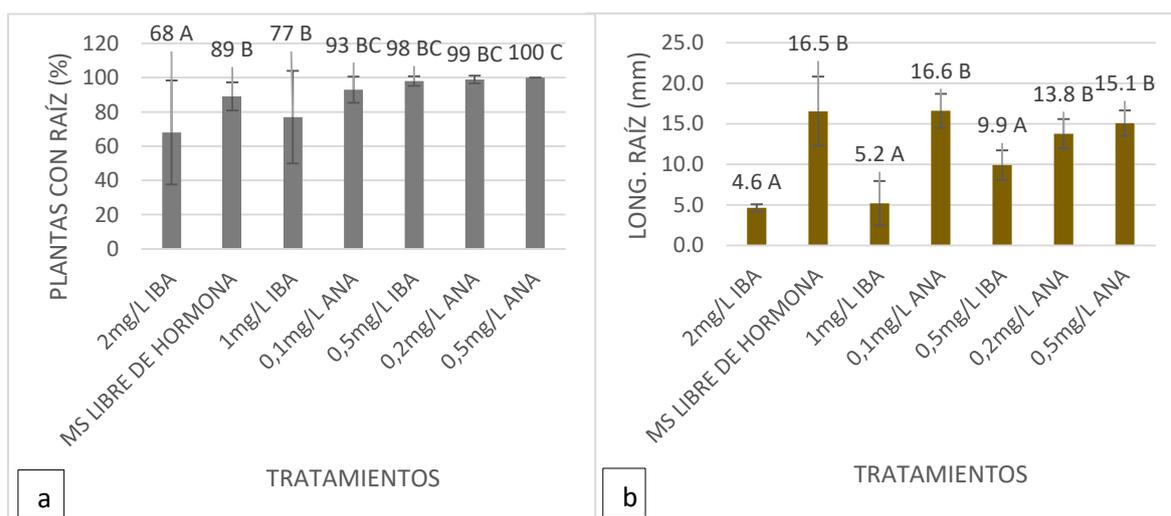
En los tratamientos 0,5m g/L ANA (raíces con 15,1 mm) y 0,2 mg/L ANA (raíces con 13,8 mm) y el control (raíces con 16,5 mm) presentaron raíces con mayor longitud (Figura 13b), pero en el tratamiento con 0,5 mg/L de ANA todas las plántulas (100%) habían desarrollado raíz, y con 0,2 mg/L de ANA el 99% de las plántulas presentaban raíz.

Los resultados son coincidentes con Espinal *et al.* (2006) quienes observaron el menor número de días para la formación de raíces (15 días), y el mayor porcentaje (73 %) de vitroplantas con raíces mayores de 10 mm de largo al emplear 0,5 mg/L de ANA. Javed *et al.* (2017) también obtuvo raíces con mayor longitud empleando ANA a una concentración de 0,25 mg/L. Pero, en el estudio de Martínez (2016) obtuvo 76,67 % de plantas con raíces al emplear 0,5 mg/L de AIB.

Razak *et al.* (2014) obtuvieron mayor longitud (33mm) de raíces pero con menor número de raíces empleando 0,2 mg/L de ANA, que al emplear 0,5 mg/L de ANA (26,9 mm) o 0,5 mg/L de AIB (27 mm), y con 1 mg/L de AIB obtuvieron mayor número de raíces pero menor longitud (23,9 mm), afirman que ANA podría ser la mejor auxina en *S. rebaudiana* para el inicio de la inducción de la raíz.

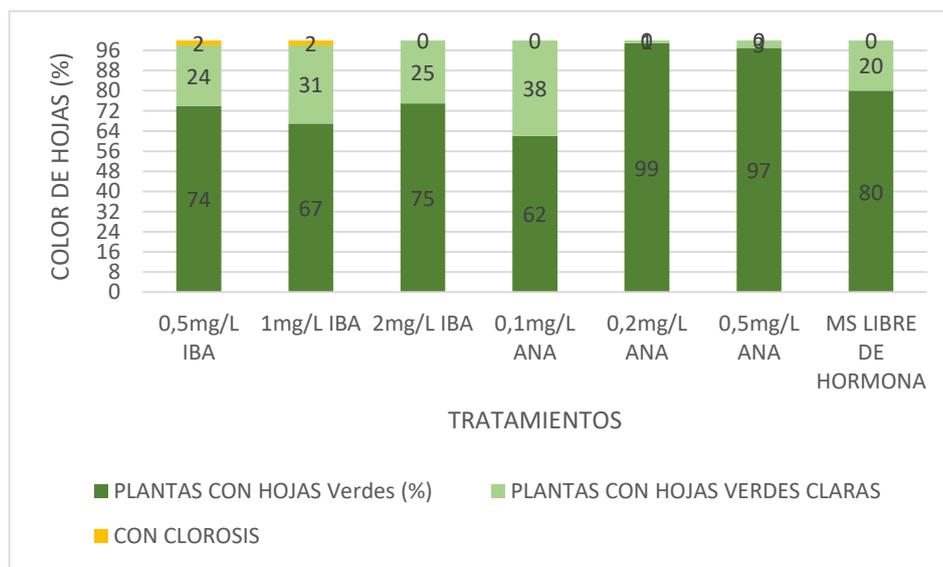
Así mismo, Thiagarajan y Venkatachalam (2012) demostraron que ANA es un mejor regulador de crecimiento que IAA e AIB, eficiente que estimula la formación de raíces en stevia. También considera que el uso de reguladores de crecimiento en bajas concentraciones o el uso de combinaciones de citoquinina con auxina pueden ayudar a disminuir la posible variación somaclonal que pudiera presentarse en el proceso de micropropagación de explantes nodales de stevia.

Sin embargo, para algunos autores como Verma *et al.* (2011) demostraron que el medio suplementado con 2,0 mg/L AIB mostró un enraizamiento más alto (69,76 %) y un inicio temprano de la raíz (7,1 días). Para Rokosa y Kulpa (2020), ANA les resultó ser mejor regulador de crecimiento eficiente para el enraizamiento; estas diferencias de resultados de los diferentes autores se pueden atribuirse a la condición fisiológica del explante, que es determinado por factores genéticos.



**Figura 13. Evaluación del desarrollo de raíz en los diferentes tratamientos: a) Plántulas con raíz desarrolladas en los diferentes tratamientos de enraizamiento, b) Longitud de raíz**

No se observó clorosis en todos los tratamientos (las plántulas presentaban coloración verde puro 99 % y 97 %, respectivamente), a excepción 0,2 mg/L ANA y 0,5 mg/L ANA alcanzaron el 2 % de clorosis (Figura 14). El control también presentó alto porcentaje de plantas con hojas verdes (80 %) y un 20 % presentó color verde claro. Por lo que la aplicación de auxinas ya sea AIB o ANA no afecta a la coloración o el proceso de fotosíntesis.



**Figura 14. Estado de las hojas de las plántulas por efecto de los medios de cultivo de enraizamiento**

Por otro lado, Uskutoglu *et al.* (2019), tuvieron éxito empleando ANA en combinación con otros reguladores de crecimiento vegetal, esto se puede explicar por la proporción de auxinas/citoquininas que han sido estudiada por jugar un papel fundamental en la regulación de procesos como el desarrollo de estructuras apicales y radicales, explicando cómo la dominancia apical tiene un efecto en la elongación de la planta (Azcón-Bieto y Talón 2008).

Habiendo analizado los resultados y con lo de otros autores, se concluyó que la aplicación de 0,2 mg/L y 0,5 mg/L de ANA influyen positivamente en el desarrollo de las explantes nodales de stevia, y por consiguiente se decidió emplear 0,2 mg/L de ANA como mejor medio de micropropagación y enraizamiento *in vitro* considerando los costos y el tiempo de desarrollo, por consiguiente, este medio se aplicó en la siguiente etapa, en la comparación de crecimiento y desarrollo *in vitro* de la original y un mutante de la stevia accesión Miskibamba.

#### 4.6. COMPARACIÓN DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO *IN VITRO* DE MISKIBAMBA ORIGINAL Y MUTANTE

Evaluando el análisis estadístico, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos para las variables de peso fresco, peso seco y humedad (Cuadro 15), esto significa que tanto la aplicación de hormona, así como el tipo de explante (mutante) no influenciaron en esas tres variables mencionadas. Pero se puede mencionar que el tratamiento con 0,2 mg/L de ANA y mutante (mutante de stevia Miskibamba por aplicación de radiación gama) presentó mayor peso fresco (0,118 g), peso seco (0,012 g) y humedad (89,7 ± 2,8 %).

**Cuadro 15. Comparación de peso fresco, seco y humedad de explante Miskibamba original y un mutante**

Código	Factores		Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Humedad (%)
	Medio de cultivo	Tipo de explante			
<b>H1</b>	MS	Mutante	0,083 <sup>A§</sup> ± 0,024	0,009 <sup>A§</sup> ± 0,003	88,8 <sup>A§</sup> ± 2,6
<b>H2</b>	MS	Original	0,083 <sup>A</sup> ± 0,007	0,009 <sup>A</sup> ± 0,000	88,7 <sup>A</sup> ± 0,9
<b>H3</b>	MS + 0,2 mg/L ANA	Mutante	0,118 <sup>A</sup> ± 0,018	0,012 <sup>A</sup> ± 0,002	89,7 <sup>A</sup> ± 2,8
<b>H4</b>	MS + 0,2 mg/L ANA	Original	0,082 <sup>A</sup> ± 0,031	0,009 <sup>A</sup> ± 0,004	89,5 <sup>A</sup> ± 2,2

<sup>§</sup> Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ( $P \geq 0,05$ ).

En el Cuadro 16 se muestran los resultados para las variables número de brotes, nudos y hojas formadas, y de las longitudes de plántula y de raíz. No se encontró diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las medias de número de brotes y de nudos entre los diferentes tratamientos. Pero, las diferencias de los promedios de números de hojas, longitud de plántulas y de raíz fueron significativas.

El número de hojas, longitudes de plántulas y de raíces de los mutantes fueron mayores en el medio de MS libre de regulador de crecimiento (9,4 unidades, 30,9 mm y 6,4 mm, respectivamente) y menores en el medio MS con 0,2 mg/L ANA; mientras en los explantes originales, se obtuvo lo contrario, mayores en el medio MS con 0,2 mg/L ANA (7,7 unidades; 35,4 mm y 12 mm, respectivamente) y menores en el medio MS libre de regulador de crecimiento.

**Cuadro 16: Resultado de número de brotes, nudos, hojas, longitud de plántula y raíz**

Código	Factores		N° Brotes (Unidad)	N° Nudos (Unidad)	N° Hojas (Unidad)	Longitud de plántula (mm)	Longitud de raíz (mm)
	Medio de cultivo	Tipo de explante					
H1	MS	Mutante	1,5 <sup>A§</sup> ± 0,06	3,3 <sup>A§</sup> ± 0,8	9,4 <sup>A§</sup> ± 2	30,9 <sup>A§</sup> ± 7	6,4 <sup>A§</sup> ± 2,8
H2	MS	Original	1,5 <sup>A</sup> ± 0,2	2,4 <sup>A</sup> ± 0,4	5,3 <sup>B</sup> ± 0,9	18,2 <sup>AB</sup> ± 3	6 <sup>AB</sup> ± 1
H3	MS + 0,2 mg/L ANA	Mutante	1,7 <sup>A</sup> ± 0,1	3,1 <sup>A</sup> ± 0,5	7,3 <sup>AB</sup> ± 1,1	24 <sup>BC</sup> ± 2,5	5,2 <sup>BC</sup> ± 3,3
H4	MS + 0,2 mg/L ANA	Original	1,5 <sup>A</sup> ± 0,1	3 <sup>A</sup> ± 0,4	7,7 <sup>AB</sup> ± 0,3	35,4 <sup>C</sup> ± 1,3	12 <sup>C</sup> ± 1,2

<sup>§</sup> Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ( $P \geq 0,05$ ).

La aplicación de 0,2 mg/L de ANA favoreció significativamente en el número de hojas, longitud de raíz y longitud de la plántula en el explante original, mas no en el mutante.

Estos efectos son confirmados por Taiz y Zeiger (2006) quienes describen cómo la auxina regula en la dominancia apical, además de que la auxina promueve la formación de raíces laterales y adventicias.

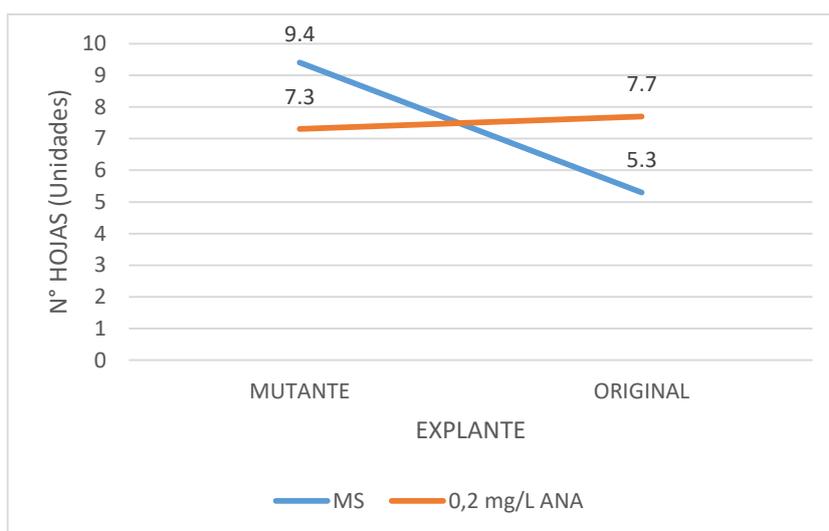
El medio MS libre de regulador de crecimiento favoreció para los explantes mutantes en casi todas las variables evaluadas (nudos, hojas, longitud de raíz y longitud de plántula), esto podría ser porque estaban en proceso de recuperación del estrés causado por la irradiación induciendo así el metabolismo hacia la producción de metabolitos para la protección de la planta.

Además, la interacción del medio y el tipo de explante influenciaron significativamente en el número de hojas, la longitud de las plántulas desarrolladas y de la longitud de raíz de dichas plántulas (Figura 15, 16 y 17). El medio MS libre de regulador de crecimiento favorece el desarrollo de los mutantes, mientras el medio En el Anexo N 10 se muestra fotos de las plántulas desarrolladas.

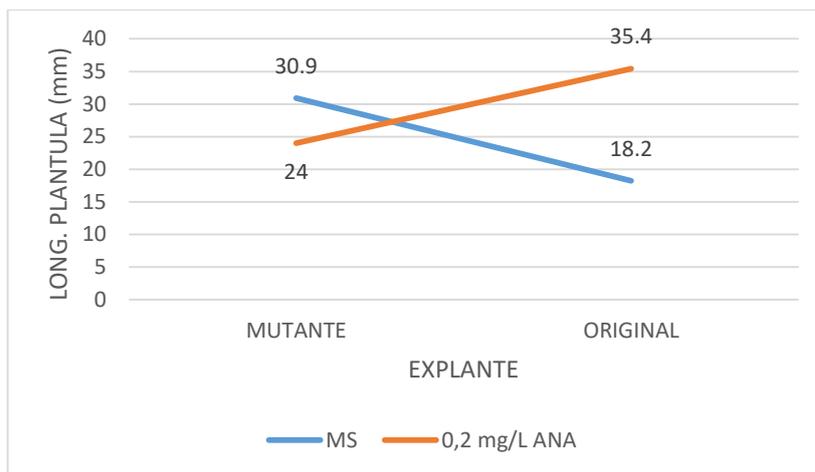
En la Figura 15, 16 y 17 se presentan las respuestas de la interacción: Explante y Medio de cultivo en las variables de número de hojas, la longitud de raíz y de las plántulas desarrolladas. Los valores encontrados mostraron una tendencia a disminuir el número de hojas, longitud de raíz y de plántulas de stevia Miskibamba mutante cuando se agregó el regulador de crecimiento de 0,2 mg/L de ANA, o a aumentar (alcanzando valores hasta 9,4 hojas, 30,9 mm de longitud de plántula y 6,4 mm de raíz) cuando se sembró en el medio MS

libre de regulador de crecimiento. Sin embargo, para el caso del explante stevia Miskibamba original hay un incremento significativo en las variables de número de hojas, la longitud de plántulas y de raíz cuando se agrega 0,2 mg/L de ANA al medio de cultivo, teniéndose hasta 7,7 hojas; 35,4 mm de longitud de plántula y 12 mm de raíz, y reduciéndose cuando se emplea sólo el medio MS y no se agrega ningún regulador de crecimiento.

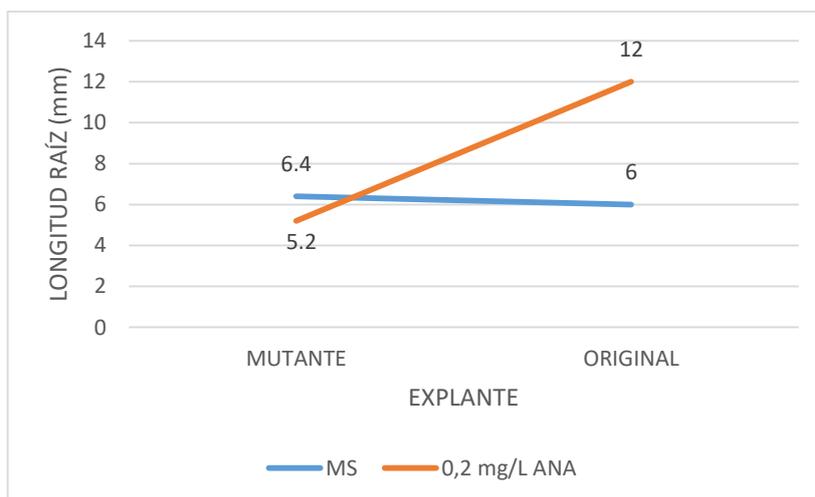
Martínez (2018) explica cómo las plantas sembradas con adición de auxina se ven afectadas de forma indirecta ante estrés, por daño al tejido celular se produce mayor cantidad de ácido jasmónico provocando así una inhibición del crecimiento de raíces y coleoptilos de la planta; por estrés abiótico la cadena de señalización regulada por el ABA o de poliaminas endógenas afecta a la de las auxinas provocando una reducción en el crecimiento y desarrollo del tallo. También se ha visto la participación de brasinoesteroides ante estrés por temperaturas, estrés oxidativo, metales pesados y patógenos.



**Figura 15. Interacción de Explante \* Medio de cultivo en la formación de número de hojas de Miskibamba original y el mutante**



**Figura 16. Interacción de Explante \* Medio de cultivo en la longitud de plántulas desarrolladas de Miskibamba original y el mutante**

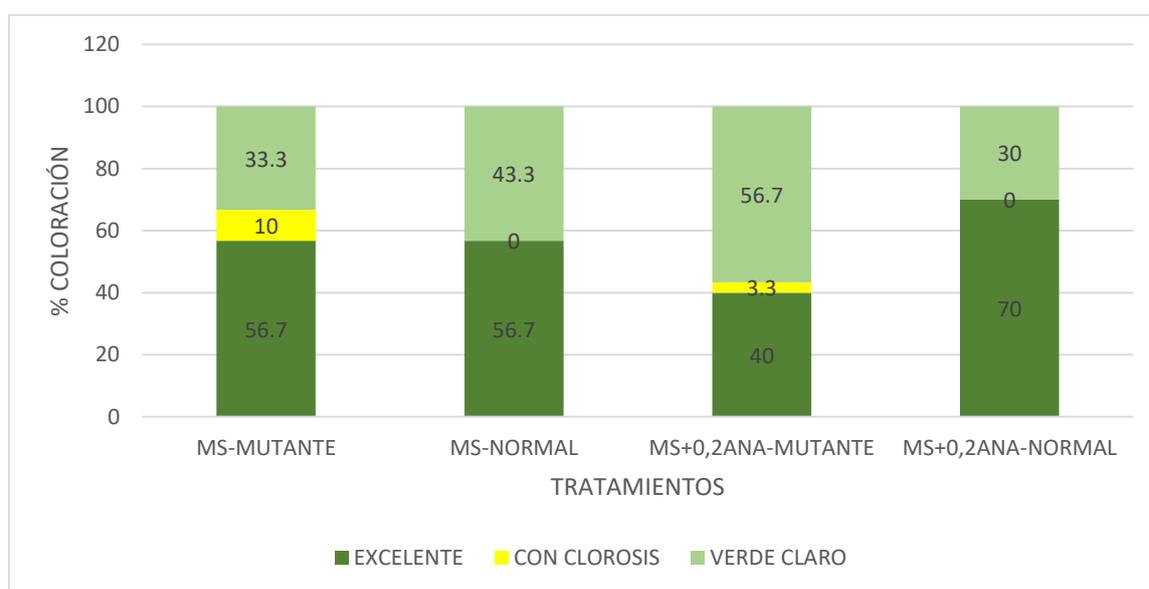


**Figura 17. Interacción de Explante \* Medio de cultivo en la longitud de raíces desarrolladas de Miskibamba original y el mutante**

Así también por el cambio en la constitución hormonal por efecto de la mutación, posiblemente generó un efecto antagónico por las otras fitohormonas propias del explante. Se sugiere realizar más pruebas para hacer el seguimiento del comportamiento de estas plantas mutantes. Martirena *et al.* (2015) y Suprasanna *et al.* (2008) obtuvieron reducción de la longitud de la raíz, las semillas de frijol irradiadas con dosis 80, 70 Gy y dosis más bajas, quienes atribuyeron al efecto tóxico de la radiación gamma sobre las células organogénicas, así también otros autores describen que en otras variedades también se presentó esta reducción del crecimiento de las raíces. Kulkarni *et al.* (2004) informaron la

reducción de la masa fresca de los callos con el aumento del nivel de radiaciones gamma hasta 30 y 40 Gy.

Se observó algunas plantas cloróticas en las plántulas mutantes (Figura 18), lo cual es un indicativo que reafirma que posiblemente los explantes mutantes se encontraban en estrés o en proceso de recuperación, ya que apenas se habían repicado unos pocas veces después de recibir la dosis de radiación.



**Figura 18. Comparación de la variable clorosis de Miskibamba original y un mutante**

Con la aplicación de ANA se favorece el crecimiento y desarrollo de las plantas originales en algunas variables. Sin embargo, la aplicación de este regulador para los mutantes no lo fue, por las razones mencionadas antes, de estrés, efecto tóxico o proceso de recuperación.

## V. CONCLUSIONES

- La desinfección superficial con 1,8% de NaClO durante 3 minutos permitió menor contaminación (60 % de limpieza) y obtener mayor supervivencia (50% de explantes vivos) en la introducción *in vitro*.
- El tipo de medio de inicio influyó en la introducción *in vitro*, con 50 % y 100 % de sales de MS de consistencia sólida permitieron obtener plantas de mayor longitud y entrenudos, respectivamente. Además, con el uso de frascos se constató mayor cantidad de plantas de mayor longitud, menor número de brotes y regular número de nudos en comparación del uso de tubos.
- Los medios de cultivo para la etapa de multiplicación no influenciaron significativamente. El mejor medio en la etapa de multiplicación es el medio MS (libre de regulador de crecimiento) porque permitió obtener plántulas con mayor longitud (34 mm longitud) en comparación a los medios con Kinetina.
- Los medios en la etapa de enraizamiento influyeron significativamente, 0,5mg/L ANA y 0,2mg/L ANA fueron los óptimos para el enraizamiento de los explantes de stevia original. Los explantes mutantes de stevia crecieron y se desarrollaron mejor en medio MS libre de regulador de crecimiento.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda emplear MS + 0,2 mg/L de ANA para propagar plántulas de stevia accesión Miskibamba, mientras para el mutante, el medio MS libre de regulador de crecimiento.
- Se sugiere seguir evaluando el comportamiento del mutante de stevia accesión Miskibamba en diferentes medios con menor o mayor concentración de reguladores de crecimiento o en otros tipos de medios.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abu, E. 2019. Some physiological studies on stevia (*Stevia rebaudiana*). Tesis para optar grado de doctor, Universidad de El Cairo, Egipto, Departamento de Botánica Agrícola. 20 pp.

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.

Alcaraz, G. y Yagarí, L. 2003. La concepción de la curación Chamánica entre los indígenas Embera de Colombia: un proceso de comunicación socio-cultural y fisiológica. Investigación y Educación en Enfermería, 21(2): 60-78.

Alvarenga, S. y Salazar, T. 2015. Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. Cultivos Tropicales. 36(3): 50-57

Álvarez, A; Corrales, R; Morales, C; Avendaño, C; Villareal, F. 2017. Dosis óptima de irradiación gamma con Co<sup>60</sup> para inducción de mutagénesis en pastos Optimal dose of gamma irradiation with Co<sup>60</sup> for mutagenesis induction in grasses. *Nova Scientia*, N° 19. 9 (2): 65-82

Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid.

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.

Bonilla, C; Sánchez, M; Perlaza, D. 2007. Evaluación de métodos de propagación, fertilización nitrogenada y fenología de estevia en condiciones del Valle del Cauca. *Acta Agron* (Colombia), 56 (3): 131-134. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v56n3/v56n3a04.pdf>

Bursacé, D; Maras, M; Braba, F; Granato, D; Roohinejad, S; Mallikarjunan, K; Montesano, D; Lorenzo, J; Putnik, P. 2018. Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. A review, Food Chemistry. 46 pp

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, WM. Mroginski, LA. Cali, Colombia, 970 pp.

Cruz, S. y Maurate, M. 2018. Factores claves de éxito para desarrollar oferta exportable de *Stevia rebaudiana*, comercializada como hojas secas del departamento de San Martín – Perú hacia el mercado de Japón. Tesis para optar Título. Universidad de San Martín de Porres, Fac. Ciencias Administrativas y RR.HH. 174 pp. Disponible en: [https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/4566/cruz\\_maurate.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/4566/cruz_maurate.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Cueva, V. 2016. Estudio de rentabilidad del cultivo de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en Trujillo, La Libertad. Universidad Nacional de Trujillo. Esc. Acad. Prof. De Agronomía.

Delvalle, W; De Rueda, D; Espinal, R; Paz, P. 2001. Propagación in vitro de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. Proyecto especial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura. Zamorano, Carrera De Ciencia Y Produccion Agropecuaria, Honduras. 60 pp.

Espinal, D; Delvalle, W; Cifuentes, E; Ramia, N. 2006. Propagación in vitro de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. Ceiba. 47(1-2):11-18

Fabrizio, G; Cantile, T; Alcidi, B; Coda, M; Ingenito, A; Zarreli, A; Fabio, G; Pollio, A. 2015. Is *Stevia rebaudiana* Bertoni a Non Cariogenic Sweetener? A Review, Review. Molecules. 21(38): 1-12

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2008. World Health Organization (WHO), Expert Committee on Food Additives FAO/OMS. Summary and Conclusions of the 69th meeting of the Joint. Disponible en: <https://www.fao.org/documents/card/es/c/c1dfe308-c04e-444d-9885-e2b20ef6bb07/>

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2017. Steviol Glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni. Residue Monograph prepared by the meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Italia: 84th meeting.

- García, Y; González, M; Torres, S; Freire, M; Pérez, M; Mollineda, A; Rivero, L. 2016. Efecto de la densidad de inóculo sobre la morfología y fisiología de los brotes de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl cultivados en Sistema de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal* 16 (4): 231 – 237.
- Garay, V. 2007. Efecto del aporque y la densidad de plantación en dos cortes, en el rendimiento de la stevia (*Stevia rebaudiana*) en la localidad de Campo Grande, Bermejo – Tarija. (Informe profesional para optar título de Ingeniero Agrónomo). Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andres. La Paz, Bolivia, 117 pp.
- Gosh, A; Igamberdiev, A. y Debnath, S. 2018. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis and changes of antioxidant properties in tissue cultures of half-high blueberry plants. *SCieNtiFiC RepoRTs*. 8(16978): 1-11.
- Gomes, E; Moterle, D; Biasi, L; Koehler, H; Kanis, L. y 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
- González, C; Soledad, M; Pérez, E; Dornier, M; Morel, G. 2014. Caracterización de cultivares de *Stevia rebaudiana* Bertoni de diferentes procedencias. *Bioagro*. 26(2): 79-88.
- Gonzales, J. 2004. La tecnología nuclear en el mejoramiento de las plantas (en línea). *Ciencia*. México. Consultado el 27 de febrero 2018, 99 pp. Disponible en: [http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/55\\_2/tecnologia\\_nuclear.pdf](http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/55_2/tecnologia_nuclear.pdf).
- Halim, A. y Hossain, B. 2016. Sterilization process for in vitro regeneration of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *International Journal Of Business, Social And Scientific Research*. 4(84): 320-323.
- Jarma, A; Rengifo, T; Araméndis, H. 2005. Aspectos fisiológicos de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano: I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa. *Fisiología de Cultivos. Agronomía Colombiana* 23(2): 207-216.
- Javed, M; Habib, I; Jamil, M; Anwar M; Nazir, S; Rahman, S; Iqbal, M; 2019. Protocol optimization for efficient in vitro micro-propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Adv. Life Sci*, 6(3): 100-105.

- Jin, M; Piao, X; Xiu, J; Park, S; Lian, M. 2013. Micropropagation using a bioreactor system and subsequent acclimatization of grape rootstock '5BB'. *Scientia Horticulturae* 164: 35-40; doi: 10.1016/j.scienta.2013.09.004
- Khalil, S; Zamir, R; Ahmad, N. 2014. Effect of different propagation techniques and gamma irradiation on major steviol glycoside's content in *Stevia rebaudiana*. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(6): 1743-1751.
- Khalil, S; Samir, R; Ahmad, N. 2014. Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 21: 566-573.
- Kulkarni, V; Ganapathi, T; Bapat, V; Rao, P. 2004. Establishment of cell-suspension cultures in banana cv. Grand Naine and evaluation of its sensitivity to Gamma-irradiation. *Curr Sci* 86: 902- 904.
- La República, 2020. Diario peruano, Disponible: <https://larepublica.pe/economia/2020/02/24/fabrica-de-stevia-mas-grande-del-mundo-iniciara-operaciones-en-piura-lrnd/>
- Llacta, M. 2014. Extracción de edulcorante a partir de la hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni* proveniente del cultivo *in vitro* (Informe profesional para optar título de Ingeniero Agroindustrial). Fac. Ciencias Agrarias. Esc. Académica Profesional de Agroindustrias. Universidad Nacional de Huancavelica, Perú. 199 pp.
- Martínez, A. 2018. Implicaciones de las hormonas vegetales en respuesta al estrés abiótico. Trabajo para optar grado de Biólogo. Fac. Ciencias experimentales. Universidad de Jaen. 51 pp.
- Martínez, M. 2015. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una revisión. *Cultivos Tropicales*, 36:5-15.
- Martinez, D; Urrea, A; Jiménez, E; Atehortua, L. 2016. Estrategia para la propagación in vitro de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Bioteología Vegetal*. 16 (3): 131 – 142.
- Martirena, A; Veitía, N; García, L; Collado, R.; Torres, D; Rivero, L; Ramírez, M. 2015. Respuesta in vitro de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'Ica Pijao' irradiadas con diferentes dosis de radiación Gamma. *Bioteología Vegetal* 15 (1): 9 – 15.

Mayta, M. 2016. Dosimetría de rayos gamma para la inducción de mutación en cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). (Informe profesional para optar grado de Magíster Scientiae en Mejoramiento Genético de Plantas). (en línea). Fac. Agronomía. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú. Consultado el 06 de marzo 2018. 87 pp. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2836/F30-M39-T.pdf?sequence=1>

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.

MINSA (Ministerio de Salud). 2020. DIGESA. Consulta de Registros Sanitarios de Alimentos. Disponible en: [http://www.digesa.minsa.gob.pe/Expedientes/Consulta\\_Registro\\_Sanitario.aspx](http://www.digesa.minsa.gob.pe/Expedientes/Consulta_Registro_Sanitario.aspx)

Nakayama, H; González, M; Oggero, A; Britos, R; Cataldi, C; Cantero, F; Benites, F; Lopez, I. 2018. Fitomejoramiento Participativo. Manual, Proyecto Fortalecimiento de la producción de *Stevia rebaudiana* bert. (ka'a he'ë) a través del Fitomejoramiento Participativo con pequeños productores. CONACYT, PROCIENCIA. 1era. Edición. 50 pp. Disponible en: [https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/upload\\_editores/u454/Manual-Fitomejoramiento.pdf](https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/upload_editores/u454/Manual-Fitomejoramiento.pdf)

Quintana, V. 2018. Radiosensibilidad de café (*Coffea arabica* L. var. Typica) aplicado con radiación gamma. (Informe profesional para optar título de Ingeniero Agrónomo). Fac. Agronomía. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú. 88 pp.

Razak, U; Boon, C; Sing, T; Kiaw, L. 2014. *In vitro* Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. Braz. Arch. Biol. Technol. 57 (1): 23-28.

Rojas, S. 2009. Stevia edulcorante orgánico del siglo XXI. 1<sup>era</sup> edición. En M Alcántara (Ed), Universidad Nacional Agraria La Molina. 306-317 pp.

Romero, J; Rodriguez, M; Gutiérrez, M; Escalante, J; Peña, C; Cueto, J. 2020. Growth and secondary metabolites of *Stevia pilosa* Lag. in three edaphoclimatic conditions in the state of Hidalgo, Mexico. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 26(2): 315-329.

- Rosales, C; Brenes, J; Salas, K; Arce, S; Esquibel, E. 2018. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* in temporary immersion systems as an alternative horticultural production method. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 24 (1): 69-84
- Rokosa, M. y Kulpa, D. 2020. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* plants. *Ciência Rural*, Santa Maria, 50(1): 1-9.
- Salvador, R; Sotelo, M; Paucar, 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. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v5n3/a06v5n3.pdf>
- Sanchez, Y; Hernández, R; Ramírez, E; Sánchez, M; Belosevic, C; González, I; Castro, I; Carballo, A; Villarroel, L; Vaamonde, R. 2017. Caracterización de un cultivar de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Asteraceae-Eupatorieae) a partir de morfología vegetativa, reproductiva y morfoanatomía foliar (en línea). *Revista de Investigación*, 41(92): 95-114. Revisado el 9 Ener 2020. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-29142017000300006&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-29142017000300006&lng=es&tlng=es).
- Seyis, F; Yurteri, E; özcan, A. 2017. *In Vitro* Multiplication of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Genotypes by Using Different Explants. *International Journal of Crop Science and Technology (IJCST)*. 3(2): 36-41
- Suarez, I; Quintero, I. 2014. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural a través de explantes con meristemos pre-existentes. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 16 (1): 29 – 33. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77631180003.pdf>
- Suprasanna, P; Rupali, C; Desai, N; Bapat, V. 2008. Partial desiccation augments plant regeneration from irradiated embryogenic cultures of sugarcane. *Plant Cell Tiss. Organ Cult* 92: 101-105.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. *Fisiología vegetal* Vol 2. 3era edición. Book Print Digital, S.A. p. 845 -869.
- Thilakarathne, P; Peiris, S; Lankika, P. 2019. Efficient low cost seesap (CSUP) technique for micropropagation of newly introduced sweetener plant, *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Afr. J. Biotechnol.* 18(25): 540-547.

- Thiyagarajan, M. y Venkatachalam, P. 2012. Large scale in vitro propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. *Industrial Crops and Products* 37: 111–117.
- Urbi, Z. y Zainuddin, 2015. Standardization of surface sterilization protocol of field grown *Stevia rebaudiana* prior to in vitro clonal propagation, *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)* 77(24): 141–146
- Uskutoglu, T; Uskutoglu, D; Turgut, K. 2019. Effects on Pre-treatment and Different Tissue Culture Media for Androgenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Tech.* 21(6): 1016–1023.
- Vázquez, M; Guevara, R, Aguirre, H; Alvarado, A; Romero, H. 2017. Consumo actual de edulcorantes naturales (beneficios y problemática): *Stevia*. *Rev Méd Electrón [Internet]*. 39(5): 1153-1159. Disponible en: <http://www.revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/2140/3609>
- Vázquez, L; Robledo, A; Muratalla, A; Conde, V. 2014. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y detección de steviósidos. 2014. *Bioagro.* 26 (1): 49-56.
- Verma, S; Yadav, K.; Singh, N. 2011. Optimization of the Protocols for Surface Sterilization, Regeneration and Acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci.*, 11 (2): 221-227.
- Yadav, A; Singh, S; Dhyani, D; Ahuja, P. 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can. J. Plant Sci.* 91: 1-27

## VIII. ANEXOS

### **Anexo 1. Resumen de los análisis estadísticos de la introducción *in vitro* - Desinfección**

Análisis de varianza de la influencia de la desinfección superficial ([NaClO] y tiempo de sumergimiento) en la contaminación de explantes de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
[NaClO]	1	42	42.01	0.26	0.617
Minutos	3	4886.5	1628.82	9.96	0
[NaClO]*Minutos	3	2000.3	666.78	4.08	0.018
Error	24	3926.4	163.6		
Total	31	10855.2			

Prueba comparativa Tukey de la desinfección superficial (factores [NaClO] y tiempo de sumergimiento) en el porcentaje de contaminación de explantes de stevia accesión Miskibamba

[NaClO]*Minutos	N	Media	Agrupación
1.00% 25	4	80	A
1.80% 25	4	77.5	A
1.80% 10	4	62.5	A B
1.00% 3	4	60.8333	A B
1.80% 5	4	53.75	A B
1.00% 5	4	44.1667	B
1.80% 3	4	40.4167	B
1.00% 10	4	40	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de varianza de la influencia de la desinfección superficial ([NaClO] y tiempo de sumergimiento) en la supervivencia de explantes de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
[NaClO]	1	272.2	272.2	2.16	0.155
Minutos	3	5793.8	1931.3	15.29	0
[NaClO]*Minutos	3	1824.3	608.1	4.82	0.009
Error	24	3030.6	126.3		
Total	31	10920.8			

Prueba comparativa Tukey de la desinfección superficial (factores [NaClO] y tiempo de sumergimiento) en la supervivencia de explantes de stevia accesión Miskibamba

[NaClO]*Minutos	N	Media	Agrupación		
1.80% 3	4	49.5833	A		
1.00% 5	4	39.1667	A	B	
1.00% 10	4	38.3333	A	B	
1.00% 3	4	34.5833	A	B	
1.80% 5	4	20		B	C
1.80% 10	4	17.0833		B	C
1.80% 25	4	5.8333			C
1.00% 25	4	3.75			C

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

## **Anexo 2. Resumen de los análisis estadísticos de la introducción *in vitro* – Medio de inicio**

Análisis de varianza de la influencia del tipo de medio de inicio en la longitud de plántulas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sales	1	3.853	3.853	0.11	0.746
Consistencia	1	17.28	17.28	0.5	0.498
Sales*consistencia	1	152.653	152.653	4.45	0.068
Error	8	274.18	34.272		
Total	11	447.967			

Prueba comparativa Tukey de los medios de inicio sobre la longitud de plántulas de stevia accesión Miskibamba

Sales*consistencia	N	Media	Agrupación
50 Sólido	3	20.4	A
100 Líquido	3	16.8667	A
100 Sólido	3	12.1333	A
50 Líquido	3	10.8667	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de varianza de la influencia del tipo de medio de inicio en los números de nudos de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Consistencia	1	5.3333	5.3333	2.72	0.138
Sales	1	0.2133	0.2133	0.11	0.75
consistencia*Sales	1	0.6533	0.6533	0.33	0.58
Error	8	15.7067	1.9633		
Total	11	21.9067			

Prueba comparativa Tukey de los medios de inicio sobre el número de nudos de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Sales*consistencia	N	Media	Agrupación
50 Sólido	3	4.73333	A
100 Sólido	3	4.53333	A
100 Líquido	3	3.66667	A
50 Líquido	3	2.93333	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de varianza de la influencia del tipo de medio de inicio en los números de brotes de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sales	1	0.08333	0.08333	0.46	0.515
Consistencia	1	0.56333	0.56333	3.13	0.115
Sales*consistencia	1	0.01333	0.01333	0.07	0.792
Error	8	1.44	0.18		
Total	11	2.1			

Prueba comparativa Tukey de los medios de inicio sobre el número de brotes de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Sales*consistencia	N	Media	Agrupación
100 Sólido	3	2.23333	A
50 Sólido	3	2	A
100 Líquido	3	1.73333	A
50 Líquido	3	1.63333	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

### Anexo 3. Resumen de los análisis estadísticos de la introducción *in vitro* – Factor envase

Análisis de varianza de la influencia del factor envase de siembra en la longitud de plántulas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TTO	1	491.41	491.41	39.78	0.003
Error	4	49.41	12.35		
Total	5	540.83			

Prueba comparativa Tukey de la influencia del tipo de envase sobre el número de nudos de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

TTO	N	Media	Agrupación
TUBO	3	36.17	A
FRASCO	3	18.067	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de varianza de la influencia del factor envase sobre los números de nudos desarrollados de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TTO	1	0.001667	0.001667	0.02	0.882
Error	4	0.266667	0.066667		
Total	5	0.268333			

Prueba comparativa Tukey de la influencia del tipo de envase sobre el número de nudos desarrollados de stevia accesión Miskibamba

TTO	N	Media	Agrupación
FRASCO	3	4.2	A
TUBO	3	4.16667	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de varianza de la influencia del factor envase de siembra en los números de brotes desarrollados de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TTO	1	0.735	0.735	25.94	0.007
Error	4	0.1133	0.02833		
Total	5	0.8483			

Prueba comparativa Tukey de la influencia del tipo de envase sobre el número de brotes desarrollados de stevia accesión Miskibamba

TTO	N	Media	Agrupación
TUBO	3	2.06667	A
FRASCO	3	1.36667	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

#### Anexo 4. Stevia sembradas en frasco y tubo



#### Anexo 5. Resumen de los análisis estadísticos de la multiplicación *in vitro* de stevia accesión Miskibamba

Análisis de varianza de la influencia de los medios de multiplicación en el peso fresco de plántulas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	0.01627	0.002712	8.93	0
Error	28	0.008504	0.000304		
Total	34	0.024773			

Prueba comparativa Dunnett de los pesos frescos de stevia accesión Miskibamba sembrados en diferentes medios de multiplicación

Tto	N	Media	Agrupación
MS libre de regulador de crecimiento (Control)	5	0.096007	A
4 mg/L kinetina en MS/2	5	0.148913	
6 mg/L kinetina en MS	5	0.12355	A
4 mg/L Kinetina en MS	5	0.10712	A
6 mg/L kinetina en MS/2	5	0.103763	A
1.3 mg/L Kinetina en MS	5	0.094756	A
1.3 mg/L Kinetina en MS/2	5	0.076302	A

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios de multiplicación en el peso seco de plántulas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TTOS	6	0.000076	0.000013	4.89	0.002
Error	28	0.000072	0.000003		
Total	34	0.000148			

Prueba comparativa Dunnett de los pesos secos de stevia accesión Miskibamba sembrados en los diferentes medios de multiplicación

TTOS	N	Media	Agrupación
MS libre de regulador de crecimiento (Control)	5	0.008496	A
4 mg/L kinetina en MS/2	5	0.012252	
6 mg/L kinetina en MS	5	0.010737	A
4 mg/L Kinetina en MS	5	0.010177	A
1.3 mg/L Kinetina en MS	5	0.009171	A
6 mg/L kinetina en MS	5	0.008812	A
1.3 mg/L Kinetina en MS/2	5	0.007488	A

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios de multiplicación en la humedad de plántulas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TTOS	6	12.93	2.1553	3.33	0.013
Error	28	18.14	0.6479		
Total	34	31.07			

Prueba comparativa Dunnett de las humedades de stevia accesión Miskibamba sembrados en los diferentes medios de multiplicación

TTOS	N	Media	Agrupación
MS libre de regulador de crecimiento (Control)	5	91.1093	A
4 mg/L kinetina en MS/2	5	91.8203	A
6 mg/L kinetina en MS/2	5	91.4499	A
6 mg/L kinetina en MS	5	91.3091	A
4 mg/L Kinetina en MS	5	90.458	A
1.3 mg/L Kinetina en MS/2	5	90.212	A
1.3 mg/L Kinetina en MS	5	90.1495	A

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios de multiplicación en la longitud de plántulas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	338.9	56.49	1.67	0.167
Error	28	949.9	33.92		
Total	34	1288.8			

Prueba comparativa Dunnett de la influencia de los medios de multiplicación en longitud de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Tto	N	Media	Agrupación
MS libre de regulador de crecimiento (Control)	5	33.97	A
1.3 mg/L Kinetina en MS	5	28.22	A
4 mg/L kinetina en MS/2	5	26.12	A
4 mg/L Kinetina en MS	5	25.97	A
6 mg/L kinetina en MS	5	25.48	A
6 mg/L kinetina en MS/2	5	24.71	A
1.3 mg/L Kinetina en MS/2	5	24.11	A

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios de multiplicación en el número de nudos de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	3.712	0.6186	1.38	0.259
Error	28	12.596	0.4499		
Total	34	16.308			

Prueba comparativa Dunnett de la influencia de los medios de multiplicación en el número de nudos de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Tto	N	Media	Agrupación
MS libre de regulador de crecimiento (Control)	5	4.01	A
1.3 mg/L Kinetina en MS	5	4.77	A
4 mg/L kinetina en MS/2	5	4.65	A
4 mg/L Kinetina en MS	5	4.38	A
6 mg/L kinetina en MS	5	4.37	A
6 mg/L kinetina en MS/2	5	3.93	A
1.3 mg/L Kinetina en MS/2	5	3.89	A

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios de multiplicación en el número de brotes de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	9.838	1.63974	20.23	0
Error	28	2.269	0.08104		
Total	34	12.107			

Prueba comparativa Dunnett de la influencia de los medios de multiplicación en el número de brotes de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Tto	N	Media
MS libre de regulador de crecimiento (Control)	5	1.35
4 mg/L kinetina en MS/2	5	3.09
6 mg/L kinetina en MS	5	2.99
4 mg/L Kinetina en MS	5	2.68
6 mg/L kinetina en MS/2	5	2.67
1.3 mg/L Kinetina en MS	5	2.64
1.3 mg/L Kinetina en MS/2	5	2.49

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios de multiplicación en el número de hojas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	39.94	6.657	2.42	0.052
Error	28	76.97	2.749		
Total	34	116.91			

Prueba comparativa Dunnett de la influencia de los medios de multiplicación en el número de hojas de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Tto	N	Media	Agrupación
MS libre de regulador de crecimiento (Control)	5	9.74	A
1.3 mg/L Kinetina en MS	5	12.54	A
4 mg/L kinetina en MS/2	5	12.38	A
4 mg/L Kinetina en MS	5	12.09	A
6 mg/L kinetina en MS	5	11.91	A
6 mg/L kinetina en MS/2	5	10.34	A
1.3 mg/L Kinetina en MS/2	5	10.33	A

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

## Anexo 6. Análisis estadístico de Enraizamiento *in vitro* de stevia accesión Miskibamba

Análisis de varianza de la influencia de los medios de enraizamiento en el peso fresco de plántulas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	0.02066	0.003443	6.16	0
Error	28	0.01565	0.000559		
Total	34	0.03631			

Prueba comparativa Dunnet de los pesos frescos de stevia accesión Miskibamba sembrados en los diferentes medios de enraizamiento

Tto	N	Media	Agrupación
7 (Control)	5	0.104793	A
6	5	0.185371	
1	5	0.145735	
5	5	0.143038	A
4	5	0.130748	A
2	5	0.123196	A
3	5	0.116373	A

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios de enraizamiento en el peso seco de plántulas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	0.000059	0.00001	2.63	0.037
Error	28	0.000104	0.000004		
Total	34	0.000163			

Prueba comparativa Dunnet de los pesos secos de stevia accesión Miskibamba sembrados en los diferentes medios de enraizamiento

Tto	N	Media	Agrupación
7 (Control)	5	0.009138	A
6	5	0.013623	
1	5	0.011795	A
2	5	0.011514	A
4	5	0.0112921	A
3	5	0.010915	A
5	5	0.010137	A

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios de enraizamiento en la humedad de plántulas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	29.24	4.873	6.3	0
Error	28	21.67	0.7739		
Total	34	50.91			

Prueba comparativa Dunnet de las humedades de stevia accesión Miskibamba sembrados en los diferentes medios de multiplicación

Tto	N	Media	Agrupación
7 (Control)	5	91.196	A
5	5	92.8982	
6	5	92.6671	A
1	5	91.9066	A
4	5	91.3679	A
2	5	90.5014	A
3	5	90.3679	A

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios de enraizamiento en la longitud de plántulas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	6436.8	1072.79	37.31	0
Error	28	805	28.75		
Total	34	7241.8			

Prueba comparativa Dunnet de la influencia de los medios de enraizamiento en longitud de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Tto	N	Media	Agrupación
7 (Control)	5	48.44	A
6	5	64.01	
5	5	63.44	
4	5	41.58	A
1	5	38.55	
2	5	30.37	
3	5	27.48	

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios de enraizamiento en el número de nudos de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	6.972	1.162	5.97	0
Error	28	5.452	0.1947		
Total	34	12.424			

Prueba comparativa Dunnet de la influencia de los medios de enraizamiento en el número de nudos de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Tto	N	Media	Agrupación
7 (Control)	5	4	A
6	5	4.24	A
1	5	3.87	A
5	5	3.78	A
4	5	3.66	A
2	5	3.2	
3	5	2.84	

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios de enraizamiento en el número de brotes de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	0.4977	0.08295	1.63	0.175
Error	28	1.422	0.05079		
Total	34	1.9197			

Prueba comparativa Dunnet de la influencia de los medios de enraizamiento en el número de brotes de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Tto	N	Media	Agrupación
7 (Control)	5	1.56	A
1	5	1.83	A
4	5	1.77	A
2	5	1.72	A
6	5	1.63	A
3	5	1.52	A
5	5	1.5	A

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios de enraizamiento en el número de hojas de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	36.18	6.029	3.88	0.006
Error	28	43.51	1.554		
Total	34	79.69			

Prueba comparativa Dunnet de la influencia de los medios de enraizamiento en el número de hojas de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Tto	N	Media	Agrupación
7 (Control)	5	10.65	A
6	5	11.2	A
1	5	10.4	A
4	5	10.18	A
5	5	10.02	A
2	5	8.78	A
3	5	8.06	

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

Análisis de la varianza no paramétrica Kruskal Wallis de la influencia de los medios de enraizamiento en el desarrollo de raíces de stevia accesión Miskibamba

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Mediana	H	P
% con Raíz	1	5	98	2.74	100	15.45	0.008
% con Raíz	2	5	77	27.06	95		
% con Raíz	3	5	68	30.33	85		
% con Raíz	4	5	93	7.58	95		
% con Raíz	5	5	99	2.24	100		
% con Raíz	6	5	100	0	100		
% con Raíz	7	5	89	8.22	85		

Análisis de comparativo no paramétrica Kruskal Wallis de la influencia de los medios de enraizamiento en el desarrollo de raíces de stevia accesión Miskibamba

Tratamiento	Medias	Ranks			
3	68	7.5	A		
7	89	12.8	A	B	
2	77	13.1	A	B	
4	93	17.3	A	B	C
1	98	22.7		B	C
5	99	25.1		B	C
6	100	27.5			C

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

Análisis de varianza de la influencia de los medios de enraizamiento en la longitud de raíces de stevia accesión Miskibamba

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tto	6	793.8	132.299	23.59	0
Error	28	157	5.609		
Total	34	950.8			

Prueba comparativa de Dunnet de los medios de enraizamiento sobre la longitud de las raíces de las plántulas de stevia accesión Miskibamba

Tto	N	Media	Agrupación
7 (Control)	5	16.5429	A
4	5	16.6	A
6	5	15.0857	A
5	5	13.7714	A
1	5	9.8857	
2	5	5.2	
3	5	4.6286	

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*

## Anexo 7. Análisis estadístico de la comparación de crecimiento y desarrollo *in vitro* de stevia Miskibamba original y mutante

Análisis de varianza de la influencia de los medios y el explante en el peso fresco de plántulas de stevia

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MEDIO	1	0.000862	0.000862	1.78	0.219
EXPLANTE	1	0.00099	0.00099	2.04	0.191
MEDIO*EXPLANTE	1	0.000975	0.000975	2.01	0.194
Error	8	0.003875	0.000484		
Total	11	0.006701			

Prueba comparativa Tukey de los diferentes medios de cultivo y explantes sobre los pesos frescos de stevia

MEDIO*EXPLANTE	N	Media	Agrupación
0.2 mg/L ANA Mutante	3	0.117743	A
MS Mutante	3	0.08277	A
MS No mutante	3	0.082633	A
0.2 mg/L ANA No mutante	3	0.081553	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de varianza de la influencia de los medios y explantes en los peso seco de plántulas de stevia

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MEDIO	1	0.000003	0.000003	0.38	0.554
EXPLANTE	1	0.000007	0.000007	0.82	0.39
MEDIO*EXPLANTE	1	0.000008	0.000008	0.98	0.351
Error	8	0.000067	0.000008		
Total	11	0.000086			

Prueba comparativa Tukey de la influencia de los medios y explantes en los pesos secos de stevia

MEDIO*EXPLANTE	N	Media	Agrupación
0.2 mg/L ANA Mutante	3	0.0118567	A
MS No mutante	3	0.0093033	A
MS Mutante	3	0.0091633	A
0.2 mg/L ANA No mutante	3	0.0086767	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de la varianza no paramétrica Kruskal Wallis de la influencia del medio de cultivo y explante en el humedad de plántulas de stevia

Ttos	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
1	3	87.7517	5	-0.83
2	3	89.1652	6.3	-0.09
3	3	88.4458	7.3	0.46
4	3	88.2888	7.3	0.46
General	12		6.5	

Análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis de la influencia del medio y explante en el desarrollo de raíces de stevia

Ttos	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
1	3	60	3.2	-1.85
2	3	80	7.3	0.46
3	3	70	5	-0.83
4	3	90	10.5	2.22
General	12		6.5	

Análisis de varianza de la influencia del medio y explante en la longitud de plántulas de stevia

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MEDIO	1	77.521	77.521	4.35	0.071
EXPLANTE	1	1.268	1.268	0.07	0.796
MEDIO*EXPLANTE	1	435.608	435.608	24.43	0.001
Error	8	142.627	17.828		
Total	11	657.023			

Prueba comparativa Tukey de la influencia del medio y explante en la longitud de las plántulas de stevia

MEDIO*EXPLANTE	N	Media	Agrupación
0.2 mg/L ANA No mutante	3	35.3667	A
MS Mutante	3	30.9333	A B
0.2 mg/L ANA Mutante	3	23.9667	B C
MS No mutante	3	18.2333	C

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de varianza de la influencia del medio y explante en el número de nudos de stevia

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MEDIO	1	0.1408	0.1408	0.45	0.521
EXPLANTE	1	0.6075	0.6075	1.94	0.201
MEDIO*EXPLANTE	1	0.5208	0.5208	1.67	0.233
Error	8	2.5	0.3125		
Total	11	3.7692			

Prueba comparativa Tukey de la influencia del medio y explante en el número de nudos de las plántulas de stevia

MEDIO*EXPLANTE	N	Media	Agrupación
MS Mutante 0.2 mg/L ANA	3	3.26667	A
Mutante 0.2 mg/L ANA No mutante	3	3.06667	A
MS No mutante	3	3.03333	A
	3	2.4	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de varianza de la influencia del medio y explante en el número de brotes de stevia

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MEDIO	1	0.03	0.03	1.57	0.246
EXPLANTE	1	0.03	0.03	1.57	0.246
MEDIO*EXPLANTE	1	0.01333	0.01333	0.7	0.428
Error	8	0.15333	0.01917		
Total	11	0.22667			

Prueba comparativa Tukey de la influencia del medio y explante en el número de brotes de las plántulas de stevia

MEDIO*EXPLANTE	N	Media	Agrupación
0.2 mg/L ANA Mutante	3	1.7	A
0.2 mg/L ANA No mutante	3	1.53333	A
MS Mutante	3	1.53333	A
MS No mutante	3	1.5	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de varianza de la influencia del medio y explante en el número de hojas de stevia

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MEDIO	1	0.0675	0.0675	0.04	0.838
EXPLANTE	1	10.2675	10.2675	6.78	0.031
MEDIO*EXPLANTE	1	14.7408	14.7408	9.74	0.014
Error	8	12.1133	1.5142		
Total	11	37.1892			

Prueba comparativa Tukey de la influencia del medio y explante en el número de hojas de las plántulas de stevia

MEDIO*EXPLANTE	N	Media	Agrupación
MS Mutante	3	9.4	A
0.2 mg/L ANA No mutante	3	7.7	A B
0.2 mg/L ANA Mutante	3	7.33333	A B
MS No mutante	3	5.33333	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de varianza de la influencia del medio y explante en la longitud de raíces de stevia

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MEDIO	1	17.76	17.763	3.31	0.107
EXPLANTE	1	30.72	30.72	5.72	0.044
MEDIO*EXPLANTE	1	38.16	38.163	7.1	0.029
Error	8	42.99	5.374		
Total	11	129.64			

Prueba comparativa de Tukey del medio y explante sobre la longitud de las raíces de las plántulas de stevia

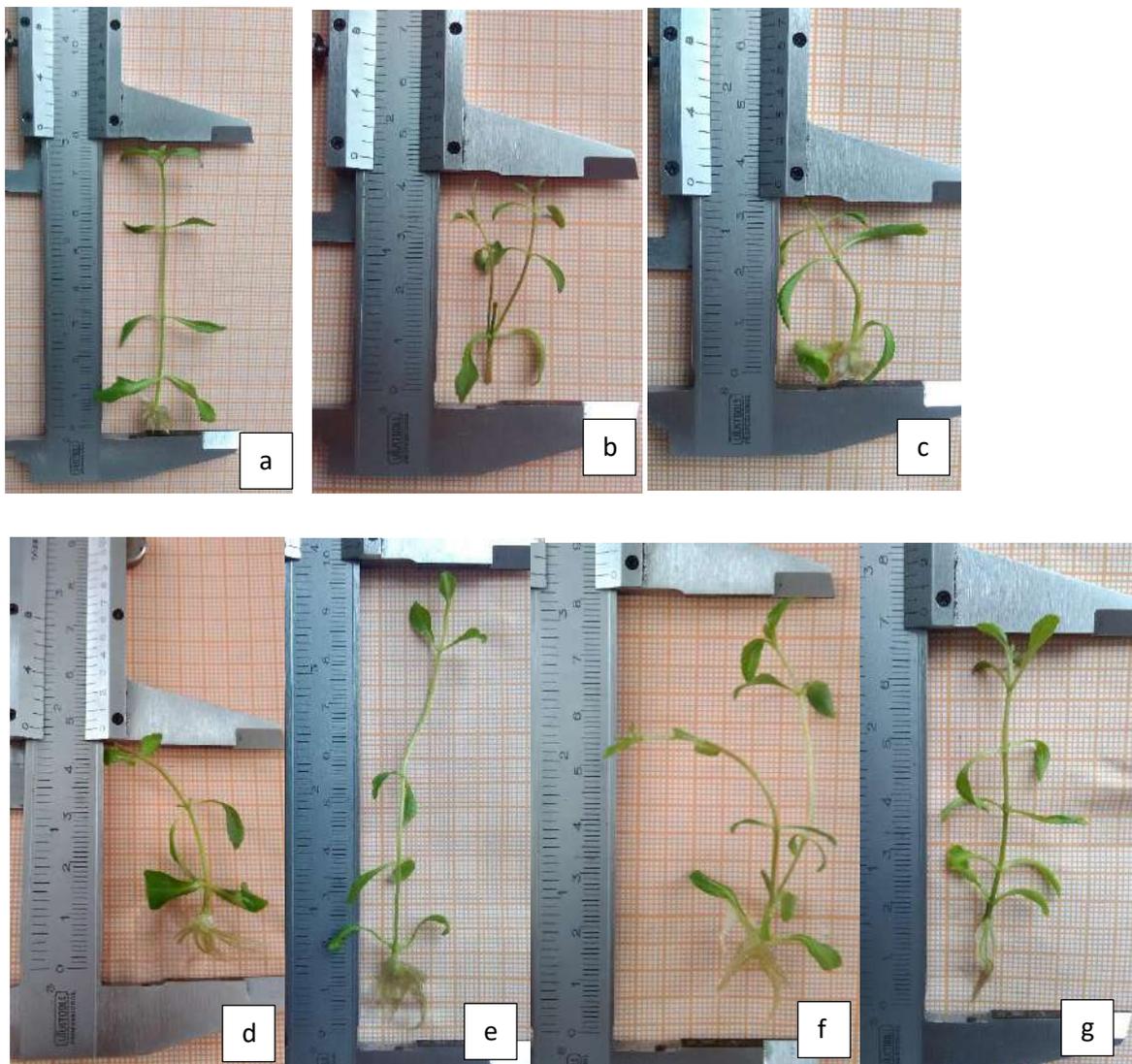
MEDIO*EXPLANTE	N	Media	Agrupación
0.2 mg/L ANA No mutante	3	12	A
MS Mutante	3	6.3667	A B
MS No mutante	3	6	A B
0.2 mg/L ANA Mutante	3	5.2333	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Anexo 8. Plántulas desarrolladas en diferentes medios de multiplicación: a) 1,3 mg/L Kinetina en medio MS, b) 4 mg/L Kinetina en medio MS, c) 6 mg/L Kinetina en medio MS, d) 1,3 mg/L Kinetina en medio MS/2, e) 4 mg/L Kinetina en medio MS/2, f) 6 mg/L Kinetina en medio MS/2, g) Medio MS (Libre de regulador de crecimiento).**



**Anexo 9. Plántulas desarrolladas en diferentes medios de enraizamiento: a) 0.5 mg/L de AIB, b) 1 mg/L de AIB, c) 2 mg/L de AIB, d) 0.1mg/L de ANA, e) 0.2 mg/L de ANA, f) 0.5 mg/L de ANA, g) Control (Libre de regulador de crecimiento).**



**Anexo 10. Comparación de plántulas de stevia mutante y original: a) Plántula mutante sembrado en medio MS, b) Plántula original sembrado en MS, c) Plántula mutante sembrado en MS+0.2 mg/L de ANA, d) Plántula original sembrado en MS+0.2 mg/L de ANA**

