

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMIA



**“ACLIMATACIÓN DE PLANTAS *IN VITRO* DE *Stevia rebaudiana* B.
EN TRES AMBIENTES CONTROLADOS”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE

INGENIERO AGRÓNOMO

ÁLVARO SEBASTIÁN CASTRO SUÁREZ

LIMA-PERÚ

2023

Document Information

Analyzed document	TesisAlvaroCastro (1).docx (D159903542)
Submitted	3/2/2023 4:27:00 PM
Submitted by	Lourdes Tapia
Submitter email	ltapia@lamolina.edu.pe
Similarity	10%
Analysis address	ltapia.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	Tesis Consuelo Jimenez J..pdf Document Tesis Consuelo Jimenez J..pdf (D77227805)	 1
SA	Seminari coordinat_Quimica_Orgànica_1ºNHD, Grup A, Edulcorantes.pdf Document Seminari coordinat_Quimica_Orgànica_1ºNHD, Grup A, Edulcorantes.pdf (D46166109)	 1
SA	PROYECTO STEVIA 2015.docx Document PROYECTO STEVIA 2015.docx (D15019883)	 2
SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / TESIS PA CON CARÁTULA NUEVA (5to).docx Document TESIS PA CON CARÁTULA NUEVA (5to).docx (D144385660) Submitted by: rpinedo@lamolina.edu.pe Receiver: rpinedo.unalm@analysis.arkund.com	 4
SA	TALLER+2B+BIODIVERSIDAD.pdf Document TALLER+2B+BIODIVERSIDAD.pdf (D142379276)	 2
SA	16 DICIEMBRE MONOGRAFIA.docx Document 16 DICIEMBRE MONOGRAFIA.docx (D34097509)	 5
SA	PRODUCCIÓN DE STEVIA REBAUDIANA BERTONI COMO ALTERNATIVA ECONÓMICA, AMBIENTAL Y EC OSISTEMA.pdf Document PRODUCCIÓN DE STEVIA REBAUDIANA BERTONI COMO ALTERNATIVA ECONÓMICA, AMBIENTAL Y EC OSISTEMA.pdf (D72010488)	 1
W	URL: https://oeis.org/A245092 Fetched: 5/6/2021 9:34:43 AM	 3

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMIA

**“ACLIMATACIÓN DE PLANTAS *IN VITRO* DE *Stevia rebaudiana* B.
EN TRES AMBIENTES CONTROLADOS”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE

INGENIERO AGRÓNOMO

ÁLVARO SEBASTIÁN CASTRO SUÁREZ

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

.....
Ing. Mg. Sc. Andrés Virgilio Casas Díaz
PRESIDENTE

.....
Ing. Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa
ASESORA

.....
Dr. Alberto Marcial Julca Otiniano
MIEMBRO

.....
Biol. Mg. Sc. Ana Luzmeira Eguiluz de la Barra
MIEMBRO

LIMA-PERÚ

2023

DEDICATORIA

A mis padres Henry y Carola, quienes se esforzaron en darme una formación en valores y me dieron sabios consejos.

A mis hermanos Patricio y Valeria que me dan la alegría y me ayudaron con diferentes tareas.

A la empresa Grupo AJE por el financiamiento de la presente tesis.

Al Ing. Ángel Eduardo Añaños Jeri por sus recomendaciones al buen desarrollo del trabajo de investigación.

A mi padrino Gustavo quien me confió un proyecto con mucho futuro.

A la profesora Lourdes que estuvo siempre dispuesta a ayudarme y resolver cualquier duda en esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Henry y Carola quienes siempre me apoyaron y me ayudaron en la realización de este proyecto.

Agradezco a mi profesora asesora Lourdes Tapia, por su dedicación, apoyo incondicional, sus acertados consejos y la confianza transmitida.

Agradezco a la empresa Grupo AJE por el financiamiento de la presente tesis.

A mis compañeros y personal del laboratorio de Biotecnología, que me ayudaron en la realización de esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

I	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Objetivos de la investigación	2
1.1.1	General.....	2
1.1.2	Específico	2
II	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	Descripción de la problemática.....	3
2.1.1	Importancia del cultivo	4
2.1.2	Justificación	5
2.1.3	Antecedentes.....	6
2.2	Sobre el cultivo	8
2.2.1	Descripción de la planta	8
2.2.2	Ubicación geográfica.....	9
2.2.3	Área sembrada en Perú	11
2.3	Características agronómicas	11
2.3.1	Condiciones Edafoclimáticas	12
2.3.2	Técnicas de propagación	14
2.4	Propagación <i>in vitro</i>	16
2.4.1	Transplante y aclimatación de plantas <i>in vitro</i>	17
2.4.2	Aclimatación.....	18
III	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1	Material vegetal utilizado	23
3.2	Localidades de evaluación	23
3.2.1	Invernadero del IBT.....	23
3.2.2	Cámara edafoclimática-con simulación clima de Piura	23
3.2.3	Cámara edafoclimática-simulación clima de Naju.....	24
3.3	Tipo de investigación.....	24
3.4	Formulación de la hipótesis	24
3.5	Diseño de la investigación	24
3.6	Población y muestra.....	26
3.7	Variables evaluadas	26

3.7.1	Porcentaje de supervivencia	27
3.7.2	Altura de planta	27
3.7.3	Número de hojas	27
3.7.4	Peso fresco y seco.....	27
3.8	Procedimientos de análisis de datos.....	27
3.9	Metodología.....	28
3.9.1	Selección de plantas.....	28
3.9.2	Preparación de las plantas para el trasplante	29
3.9.3	Preparación del sustrato.....	29
3.9.4	Trasplante	31
3.9.5	Seguimiento y toma de datos.....	33
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1	Efecto del ambiente sobre la supervivencia.....	37
4.2	Efecto sobre la altura de planta.....	37
4.3	Efecto sobre el número de hojas	38
4.4	Efecto sobre el peso fresco	39
4.5	Efecto sobre el peso seco	40
V	CONCLUSIONES.....	42
VI	RECOMENDACIONES.....	43
VII	BIBLIOGRAFÍA.....	44
VIII	ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Glucósidos dulces en las hojas de <i>S. rebaudiana</i>	4
Tabla 2: Disposición de las unidades experimentales en las bandejas	25
Tabla 3: Disposición de las unidades experimentales en los tratamientos	26
Tabla 4: ANVA de altura de planta	38
Tabla 5: ANVA de número de hojas	39
Tabla 6: ANVA de peso fresco.....	39
Tabla 7: ANVA de peso seco	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cultivo de stevia.....	8
Figura 2: Hojas de stevia	9
Figura 3: Flor de stevia.....	9
Figura 4: Invernadero con túneles para aclimatación.....	21
Figura 5: Micro túnel.....	21
Figura 6: Cámara edafoclimatica Aralab.....	22
Figura 7: Plantas <i>in vitro</i> dentro del frasco.....	28
Figura 8: Frascos con plantas <i>in vitro</i>	28
Figura 9: Plantas sumergidas en Benomyl al 0.1%	29
Figura 10: Sustrato Premix	30
Figura 11: Sustrato Perlita	30
Figura 12: Bandeja de 200 celdas.....	30
Figura 13: Trasplante de plantas.....	31
Figura 14: Invernadero del IBT	31
Figura 15: Bandejas con plantas trasplantadas	32
Figura 16: Micro túnel utilizado.....	32
Figura 17: Cámara edafoclimática del IBT	32
Figura 18: Bandejas dentro de la cámara.	33
Figura 19: Micro túnel dentro de la cámara climática.....	33
Figura 20: Planta de Stevia con ataque fúngico	34
Figura 21: Plantas de Stevia, invernadero UNALM	34
Figura 22: Plantas de stevia, cámara climática-Naju.....	34
Figura 23: Plantas de stevia, cámara climática-Piura	35
Figura 24: Plantas seleccionadas para evaluación final.....	35
Figura 25: Balanza electrónica utilizada	36
Figura 26: Plantas envueltas en papel antes de ser llevadas a la estufa.....	36
Figura 27: Comparación del porcentaje de supervivencia en los tres tratamientos.....	37

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Datos colectados de altura de planta en Lima.....	50
Anexo 2: Datos colectados de altura de planta en la cámara climática – Naju	51
Anexo 3: Datos colectados de altura de planta en la cámara climática - Piura	52
Anexo 4: Datos colectados de número de hojas en Lima.....	53
Anexo 5: Datos colectados de número de hojas en la cámara climática - Naju	55
Anexo 6: Datos colectados de número de hojas en la cámara climática - Piura	56
Anexo 7: Datos colectados de la evaluación final en Lima.....	58
Anexo 8: Datos colectados de la evaluación final en la cámara climática - Naju.....	59
Anexo 9: Datos colectados de la evaluación final en la cámara climática - Piura	59

RESUMEN

Stevia rebaudiana B. (Asteracea) es una especie originaria de Paraguay, apreciada por el poder edulcorante de sus hojas que es 300 veces mayor que el de la sacarosa, contiene diversos esteviósidos y rebaudiósidos que no son metabolizados por nuestro organismo, portanto, no eleva el nivel de glucosa en sangre. Recientemente ha aumentado el interés en su propagación, no obstante, su semilla tiene un bajo porcentaje germinativo y las plantas presentan un pobre porcentaje de supervivencia. También se propaga vegetativamente por esquejes, pero no es suficiente para implementar sistemas de propagación masiva, es por estemotivo que el método más adecuado es la propagación *in vitro* ya que se puede obtener un mayor número de plantas en poco tiempo. El objetivo de esta investigación fue establecer cuál es el mejor ambiente para la aclimatación de plantas *in vitro* de *Stevia*. Los ambientes utilizados fueron un invernadero ubicado en la ciudad de Lima, y dos cámaras edafoclimáticas ubicadas en el Instituto de Biotecnología de la UNALM, donde se simularon las condiciones ambientales de la ciudad de Naju, ubicada en la provincia de Jeolla del Sur, Korea del Sur y la ciudad de Sullana, Piura. Se utilizaron 300 plantas *in vitro* provenientes del IBT por cada experimento y se evaluó el crecimiento de éstas y el porcentaje de supervivencia a los 30 días. Analizando los resultados obtenidos, es recomendable aclimatarestas plantas en una cámara climática configurada con el clima de Naju, aunque las plantas presentaran un menor crecimiento se logrará que la mayoría sobreviva al proceso. Por otro lado, las plantas aclimatadas en el ambiente de Piura crecen un poco más a comparación delos otros tratamientos, pero la supervivencia de plantas es menor debido a la mayortemperatura que posee esta zona.

Palabras clave: Invernadero, aclimatación, *Stevia rebaudiana*, edulcorante natural, cámaraclimática

ABSTRACT

Stevia rebaudiana B. (*Asteracea*) is a species native to Paraguay, appreciated for the sweetening power of its leaves, which is 300 times greater than that of sucrose, contains various steviosides and rebaudiosides that are not metabolized by our body, therefore, they are not raises the blood glucose level. Interest in its propagation has recently increased, however, its seed has a low germination percentage and the plants have a poor survival percentage. It is also propagated vegetatively by cuttings, but it is not enough to implement massive propagation systems, it is for this reason that the most appropriate method is in vitro propagation, since a greater number of plants can be obtained in a short time. The objective of this research was to establish the best environment for the acclimatization of *Stevia* plants in vitro. The environments used were a greenhouse located in the city of Lima, and two edaphoclimatic chambers located at the UNALM Institute of Biotechnology, where the environmental conditions of the city of Naju, located in the province of South Jeolla, South Korea, were simulated. Sur and the city of Sullana, Piura. 300 in vitro plants from the IBT were used for each experiment and their growth and the percentage of survival at 30 days were evaluated. Analyzing the results obtained, it is advisable to acclimatize these plants in a climatic chamber configured with the climate of Naju, even if the plants show less growth, most of them will survive the process. On the other hand, plants acclimatized to the Piura environment grow a little more compared to the other treatments, but plant survival is lower due to the higher temperature in this area.

Key words: Greenhouse, acclimatization, *Stevia rebaudiana*, natural sweetener, climatic chamber.

I INTRODUCCIÓN

“*Stevia rebaudiana* B.(Asteraceae) es una hierba perenne originaria del norte de Paraguay y Sudamérica que crece en climas tropicales y subtropicales” (Soejarto et al., 1983). Las hojas de stevia contienen glucósidos como los esteviósidos y los rebaudiósidos, que son 200 a 300 veces más dulces que la sacarosa o el azúcar de caña (Geuns, 2003). La producción de stevia es considerada como la más importante dentro de la producción de edulcorante natural, la pueden consumir diabéticos y cardiacos. Así mismo se le puede usar natural o industrialmente en la fabricación de golosinas, helados, jugos de fruta o bebidas gaseosas (Rodríguez, et al, 2007).

Los países productores son China y Paraguay con partes adyacentes de Brasil. China es el principal proveedor de Japón, que es el principal usuario y productor de derivados comerciales de esteviósidos (Midmore, 2019).

En ese sentido, China es el primer país en Asia que produce stevia, donde se concentra el 85% de los cultivos, con un área aproximada de 250 mil hectáreas (Choque, 2008).

La propagación convencional de la stevia está restringida por la baja viabilidad de sus semillas debido a la autoincompatibilidad, lo que provoca la producción de semillas estériles (Ramírez-Mosqueda, 2016).

Por tratarse de una planta de polinización cruzada (alógama), las plantaciones naturales presentan una alta variabilidad fenotípica (apariencia) y genotípica. Un alto rendimiento del edulcorante solo es posible si existe abundante material vegetal con alto porcentaje de edulcorante inherente en cada planta, por lo que dicha variabilidad afecta la cantidad de steviósido a extraerse.

La propagación vegetativa se limita a un número bajo de individuos que pueden obtenerse de una sola planta y adaptarse con éxito al suelo. Los métodos de propagación *in vitro* son una opción atractiva para propagar grandes cantidades de plantas en poco tiempo y con una calidad genética y fitosanitaria aceptable.

Esta información será útil para desarrollar un plan a nivel productivo con el fin de reducir el tiempo de cultivo, los costos de producción e incrementar el porcentaje supervivencia de plantas.

Objetivos de la investigación

1.1.1 General

Evaluar la aclimatación de plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. en tres ambientes controlados.

1.1.2 Específico

Evaluar el efecto de tres ambientes controlados sobre el crecimiento de plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.

II REVISIÓN DE LITERATURA

Descripción de la problemática

Según Eafit (2004), el mercado total de edulcorantes de alto poder y bajo contenido calórico, es equivalente a entre 12 a 15 millones de kg de esteviósido por año. La conquista de una pequeña fracción de este volumen, por el esteviósido, representaría cifras significativas.

Según Eafit (2004), el consumo internacional se concentra en la Unión Europea, EE.UU., China, Australia y especialmente Japón, que a pesar de tener fábricas para la extracción del esteviósido, es insuficiente para satisfacer su mercado interno. Se estima el consumo anual de esteviósidos en el Japón es de 50 Toneladas año con un valor aproximado de \$240 millones de dólares americanos y se sabe, que este país ha realizado algunas operaciones comerciales con vecinos de Colombia como Brasil y Paraguay.

Teniendo en cuenta que los productos edulcorantes que dominan el mercado mundial, especialmente en los países occidentales, cuentan con serios cuestionamientos por sus propiedades nocivas para la salud, las posibilidades del esteviósido como sustituto de los mismos son buenas, presentándose como su principal limitación el abastecimiento de materia prima en tan gran escala. Además, antes de entrar a competir en el mundo occidental industrializado, deberá pasar por todas las pruebas previas a su aprobación, especialmente las de la Food and Drug Administration de EE. UU (Eafit, 2004).

Dado la alta demanda potencial que tiene este cultivo, se necesitará en el futuro una producción masiva de la planta, la cual es aún inviable ya que la reproducción sexual de stevia presenta ciertos problemas que afectan la eficiencia del cultivo como son la alta heterogeneidad de las poblaciones resultantes de sus semillas, la baja eficiencia de la germinación debido al alto porcentaje de semillas estériles, además de la pequeñez de la semilla, la alta mortalidad de las plántulas en la germinación y a la limitada capacidad de sobrevivencia en ambientes de extrema humedad. Esta situación ha propiciado el uso de semilla vegetativa para la siembra de cultivos comerciales, la cual no está exenta de

problemas debido a las bajas tasas de multiplicación por estacas, también se menciona que cuando planta entra en floración, disminuye la posibilidad de enraizamiento; cuando existe un mal riego, provoca la desecación de las futuras plántulas y se corre el riesgo de presentar enfermedades fúngicas, lo que ha obligado a la utilización de técnicas de micropropagación para hacer más eficiente el proceso de multiplicación. (Jordán, 1983).

El mayor porcentaje de pérdidas de plantas producidas *in vitro* ocurren en su fase de transferencia al suelo cuando deben adaptarse a las nuevas condiciones del ambiente edáfico. Todo el esfuerzo investigativo se perdería si las plantas que se regeneran murieran cuando se intenta desarrollarlas en un ambiente que en un comienzo les resulta desfavorable. (Pierik, 1990). Se ha observado que el cultivo no presenta un método estándar y óptimo para su aclimatación comercial.

2.1.1 Importancia del cultivo

El consumo de alimentos y bebidas que contienen edulcorantes no calóricos ha aumentado significativamente en los últimos años, en Estados Unidos un 86 % de la población consume alimentos y bebidas bajos en azúcares (Yantis, 2011). Entre los edulcorantes no calóricos podemos mencionar a la sacarina, aspartame, sucralosa, acesulfame K, neotamo, alitamo y la recientemente incluida stevia.

Los compuestos responsables del dulzor de la stevia son los glucósidos de esteviol aislados e identificados como esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y F y dulcósido. Éstos se encuentran en las hojas de la planta en porcentajes variables (Tabla 1) en función de la especie, las condiciones de crecimiento y las técnicas agronómicas, llegando a alcanzar hasta el 15% de su composición (Gilabert y Encinas, 2014).

Tabla 1: Glucósidos dulces en las hojas de *S. rebaudiana*

Glucósidos	Contenido en % de las hojas en peso seco		
	Gardana et al. (2003)	Goyal et al. (2010)	Kinghorn y Soejarto (1985)
Esteviosido	5,8 ± 1,3	9,1	5-10
Rebaudiósido A	1,8 ± 0,2	3,8	2-4
Rebaudiósido B	1,3 ± 0,4	0,6	1-2
Dulcósido	N	0,3	0,4-0,7

Fuente: Gilabert y Encinas, 2014.

Los alimentos procesados contienen glucósidos de esteviol que son bajos en calorías, además su dulzor es de 100 a 300 veces mayor que el de la sacarosa (Lemus-Mondaca et al., 2012), mientras que el del rebaudiósido A es unas 50 a 250 veces superior. Estos glucósidos no pueden ser absorbidos en el tracto gastrointestinal, por lo que son hidrolizados principalmente por bacilos del grupo Bacteroides de la microbiota intestinal (Renwick y Tarka, 2008).

Los análisis en laboratorio demostraron que la stevia es extraordinariamente rica en hierro, magnesio y cobalto (Ibnu, 2014); no contiene cafeína y posee efectos antioxidantes con la presencia de antocianinas en 3-glucosidos (Carbonell-Capella et al., 2013).

El consumo de stevia es fundamental en personas que buscan perder peso, no solo porque ayuda a disminuir el consumo de calorías, sino porque reduce los antojos y la necesidad de estar comiendo dulces. Al tener un bajo contenido calórico, los esteviósidos pueden ser incluidos en el régimen alimentario de las personas que sufran de diabetes, obesidad mórbida o quiera reducir su masa corporal (Susuki, 1977).

El tallo y las ramas hasta hace poco tiempo se desechaban por no encontrar una utilidad práctica que viene a constituir el 60 % del volumen de la producción de cada cosecha. En estudios y experimentos realizados han dado muy buenos resultados como colorantes mejorados de bebidas, provocando el añejamiento rápido, beneficiándole suavidad y gusto agradable, elimina efectos nocivos del alcohol que produce dolor de cabeza y malestar, etc. (Molinas, 1989).

2.1.2 Justificación

Debido a la baja viabilidad de las semillas de stevia, alta heterogeneidad genotípica en las plantaciones y el lento proceso de propagación por esquejes, el establecimiento de un protocolo para la propagación *in vitro* es indispensable para obtener una producción comercial. La aclimatación es una etapa crítica del cultivo *in vitro*, donde se presenta el mayor porcentaje de mortandad de plantas, por lo que es necesario establecer cuál es el mejor ambiente para aclimatar estas plantas.

El desarrollo de un método adecuado para la aclimatación de stevia ayudará a la producción comercial de este cultivo y servirá como base para estudios posteriores.

El cultivo es de alto interés económico y puede ser considerado una alternativa agrícola para Perú debido a las condiciones favorables que ofrece su ubicación tanto para su producción como para su exportación. Según Hernández (2016) el rendimiento promedio de stevia por hectárea es de 2 a 3 toneladas y el precio puede variar entre 1 a 1.5 dólares por kilogramo de hoja seca. El precio del extracto puro en polvo está entre 50 a 80 dólares el kilogramo, teniendo en cuenta que se necesitan 10 kilogramos de hoja seca para obtener un kilogramo de extracto de steviósido. Según Osorio (2007) los rendimientos por hectárea de hoja seca de *Stevia* podrían llegar a un rendimiento de 3.000 Kg. /ha, y generar una ganancia bruta de \$1.800 a \$2.500.

2.1.3 Antecedentes

Cifuentes et al. (2003) utilizó un sistema de riego por nebulización bajo un régimen de riego de 20 segundos cada 5 minutos, de 8:00 am a 5:00 pm, por una semana aproximadamente, y luego pasó las plantas a un sistema de microtúneles, regando cada vez que el sustrato empezaba a secarse, este sistema resultó ser el mejor para el manejo de humedad para aclimatar plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana*. También sugiere utilizar bolsas plásticas, remojar las vitroplantas en una solución con una pequeña concentración de ANA (3 mg/L) por unas horas, antes de ser sembradas en cualquier sustrato, los cuales deben ser lo más sueltos posibles.

Oviedo (2015) realizó un experimento empleando biorreactores de inmersión temporal, los sistemas de inmersión temporal (SIT) basan su funcionamiento en el contacto del medio de cultivo con los explantes por intervalos de tiempos regulares, por medio del bombeo de aire limpio a través de un filtro. Este método permite que el exceso de líquido en los explantes se drene por gravedad al finalizar el bombeo y éstos se mantengan húmedos.

El empleo de sistemas de biorreactores de inmersión temporal es un proceso automatizado que provee condiciones de cultivo uniformes y controladas para la planta, se requiere de menos recipientes y se siembra una mayor cantidad de explantes por envase de cultivo que en los frascos usados en los sistemas semisólidos. Por lo que los SIT representan una alternativa que puede potenciar la generación de plantas más vigorosas, con incremento en el tamaño, mayor número de hojas y formación de raíz.

Vasquez-Baxcajay y Robledo (2014) encontraron que después de diez días de que las plantas regeneradas *in vitro* se transfirieran al invernadero, mostraron un cambio de coloración de las hojas, así como síntomas de deshidratación debido a la escasa funcionalidad del aparato estomático, lo que podría ocasionar deshidratación y su posterior muerte. Estos síntomas se redujeron considerablemente al colocar las plantas bajo la malla de sombra. El porcentaje de supervivencia de las plantas fue decreciendo con el tiempo de permanencia en el invernadero hasta llegar al 82 % para el día 60 lo cual es aceptable.

Sivaram y Mukundan (2003) reportaron una tasa de supervivencia del 70,0 % de microplantas de *S. rebaudiana* bajo condiciones de invernadero, mientras que Hwang (2006) encontró 98,4 % de supervivencia durante la aclimatación en campo. De la misma forma, Rueda (2006) reportaron que utilizar un sistema de microtúnel permitió la supervivencia de 82,7 % de las vitropiantas. En contraste, cuando se cubrieron las plantas con bolsas de plástico o se mantuvieron bajo un sistema nebulizado, la supervivencia fue de sólo 16,0 y 2,5 %, respectivamente.

Según Aguirre (2008), las plantas de stevia han sido sembradas en una amplia gama de suelos, con diferentes características fisicoquímicas (tanto arenosos como orgánicos) con porcentajes de supervivencia variables en esta fase de aclimatación. En este sentido, Cifuentes-Hidalgo (2003) alcanzó un promedio de 13% de supervivencia con un sustrato de 25% Premix y 75% Arena, mientras que Aguirre (2008) utilizó un sustrato compuesto por humus de lombriz, pomina y fibra de coco con una relación de 2:1:1, y la supervivencia alcanzó 96%. Por otra parte, Khan (2014) evaluó varias combinaciones de tierra, Promix y vermiculita, la mejor proporción utilizada fue 2:1:1 y alcanzó una supervivencia de 75%.

Gonzales-Hernández (2019) usó plántulas regeneradas con una altura entre 7-10 cm, con presencia de varias raíces y al menos cuatro pares de hojas, las cuales fueron transferidas a bandejas de polipropileno de 28 alveolos con sustrato compuesto por diferentes porcentajes de zeolita y compost de cachaza (25:75, 75:25, 50:50, 0:100, 100:0). Las bandejas se ubicaron casa de cultivo (temperatura promedio durante el día de 30 ± 2 °C, humedad relativa 70%, intensidad luminosa entre 224 y 457 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, frecuencia de riego de tres minutos de duración dos veces al día) en esta fase de aclimatación, donde permanecieron por 15 días. Obtuvo rendimientos superiores al 80%.

Es una ventaja que la especie en cuestión cuente con plasticidad para crecer en diferentes sustratos y mantenga, según los resultados alcanzados, altas tasas de supervivencia en medios diferentes. Esto permite transferir a las plantas hacia la fase de aclimatación, con independencia del sustrato. Es posible utilizar el sustrato más económico, o de mayor disponibilidad, indistintamente sin afectar la supervivencia y de acuerdo con las condiciones del lugar donde se ejecute (Espinal de Rueda, 2006).

Sobre el cultivo

2.1.4 Descripción de la planta

Stevia rebaudiana (Figura 1) pertenece a la familia Asteraceae es una planta herbácea perenne, tallo erecto, sub-leñoso, 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 (Monteiro, 1982).



Figura 1: Cultivo de stevia

Fuente: <https://www.123rf.com/>

La stevia tiene hojas (Figura 2) elípticas, ovals o lanceoladas, algo pubescentes; presentan disposición opuesta en sus estados juveniles, y alternas cuando las plantas llegan a su madurez fisiológica, previa a la floración (Monteiro, 1982).



Figura 2: Hojas de stevia

Fuente: <https://www.rocketrobin.ca/product/stevia-leaf-dried-leaf/>

La flor (Figura 3) es hermafrodita, pequeña y blanquecina; su corola es tubular, pentalobulada, en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas (Shock, 1982). La polinización es entomófila; se dice que la planta tiene autoincompatibilidad esporofítica. (Monteiro, 1982).



Figura 3: Flor de stevia

Fuente: <https://strictlymedicalseeds.com/product/stevia-stevia-rebaudiana-packet-of-25-seeds-organic/>

Se clasifica como una planta de día corto, situando el fotoperíodo crítico de 12 a 13 horas según el ecotipo.

2.1.5 Ubicación geográfica

En 1887, es descrita por primera vez, por el científico Antonio Bertoni. Los indios de la zona ya la utilizaron desde tiempos precolombinos, endulzando sus comidas y bebidas. Los indios guaraníes la llamaron “kaa- hee”, que significa “hierba dulce”. Existen más de 300 variedades de Stevia en la selva paraguayo-brasilera (Duke, 1993). La planta tiene el mismo centro de

origen que la Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*), con cierta concentración en el Noreste de Paraguay, en la zona de Caballero, Departamento de Amambay, en el límite con Brasil, donde llueven unos 800 mm. El clima en esa zona tiene características tropicales y los suelos son lateríticos (Duke, 1993).

Actualmente Japón, China, Bolivia, Brasil y Paraguay parecen ser los principales productores. Del Japón se ha distribuido a Corea, Taiwán, Tailandia, Indonesia, Laos, Malasia, China y Filipinas, de los cuales Japón es el país que más fábricas procesadoras y extractoras de steviósido posee, aproximadamente 25 establecimientos, no obstante, es insuficiente para satisfacer su mercado interno.

En Brasil, se cultiva básicamente por las plantaciones de Steviafarma Industrial S.A. ubicada en Maringa, Estado de Paraná; se ha convertido en el primer productor americano con 1,200 hectáreas sembradas (Rodríguez, 1998).

Actualmente en Paraguay se reportan la existencia de aproximadamente 7000 hectáreas de cultivos comerciales, distribuidos en los departamentos de Amambay, Concepción, Alto Paraná, Itapúa y Mirones, en este último, una cooperativa tabacalera, está desarrollando un proyecto, dentro del plan Citrus, para instalar un vivero cuya capacidad de producción sería un millón de plantines. La industria paraguaya de stevia está orientada solo a la producción de hojas secas de stevia, las cuales sirven como materia prima de las industrias de Brasil, China y otros países en menor escala. La producción anual de estas hojas es de aproximadamente 600 toneladas (Rodríguez, 1998).

Estudios realizados por el Instituto de Agronomía Nacional (IAN) de Paraguay, revelan que las hojas de stevia paraguaya tienen entre 8-14% de steviósido, en comparación con las hojas cosechadas en China que contienen 6.4% en promedio, concluyendo que las cosechas sudamericanas son de mayor calidad (Penner, 2004).

En Argentina se cultiva principalmente en Chaco (50 hectáreas de un solo productor), en Colonia Santa Rosa provincia de Salta (8 hectáreas), unas pocas hectáreas en Oberá Misiones, donde un grupo de productores llevan más de 10 años cultivándola, en San Antonio de Padua y en menor escala en Formosa (Santillán, 2002).

2.1.6 Área sembrada en Perú

Las plantaciones de stevia en el Perú tienen una duración de vida aproximadamente de 14 años por lo que la inversión en su producción es alta pues representa una de las mejores opciones en el mercado de la agronomía y cultivo, sobre todo por la creciente demanda de su consumo tanto en el interior del país como en el extranjero. Las empresas peruanas que empezaron con el cultivo son Stevia Coronel SAC, Stevia Perú SAC y Steviaperú, con instalaciones principalmente en la amazonía del norte del país (Delgado, 2007).

Las empresas que estudiaron el negocio de la stevia e invirtieron en él son: Stevia Biotech (de origen suizo, en 4000 Has) Stevia One (extranjera, en 10 mil Has) VKP Américas (extranjera, en 10 mil Has) un grupo económico de origen coreano (en 100 Has en Puno) y dos empresas peruanas (100 Has cada una en Tumbes). (Delgado, 2007).

El consumo de esta planta y sus derivados se concentra en Estados Unidos, China, Australia y principalmente en Japón.

Características agronómicas

La stevia, es una planta que cuenta con un ciclo de cultivo y producción que abarca aproximadamente ocho meses, se adapta bien a diferentes tipos de suelos, como por ejemplo a los del norte del país, en Ecuador y Colombia. La stevia se desarrolla muy bien en temperaturas mayores a los 24°C y con una buena intensidad de luz para potencializar el porcentaje de esteviósido (Zubaite, 2008). Esta planta se siembra generalmente por esquejes (porción del tallo que se enraíza), de los que se pueden empezar a ver resultados en dos semanas. Lo que se cosecha de la planta son las hojas, las cuáles deben tener un manejo totalmente orgánico (Cortés, 2012). La primera cosecha se inicia a los dos meses, logrando al año siete cosechas con una planta en producción por 5 o 6 años. (Zubaite, 2008). Es recomendable basarnos en el uso de un control biológico y alelopatía (repeler plagas con el uso plantas) para obtener óptimos resultados (Cortés, 2012).

Las técnicas para el cultivo comercial deben tratar de obtener mayor producción por unidad de superficie debiendo darse especial atención al suelo y a su composición, al trasplante en época adecuada, la densidad, la fertilización, el riego y las labores culturales. Esta planta presenta poca o moderada resistencia a la sequía, el agua es importante en el rendimiento final de la materia seca, por lo cual el riego, es importante para emprendimientos

empresariales que trabajen con este cultivo. La planta desde el momento de la plantación necesita de riego, éste debe de ser diario hasta que se inicie la brotación, luego cuando sea necesario y en cantidad suficiente, tampoco usar más agua de lo necesario, para esto se debe tener en cuenta la relación suelo-agua-planta (Molinas, 1989).

Según Cueva (2016), las nuevas técnicas de producción mejoran sustancialmente el rendimiento y la calidad de la hoja, en comparación a los sistemas tradicionales de producción no tecnificados. En altitudes menores a los 1000 m.s.n.m. los rendimientos alcanzan las 12 Tn/año considerando un distanciamiento de 0.20 m entre plantas y 0.40 m entre surcos, 8 cosechas al año y terrenos con buenas características edáficas. Se recomienda masificar el cultivo en zonas de selva y sierra en valles interandinos.

Según Osorio (2007), se cosecha regularmente durante todo el año y el rendimiento esperado es de 2000 a 3000 kilogramos de hoja seca por año. También señala que en Paraguay se puede llegar a un rendimiento de 3.000 kg/ha, y generar una ganancia bruta de \$1.800 por hectárea, aunque existen agricultores que producen considerablemente más que esto, alcanzando inclusive los 5.000 kg/ha por año. El cultivo puede ser cosechado de dos a cuatro veces por año.

2.1.7 Condiciones Edafoclimáticas

a) Altitud

El cultivo de la estevia es de ciclo corto y en países tropicales como Colombia, presenta un amplio rango de adaptación que va desde los 0 a los 2100 m.s.n.m.; sin embargo, se obtiene una mayor concentración de edulcorantes naturales entre los 500 y los 1100 m. de altitud (Tamayo, 2006).

b) Precipitación

La estevia en su estado natural, crece en la región subtropical, semi húmeda de América, con precipitaciones que oscilan entre 1400 a 1800 mm distribuidos durante todo el año (Landazuri y Tigrero, 2009).

c) Temperatura

Siendo la ideal entre los 18 a 34 °C resiste y prospera hasta los 43°C acompañado de precipitaciones frecuentes. Temperaturas entre los 5 y 15 °C no matan a la planta, pero inhiben o detienen su desarrollo foliar y temperaturas inferiores a éstas matan a la planta (Cortés, 2012).

d) Suelos

Se puede cultivar en suelos muy variados. En su estado original, la planta crece en suelos tanto de baja fertilidad, ácidos, de tipo arenoso como hasta orgánicos con alta humedad. Crece naturalmente en suelos de pH 4 - 5, pero crece bien entre 6,5 – 7,5 siempre que no sean salinos (Shock, 1982).

El cultivo de estevia es poco exigente, adaptándose a diferentes tipos de suelos, con texturas desde francos arenosos a franco arcillosos y con alta humedad, con pH entre 5.5 y 7.5 (Zubaite 2008). El ka´a he´e se puede cultivar en diversos tipos de suelos, en cuanto a la topografía la ideal es un terreno no muy accidentado, con un porcentaje de pendiente menor al 5%. Prospera muy bien en los suelos flojos, livianos, franco-arcillosos, areno-arcillosos o arcillo-arenosos, también soporta muy bien suelos ligeramente ácidos, con un pH que van de 5.5 a 6.5, que serían los niveles ideales (Gonzales et al. 2019).

Muchos elementos nutritivos, especialmente micro elementos pueden encontrarse en el suelo en forma no asimilable, debido a la dependencia de su solubilidad del pH del suelo. En estos casos las aplicaciones al suelo suelen ser muy poco efectivas, en tanto que se puede aprovechar la facilidad de absorción de pequeñas cantidades de estos elementos por las hojas, que pueden ser suficientes para corregir las diferencias (Domínguez, 1989).

Los fertilizantes son capaces de aumentar la producción, entre tanto para el agricultor no es suficiente que el fertilizante aumente la producción, es necesario que con la fertilización su ingreso aumente. En algunos casos las raíces de las plantas pierden la capacidad para absorber los nutrientes, al contrario, la parte aérea está adaptada para realizar fotosíntesis y nunca pierde la capacidad de absorber agua y nutrientes, siendo esta la capacidad básica para la fertilización foliar (De Lima, 1997).

De antiguo se conoce el efecto nutritivo sobre las plantas de las sustancias disueltas en el agua de lluvia por penetración a través de la hojas o absorción foliar fenómeno que ha sido comprobada hace una quincena de años por medio de los radio isotopos trazadores, poniéndose de manifiesto que las hojas no tiene la estructura impermeable que se creía, las cuales están capacitados para absorber sustancias minerales por el has y el envés (Domínguez, 1989).

2.1.8 Técnicas de propagación

EDAC (2009) en su manual técnico menciona que existen dos tipos de propagación, una propagación sexual y otra asexual. Estos dos tipos de propagación se mencionan a continuación:

a) Técnicas de propagación sexual

Los almácigos deben establecerse en una parcela que satisfaga los requisitos que se mencionan a continuación:

- Tener en cuenta que la semilla botánica tiene bajo porcentaje de germinación y longevidad corta.
- Que sea un lugar alto, para facilitar el drenaje del exceso de agua; sin árboles frondosos que puedan interferir con la exposición a la luz solar; próxima a la vivienda del dueño o encargado para facilitar el cuidado de las plántulas, con abundante agua limpia (manantial o pozo profundo) para el riego que se les deberá aplicar.
- Que ofrezca la posibilidad de construir los almácigos con una orientación de Este a Oeste, para un mejor aprovechamiento de la luz solar por las futuras plántulas.
- Que no se halle infestada de malezas de difícil erradicación.
- El suelo de las almacigueras deberá ser profundo (por lo menos 30 cm de profundidad), con pH 6 a 6,5, fértil, suelto, con buen drenaje interno (desagüe) y, en lo posible, con alto contenido de materia orgánica bien descompuesta.
- Se recomienda un área de 100 m² de almácigo para una producción de 100,000 plantones.

- La semilla debe presionarse suavemente en las camas de almácigo y regar frecuentemente por 7 días.
- Utilizar media sombra al 50 %, colocada sobre arcos, permaneciendo de 20 a 30 días después de la siembra.
- Realizar labores culturales oportunas.
- El repique se realiza a raíz desnuda o en bolsas de polietileno.

b) Técnicas de propagación asexual

Las camas de propagación deben establecerse en una parcela que satisfaga los requisitos que se mencionan a continuación:

- Usar plástico transparente de 120 a 150 micras de espesor colocados en la cama de propagación en forma de túnel.
- Utilizar esquejes terminales y sub terminales de 10 cm (3 – 4 nudos) antes que la planta madre haya emitido botones florales.
- La profundidad de siembra del esqueje no debe ser menor a 3 cm y no quitar las hojas ya que propician mejor enrizamiento.
- Humedecer previamente el sustrato a capacidad de campo, luego los esquejes son regados en forma abundante.
- Transcurridos los 20 días se procede a retirar en forma lenta los extremos del túnel (plástico) de manera que se disipe lentamente la humedad y los esquejes se adapten al medio ambiente normal.
- A los 60 días retirar la totalidad del plástico.
- Realizar las prácticas culturales convenientemente.

Propagación *in vitro*

El “cultivo de tejidos” involucra técnicas de producción clonal de órganos, tejidos, células y protoplastos vegetales en un medio nutritivo bajo condiciones asépticas y un ambiente controlado (Pierik, 1990).

Para realizar el establecimiento de los cultivos Mroginski (2010) menciona que es necesario tener en cuenta algunos aspectos generales relacionados con el explante, la asepsia, el medio de cultivo y las condiciones de incubación. El explante es un órgano, tejido o fragmento de tejido, células, etc. aislado del material vegetal (planta madre) para iniciar el cultivo *in vitro*. La elección del explante adecuado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, este varía de acuerdo al objetivo perseguido. En general los factores como el genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico son importantes a considerar (Mroginski, 2010).

Levitus (2010) refiere que uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos *in vitro* es la contaminación con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). Por otro lado, un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición de los cultivos. Existen numerosas formulaciones de los medios los cuales comprende entre 6 y 40 compuestos que incluyen fuente de carbono, minerales, vitaminas, sustancias reguladoras del crecimiento, agente gelificante (en el caso de medios semisólidos) y otros compuestos (Levitus et al. 2010).

De acuerdo a las recomendaciones de Roca (1991), la incubación de los cultivos se debe llevar a cabo en condiciones controladas: temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperíodo, humedad atmosférica e higiene, debido a que estos factores pueden alterar las respuestas morfogénicas. En general, los cultivos son incubados a temperatura de 25-28 °C, con fotoperíodo de luz/oscuridad de 16/8 horas. La luz es generalmente provista por lámparas fluorescentes del tipo «luz día» con una irradiancia de entre 50 y 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La humedad atmosférica debe ser elevada (80- 90%) (Levitus, 2010).

El cultivo de meristemas consiste en aislar el domo meristemático con dos primordios foliares y sembrarlo en un medio de cultivo adecuado que posibilite el desarrollo de una planta completa. Las plantas provenientes de este cultivo son idénticas a la planta madre y conserva sus características agronómicas, por tanto, estas son usadas para la

micropropagación, conservación de germoplasma y para la obtención de plantas libres de patógenos sistémicos, entre ellos los virus. Los meristemos son utilizados debido a que tiene poco o ningún virus por la elevada actividad metabólica (mitosis), presencia de sistema vascular poco diferenciado y altas concentraciones de auxinas endógenas (Espinal de Rueda, 2006).

La micropropagación es una técnica sofisticada para la rápida multiplicación de las plantas. Tiene un gran potencial comercial debido a la velocidad de propagación, la alta calidad de la planta y la capacidad de producir plantas libres de enfermedades. Este proceso permite reproducir *in vitro* cientos de clones de una misma especie e incluye varios pasos como cuidado de la planta, sección del explante y esterilización, formulación del medio para obtener proliferación, enraizamiento, aclimatación y crecimiento de las plántulas (Espinal de Rueda, 2006).

Según EDAC (2009), en los sistemas de micropropagación vegetal se conocen 5 etapas secuenciales:

Etapa 0. Selección y preparación de la planta madre

Etapa I. Establecimiento o iniciación del cultivo *in vitro*

Etapa II. Multiplicación e inducción de brotación

Etapa III. Pre-transplante o enraizamiento *in vitro*

Etapa IV. Transplante, aclimatación y/o enraizamiento *in vivo*

2.1.9 Transplante y aclimatación de plantas *in vitro*

El transplante de las vitroplantas del medio aséptico de cultivo al ambiente natural en el invernadero y luego a su sitio final involucra que deban pasar por un período de aclimatación para que puedan sobrevivir. Durante este período las plantas se ven obligadas a formar raíces y brotes funcionales para volverse autótrofas (Hartman y Kester, 1997).

El éxito de esta etapa radica en el cuidado que se tenga controlando la susceptibilidad de las vitroplantas a la deshidratación (Espinal-Rueda, 2002), ya que a pesar de que se tengan condiciones controladas de temperatura, luminosidad y humedad, se puede obtener pérdidas

muy cuantiosas (Borys et al., 1995). La duración de esta etapa depende principalmente de la rusticidad de las especies, pero en general es de 45 a 60 días aproximadamente (Hartman y Kester, 1997). Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*

S. rebaudiana es una planta que ha sido estudiada para su multiplicación por sistemas *in vitro*. En la Tabla 2, se muestra una síntesis de los trabajos sobre la micropropagación y aclimatación con *S. rebaudiana* en los últimos cinco años. De la revisión de los reportes destaca el uso del medio de cultivo Murashige & Skoog (1962), con el empleo de reguladores de crecimiento del tipo auxinas y citocininas. La organogénesis es la vía de propagación reportada en todos los casos, utilizando preferentemente como fuente de explante segmentos nodales, en su mayoría. El cultivo en medio semisólido es la condición de mayor uso, empleando para ello frascos tipo Gerber y tubos de ensayo como recipiente (Dumas, 2015).

También existen como alternativa a los frascos con medio sólido los sistemas de inmersión temporal (SIT) que basan su funcionamiento en el contacto del medio de cultivo con los explantes por intervalos de tiempos regulares, por medio del bombeo de aire limpio a través de un filtro. Este método permite que el exceso de líquido en los explantes se drene por gravedad al finalizar el bombeo y éstos se mantengan húmedos (Santos et al., 2011). Este tipo de sistemas reduce los costos de la propagación *in vitro* hasta en un 46% con respecto al medio semisólido. Además, es importante resaltar que el uso de este método reduce la mano de obra, al igual que el espacio, lo que facilita la propagación a gran escala, generando un aumento en la productividad y calidad del material propagado.

El cultivo de microestacas de *S. rebaudiana* en un sistema SIT con 10 minutos de inmersión cada 12 horas, regeneró plantas de vigor elevado, con mayor incremento en longitud, masa fresca y masa seca promedio y con baja hiperhidricidad, lo que favoreció la aclimatación (Santos, 2011).

2.1.10 Aclimatación

Aclimatación es el proceso en el cual un organismo individual se ajusta a un gradual cambio en su entorno (por ejemplo, un cambio en temperatura, humedad, fotoperiodo o pH), lo que le permite mantener el rendimiento en una amplia gama de condiciones ambientales. La Aclimatación se produce en un período corto de tiempo (días a semanas) y dentro de toda la vida del organismo. La aclimatación de vitroplantas consiste en el paso de condiciones “*in*

vitro”, a condiciones donde se desarrollarán para su cultivo, con el objetivo de que éstas superen las dificultades cuando son removidas del ambiente “*in vitro*”; de esta manera, se preparan para su trasplante definitivo. (Vilchez J. et al, 2007)

La aclimatación es la etapa final necesaria en todos los esquemas de micropropagación. Las plantas deben adaptarse a nuevas condiciones ambientales tales como, baja humedad relativa, alta intensidad de luz, fluctuaciones de temperatura y constante estrés de resistencia a enfermedades. La calidad intrínseca de las plántulas *in vitro* es uno de los más importantes factores que gobierna estos sucesos durante la transición a *ex vitro*. Son de ellos la excesiva pérdida de agua por transpiración y un debilitado aparato fotosintético los mayores problemas que se tiene que superar (Hwang, 2006).

Durante esta etapa se produce un retorno gradual al funcionamiento autotrófico de las vitroplantas, así como la recuperación de las características morfológicas y fisiológicas normales, asimismo en esta etapa las plántulas sufren un estrés provocado por al cambio de las condiciones de humedad y temperatura, por lo que la transferencia debe de realizarse de forma gradual (Suárez, 2008).

Según Hartmann y Kester (1997), durante la aclimatación son esenciales varias condiciones ambientales. Una de ellas es mantener la humedad relativa durante 2 a 3 semanas para proteger la planta de la desecación y permitir el crecimiento de raíces y brotes. Otro es el sustrato utilizado, el cual debe ser estéril y bien drenando, para que permita que las raíces se desarrollen con rapidez. Otro requerimiento es la protección contra diversos organismos patógenos empleando fungicidas preventivos, hasta que la planta logre resistencia. Todo ello implica que las plantas deben adaptarse, de una condición heterótrofa (en donde la fuente de carbono es agregada al medio de cultivo), a una nutrición autótrofa.

El éxito de la propagación *in vitro* radica en lograr la aclimatación de las vitroplantas a las condiciones ambientales. Durante esta etapa se produce un retorno gradual al funcionamiento autotrófico de las vitroplantas, así como la recuperación de las características morfológicas y fisiológicas normales, asimismo en esta etapa las plántulas sufren un estrés provocado por al cambio de las condiciones de humedad y temperatura, por lo que la transferencia debe de realizarse de forma gradual (Tamayo, 2006).

El fracaso en la aclimatación se debe a que las plántulas mueren por pérdida excesiva de agua o por el ataque de microorganismos. Por lo tanto, es de gran importancia desarrollar protocolos de aclimatación, con la finalidad de obtener un alto porcentaje de supervivencia a un bajo costo, pues una aclimatación por encima del 80% es considerada como aceptable (Hwang, 2006).

La temperatura adecuada para la aclimatación de Stevia y la mayoría de los cultivos en el invernadero está entre los 20 y 25° C; temperaturas mayores a estas causan daños por deshidratación. Así mismo, la humedad relativa no debe ser menor al 80% (Lyakhovkin, 1993).

Los resultados de Chotikadachanarong (2013) sobre aclimatación sugieren que altas concentraciones de NAA en el medio de enraizamiento redujeron la tasa de supervivencia de las plántulas durante la aclimatación, como lo hizo para muchas especies Al-Maarri (1994)

Gonzales-Hernández (2019) ubicó su experimento en una casa de cultivo que tenía una temperatura promedio durante el día de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa 80% e intensidad luminosa entre 224 y 457 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, logrando entre 80% y 85% de supervivencia en sus tratamientos.

En la etapa de aclimatación de *S. rebaudiana*, es posible utilizar los siguientes ambientes controlados:

a) Invernadero

Invernadero es toda aquella estructura cerrada, cubierta por materiales transparentes o de colores, dentro de la cual es posible obtener condiciones artificiales de microclima, y con ello cultivar plantas en condiciones óptimas y fuera de temporada.

Según el material de cobertura utilizado se pueden distinguir en rígidos (vidrio, policarbonato) o flexibles (polietileno, cloruro de polivinilo). En cuanto a la estructura de soporte, se puede utilizar madera, metal (acero, aluminio, etc.), hormigón, o una combinación de estos materiales (Hartmann y Kester, 1997). A continuación, se muestra en la figura 4 un ejemplo de cómo luce un invernadero destinado a la etapa de aclimatación de plantas *in vitro*.



Figura 4: Invernadero con túneles para aclimatación

Fuente: <https://www.cultesa.com/invernadero/>

Es muy común también la instalación de microtúneles (Figura 5) o cámaras plásticas dentro del invernadero, para favorecer aún más la retención de humedad en el ambiente en el que se desarrollarán las plantas.



Figura 5: Micro túnel

Fuente: <https://www.anja.com.tw/es/product-133800/Pel%C3%ADcula-de-efecto-invernadero-de-t%C3%BAnel-peque%C3%B1o-para-construir-un-invernadero>

La capacidad de obtener plantas aptas va en relación al manejo que se le brinde durante su periodo de adaptación, ello implica una serie de cuidados especiales como riego por nebulización, iluminación controlada, control de temperatura y tratamiento fitosanitario (Gil, 2017).

b) Cámara edafoclimática

Las cámaras edafoclimáticas, también llamadas cámaras de pruebas o fitotrones, cumplen las condiciones definidas para el control de estabilidad de distintos materiales. En una cámara climática es posible simular distintos valores de temperatura y humedad. La simulación de luz también puede ser relevante en ciertas pruebas (Cantero, 2014).

A grandes rasgos, las cámaras edafoclimáticas pueden dividirse en cámaras de clima constante y cámaras de clima variable. Las cámaras de clima constante se utilizan normalmente para pruebas de estabilidad a largo plazo y mantienen la temperatura y la humedad en un nivel definido. En las cámaras de clima variable pueden realizarse ciertos programas, en los que la temperatura y humedad cambian automáticamente en intervalos definidos. El tamaño de estas cámaras varía desde 5.000 litros de volumen interior, hasta 25.000 litros o incluso dimensiones a medida diseñados especialmente para la investigación en los campos de la biotecnología (Cantero, 2014).

Con el control total y la gran homogeneidad de las condiciones climáticas, estas cámaras pueden proporcionar temperatura, luz, humedad, presión, CO₂, e incluso simular el viento con el fin de reproducir todas las condiciones climáticas necesarias que la investigación puede requerir. Son fácilmente programables para diferentes simulaciones ambientales, se muestra a continuación un ejemplar de estos equipos (Figura 6).



Figura 6: Cámara edafoclimática Aralab

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

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal utilizado

Las plantas de *Stevia in vitro* utilizadas en este experimento provienen del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Localidades de evaluación

La presente investigación se desarrolló en tres ambientes diferentes:

3.1.1 Invernadero del IBT

Está ubicado dentro del campus de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), en el distrito de La Molina, provincia de Lima, departamento de Lima, a una altitud de 251 m.s.n.m, latitud sur 12°05'06'' y longitud oeste 76°59'07''. El experimento se desarrolló del 22 de junio al 22 de julio del 2019. De acuerdo a los datos meteorológicos obtenidos de acuerdo al observatorio meteorológico Alexander Von Humbolt ubicado dentro de la UNALM (Anexo 1), en esas fechas se registró una temperatura promedio de 16.7 °C y una humedad relativa de 78%. Dentro del túnel de aclimatación la temperatura estuvo en promedio 4°C más alta con referencia a los datos del observatorio y la humedad relativa estuvo siempre por encima de 85%.

3.1.2 Cámara edafoclimática-con simulación clima de Piura

Está ubicada dentro de las instalaciones del Instituto de Biotecnología de la UNALM, en el tercer piso del edificio. Estuvo configurada simulando en el mes de junio del 2019 del distrito de Lancones, provincia de Sullana, departamento de Piura, el cual está ubicado a una altitud de 133 m.s.n.m., latitud sur 4°38'34.36'' y longitud oeste 80°32'49.83'', estos datos fueron obtenidos de la web del Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI). El SENAMHI reporta una temperatura promedio de 26°C y una humedad -

relativa promedio de 75%, este experimento se desarrolló del 3 de setiembre al 2 de octubre del 2020.

3.1.3 Cámara edafoclimática-simulación clima de Naju

Ubicada al costado de la anterior cámara, estuvo configurada simulando el clima de la ciudad de Naju, Provincia de Jeolla del Sur en Korea del Sur. La ciudad está ubicada a una altitud de 158 m.s.n.m., latitud sur 35°01'42'' y longitud este 126°43'03''. Se tomó como referencia el mes de junio de 2019 al igual que en los otros experimentos. Los datos meteorológicos fueron obtenidos de la web: www.weather-kr.com, éstos reportan que la ciudad presenta un clima subtropical húmedo, con una temperatura promedio de 17.3 °C, una humedad relativa promedio de 91% y un fotoperiodo de 14.5 horas. Se escogió esta ciudad debido a que Hwang (2006) logró el 98.4% de supervivencia de plantas de stevia en su experimento en la Universidad Dongshin, además es el ambiente que posee una humedad relativa más alta y una menor temperatura, lo que posiblemente ayudará en la aclimatación de vitroplantas. Este experimento se desarrolló del 09 de setiembre al 08 de octubre del 2020.

Tipo de investigación

Por la naturaleza de la obtención de los datos, el trabajo es calificado de tipo experimental.

Formulación de la hipótesis

El porcentaje de supervivencia y crecimiento de plantas de *Stevia rebaudiana* al terminar la etapa de aclimatación, es mayor bajo el sistema de cámaras climáticas.

Diseño de la investigación

Debido a que los ambientes controlados están separados por espacio y tiempo, no es posible realizar un diseño experimental, pero para el análisis estadístico de los datos se trabajó como si fuera un diseño completamente al azar (DCA).

Los tres ambientes de aclimatación utilizados para este experimento vendrían a ser los tratamientos, cada tratamiento cuenta con 300 plantas, de las cuales se tomarán 50 plantas al azar para el registro de los datos de las variables. Esto nos da un total de 150 unidades experimentales, cada una con 6 repeticiones.

Las plantas fueron trasplantadas en bandejas de 200 celdas, por lo que se necesitaron dos bandejas por tratamiento (Tabla 2).

Tabla 2: Disposición de las unidades experimentales en las bandejas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A													○							
B					○	○													○	
C						○						○	○				○			○
D			○	○				○		○		○					○			
E									○				○						○	
F	○		○							○								○		○
G							○													
H		○																		
I			○								○		○	○				○		
J	○							○												○

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A																				
B						○														
C		○							○	○										
D			○		○				○											
E																				
F	○	○						○												
G					○					○										
H						○		○												
I											○									
J							○													

Tabla 3: Disposición de las unidades experimentales en los tratamientos

Tratamiento	Características climáticas	Unidad experimental
Invernadero Lima (bajo microtúneles)	Temperatura promedio: 20.4 °C Humedad promedio: 85%	Unidad experimental 1-50
Cámara edafoclimática-Naju (bajo microtúneles)	Temperatura promedio: 17.3 °C Humedad promedio: 91%	Unidad experimental 51-100
Cámara edafoclimática-Piura (bajo microtúneles)	Temperatura promedio: 26 °C Humedad promedio: 75%	Unidad experimental 101-150

Población y muestra

Población: 900 plantas de *Stevia rebaudiana*

Muestra: 150 unidades experimentales (1 planta = 1 U.E.)

Con las siguientes características:

N. ° de tratamientos: 03

N. ° de unidades experimentales o repeticiones por tratamiento: 50

N. ° de unidades experimentales: 150

VARIABLES EVALUADAS

Se tomaron datos de altura de plantas, número de hojas y porcentaje de supervivencia. Además, al concluir cada experimento se hizo una evaluación final tomando datos de longitud de raíz, número de raíces, peso fresco de tallo y raíces y peso seco de tallo y raíces.

3.1.4 Porcentaje de supervivencia

Fue medido contando el número de plantas que lograron continuar con su desarrollo, después del trasplante y siguieron creciendo saludables a lo largo del experimento, esta variable fue medida cada 10 días a partir del trasplante.

3.1.5 Altura de planta

Fue medida en centímetros cada 5 días con la ayuda de una regla, midiendo desde la base de la planta hasta el extremo distal de la hoja más joven de la planta.

3.1.6 Número de hojas

Fue evaluado contando el número de hojas vivas, esta medición se realizó al momento de medir la altura de planta.

3.1.7 Peso fresco y seco

Al finalizar cada experimento se eligieron 15 plantas al azar para realizar una evaluación más detallada, con la finalidad de encontrar más diferencias entre los tres tratamientos, dicha evaluación incluye el peso fresco y seco de tallo y raíz. Las plántulas escogidas fueron pesadas en una balanza, luego llevadas a una estufa a 60°C por 24 horas para finalmente pesarlas nuevamente para obtener el peso seco.

Procedimientos de análisis de datos

Para este experimento, como se detalla anteriormente no fue posible realizar un diseño experimental debido a la segmentación de los tratamientos por espacio y tiempo, pero los datos fueron analizados como si fuera un diseño completamente al azar (DCA) con el programa estadístico Minitab. Los datos se procesaron utilizando un análisis de varianza unidireccional (ANVA) seguido de la prueba de comparación de medias Duncan con un nivel de significancia del 5%, para identificar el mejor tratamiento.

Metodología

3.1.8 Selección de plantas

Para el establecimiento de los experimentos, se escogieron los frascos con plantas completas y bien conformadas, en cada frasco contiene 20 plantas (Figura 7), por lo que se seleccionaron 16 frascos (Figura 8).



Figura 7: Plantas *in vitro* dentro del frasco



Figura 8: Frascos con plantas *in vitro*

3.1.9 Preparación de las plantas para el trasplante

Las plantas fueron extraídas de los frascos, se les removió el medio de cultivo con agua corriente evitando que quede agar en las raíces luego se sumergieron en una solución con fungicida Benomyl al 0.1% (Figura 9), por 5 minutos.

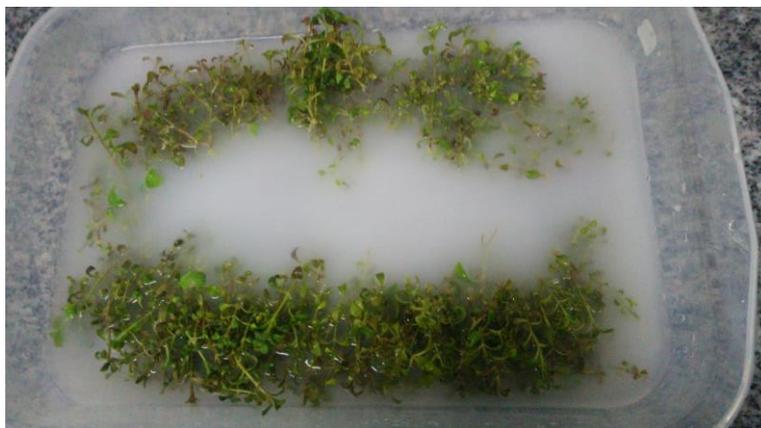


Figura 9: Plantas sumergidas en Benomyl al 0.1%

Luego del fungicida, se sumergieron las plantas en una solución con enraizante Root-Hor al 0.5% , para acelerar el proceso de formación de nuevas raíces en las plantas de Stevia que serán trasplantadas.

3.1.10 Preparación del sustrato

El sustrato utilizado para la aclimatación de estas plantas es una mezcla de sustrato comercial Premix #3 (Figura 10) y perlita (Figura 11), en proporción 3:1 respectivamente. El sustrato fue humedecido lo suficiente, además de asegurarse que esté bien compacto en las celdas de las bandejas. Se utilizaron 2 bandejas de 200 celdas cada una (Figura 12).



Figura 10: Sustrato Premix



Figura 11: Sustrato Perlita



Figura 11: Bandeja de 200 celdas

3.1.11 Trasplante

Las plantas fueron trasplantadas lo más rápido posible para evitar la deshidratación, tratando de fijar bien la planta al sustrato para que, al momento del riego, no se muevan las plantas (Figura 13). En el primer experimento que se realizó en el invernadero (Figura 14) dentro de las instalaciones de la UNALM, las dos bandejas con las plantas ya trasplantadas (Figura 15), se colocaron dentro de un micro túnel (Figura 16) para incrementar la humedad en el ambiente y evitar la deshidratación de las plantas. En el caso del segundo y tercer experimento con las cámaras climáticas, las bandejas fueron ubicadas dentro de un micro túnel hecho a medida para las dos bandejas y éste fue colocado dentro la cámara climática (Figuras 17, 18 y 19)



Figura 12: Trasplante de plantas



Figura 13: Invernadero del IBT



Figura 14: Bandejas con plantas trasplantadas



Figura 15: Micro túnel utilizado



Figura 16: Cámara edafoclimática del IBT



Figura 17: Bandejas dentro de la cámara.



Figura 18: Micro túnel dentro de la cámara climática

3.1.12 Seguimiento y toma de datos

El riego se realizó cada dos días en todos los experimentos. Se tomaron los datos cada cinco días, para obtener los datos de altura de planta, número de hojas y porcentaje de supervivencia. La altura de planta fue medida con la ayuda de una regla, midiendo desde la base de la planta hasta el extremo distal de la hoja más joven de la planta.

En la figura 20 se observa una planta con ataque de hongos (en invernadero), el cual es el principal problema del cultivo en esta fase de aclimatación. En las figuras 21, 22 y 23 se observan los experimentos en la tercera semana posterior a la instalación.



Figura 19: Planta de Stevia con ataque fúngico



Figura 20: Plantas de Stevia, invernadero UNALM

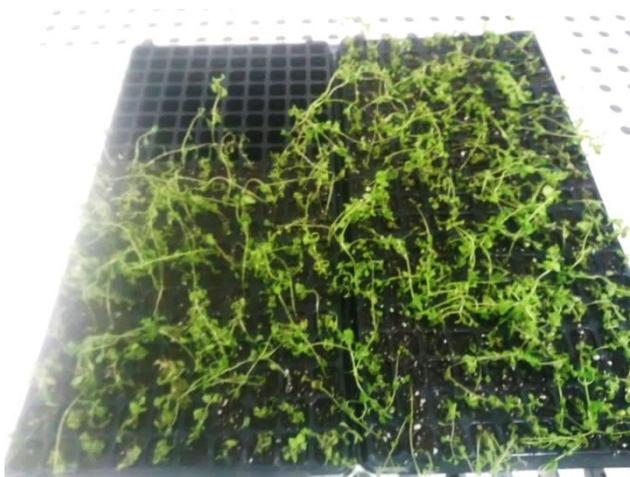


Figura 21: Plantas de stevia, cámara climática-Naju



Figura 22: Plantas de stevia, cámara climática-Piura

Al concluir cada experimento se seleccionaron aleatoriamente 15 plantas (Figura 24) para una evaluación final, primero se les retiró con ayuda de agua todo el sustrato al que sus raíces estaban sujetadas, luego se tomaron datos de longitud de tallo y raíz con ayuda de un vernier electrónico, número de hojas, peso fresco del tallo y la raíz con ayuda de una balanza de laboratorio (Figura 25). Luego de esto las plantas fueron envueltas en papel (Figura 26) para ser llevadas a una estufa a 60°C por 24 horas con el fin de obtener el peso seco del tallo la raíz.



Figura 23: Plantas seleccionadas para evaluación final

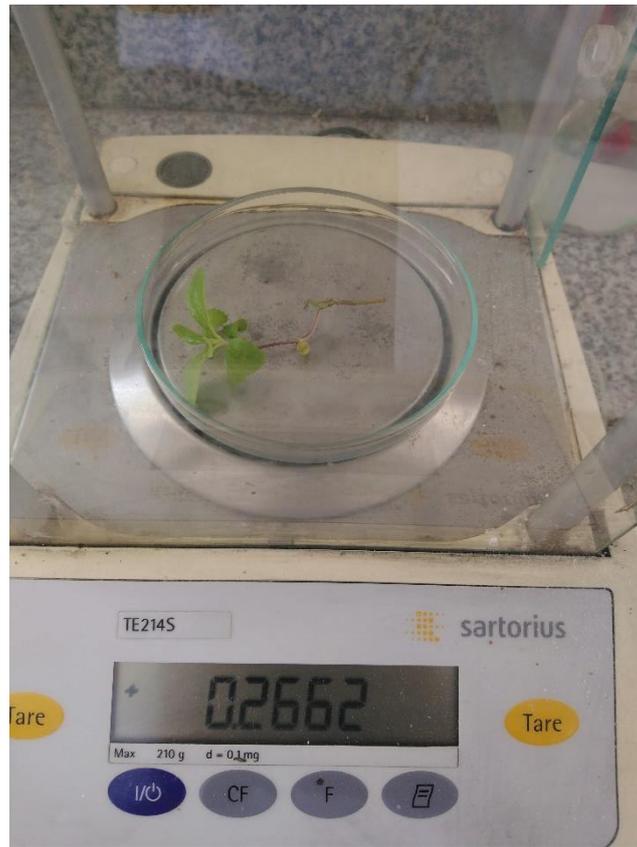


Figura 24: Balanza electrónica utilizada



Figura 25: Plantas envueltas en papel antes de ser llevadas a la estufa

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del ambiente sobre la supervivencia

En lo que respecta al porcentaje de supervivencia, se obtuvo un 92% en el ambiente de Naju, 87.66% en el invernadero en Lima y 83.33% en el ambiente de Piura (Figura 27). El mejor tratamiento en cuanto a la variable supervivencia de plantas es el ambiente de Naju.

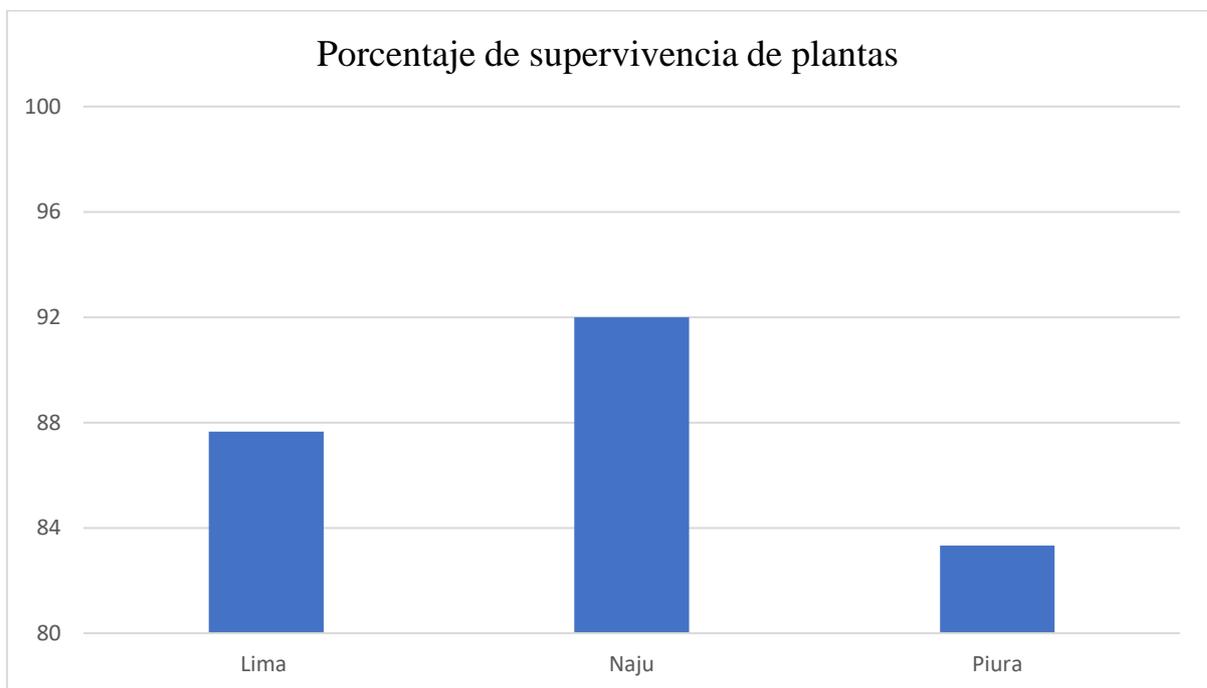


Figura 26: Comparación del porcentaje de supervivencia en los tres tratamientos

Efecto sobre la altura de planta

En lo que respecta a la variable altura de planta, debido a que las plantas evaluadas diferían en altura inicial, se procedió a evaluar la variable en estudio mediante el crecimiento obtenido al final del registro de los datos, se realizó el ANVA y mediante la prueba Duncan (Tabla 4) se puede apreciar que el crecimiento en lo que respecta a altura de planta fue menor en el tratamiento de Naju.

En el caso de los tratamientos de Piura y Lima la prueba los agrupa en un mismo nivel, es decir estadísticamente son iguales, ya que la prueba establece que las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 4: ANVA de altura de planta

Variable	N	Coef. Variación	
Altura de planta	150	19.46	
Análisis de varianza (ANVA)			
F.V	SC	gl	p-valor
Tratamiento	7.23	2	<0.00001
Error	10.47	147	
Total	17.71	149	
Test:Duncan			
<i>Error:</i>	<i>0.0712</i>	<i>gl:</i>	<i>147</i>
Tratamiento	Medias	Calificación	
Piura	1.55	A	
Lima	1.5	A	
Naju	1.02		B

Efecto sobre el número de hojas

En lo que respecta a la variable número de hojas, debido a que las plantas evaluadas diferían en el número de hojas inicial, se procedió a evaluar la variable en estudio mediante el incremento obtenido al final del registro de los datos, se realizó el ANVA y mediante la prueba Duncan (Tabla 5) se puede apreciar que el crecimiento en lo que respecta al número de hojas fue menor en el ambiente de Naju con seis hojas más en promedio.

Las plantas ubicadas en el ambiente de Piura obtuvieron en promedio nueve hojas más en el mes que duró el experimento, mientras que las plantas ubicadas en el ambiente de Lima solo obtuvieron 7.82 más hojas en promedio.

Tabla 5: ANVA de número de hojas

Variable	N	Coef. Variación	
Número de hojas	150	27.19	
Análisis de varianza (ANVA)			
F.V	SC	gl	p-valor
Tratamiento	227.61	2	<0.00001
Error	633.22	147	
Total	860.83	149	
Test:Duncan			
<i>Error:</i>	<i>4.3076</i>	<i>gl:</i>	<i>147</i>
Tratamiento	Medias	Calificación	
Piura	9.04	A	
Lima	7.82	B	
Naju	6.04	C	

Efecto sobre el peso fresco

Mediante la prueba Duncan (Tabla 6) se puede apreciar que existen diferencias significativas entre peso fresco final obtenido del tallo y las raíces, ya que en el ambiente de Piura se obtuvo el mejor resultado, seguido de Lima y finalmente Naju que es el ambiente con una menor temperatura.

Tabla 6: ANVA de peso fresco

Variable	N	Coef. Variación	
Peso fresco	45	16.82	
Análisis de varianza (ANVA)			
F.V	SC	gl	p-valor
Tratamiento	0.48	2	<0.00001
Error	0.17	42	
Total	0.65	44	
Test:Duncan			
<i>Error:</i>	<i>0.0041</i>	<i>gl:</i>	<i>42</i>
Tratamiento	Medias	Calificación	
Piura	0.52	A	
Lima	0.36	B	
Naju	0.27	C	

Efecto sobre el peso seco

Mediante la prueba Duncan (Tabla 7) se puede apreciar que existen diferencias significativas en todos los tratamientos en lo que respecta al peso seco final obtenido del tallo y las raíces. Piura es el ambiente que obtuvo el mejor resultado con diferencia.

Tabla 7: ANVA de peso seco

Variable	N	Coef. Variación	
Peso seco	45	10.15	
Análisis de varianza (ANVA)			
F.V	SC	gl	p-valor
Tratamiento	0.01	2	<0.00001
Error	0.0003	42	
Total	0.02	44	

Test:Duncan

Error:	0.0001	gl: 42
Tratamiento	Medias	Calificación
Piura	0.11	A
Lima	0.09	B
Naju	0.07	C

Se observó que a los 5 primeros días las plantas pierden en promedio 2 hojas y luego comienzan a generar hojas de una manera constante, esto de acuerdo a lo que Vazquez (2014) observó en su experimento. Según Cifuentes (2003) la pérdida de hojas es debido a que la planta se estresa y empieza a deshidratarse por el cambio de ambiente, entonces trata de eliminar sus hojas para tratar de disminuir su tasa de transpiración, este fenómeno también ocurrió en el experimento de Rueda (2006).

Según la prueba de Duncan, existen diferencias significativas en el incremento de altura de planta, número de hojas, peso fresco y seco, donde el ambiente de Naju siempre obtiene una calificación inferior y el ambiente de Piura está siempre por encima. Esto contrasta con la variable de porcentaje de supervivencia de plantas, donde el ambiente de Naju obtuvo un mejor resultado, esto puede explicarse debido a que este ambiente posee una menor temperatura y mayor humedad relativa, lo que evita la rápida deshidratación de las plantas, pero no favorece el crecimiento acelerado de biomasa.

Hwang (2006) quien realizó su investigación en la provincia de Naju, logró un 98% de supervivencia lo que es un resultado no muy lejano al obtenido en este experimento, lo que confirmaría esta hipótesis.

Sivaram y Mukundan (2003) reportaron una tasa de supervivencia del 70% de plantas de stevia provenientes de cultivo *in vitro* bajo condiciones de invernadero, lo que es menor a los resultados obtenidos en este experimento, ellos no utilizaron un sistema de microtúneles lo que pudo provocar que las plantas se deshidraten rápidamente.

Rueda (2006), quien utilizó el sistema de micro túneles en un invernadero que tenía una temperatura promedio de 25°C y 80% de humedad relativa obtuvo un 82.7% de supervivencia de plantas, lo cual es similar a los resultados obtenidos en el ambiente de Piura que posee una configuración climática similar.

Los resultados encontrados en el ambiente de Piura, son parecidos a los reportados por Gonzales-Hernández (2019), que en un ensayo realizado a una temperatura promedio de 30°C y humedad relativa de 80%, obtuvo niveles de supervivencia entre 80% y 85%.

Los resultados de esta investigación contrastan con los obtenidos por Cifuentes-Hidalgo (2003) que alcanzó un promedio de 13% de supervivencia, probablemente debido a que no utilizó el sistema de micro túneles en su experimento, por lo que sus plantas probablemente sufrieron una rápida deshidratación.

V CONCLUSIONES

El ambiente más efectivo en cuanto a la variable supervivencia de plantas en la aclimatación de *Stevia rebaudiana* B proveniente del cultivo *in vitro* es la cámara climática que simula el clima de la provincia de Naju en Korea del Sur,

Las plantas crecieron un poco más a comparación de los otros tratamientos en el ambiente de Piura, esto debido a la mayor temperatura a la que estuvieron expuestas las plantas, aunque se tuvo la menor supervivencia de plantas.

Los tres tratamientos lograron un porcentaje de supervivencia mayor al 80%, lo que significa una aclimatación exitosa. Esto es debido a la alta humedad relativa dentro de los microtúneles instalados en cada experimento, que evita la rápida deshidratación de las plantas.

VI RECOMENDACIONES

Utilizar un sistema de riego por nebulización dentro de los microtúneles, evaluando diferentes regímenes de riego.

Para la aclimatación cámara edafoclimática es indispensable instalar un microtúnel dentro la cámara para mantener una alta humedad relativa en ese micro-ambiente.

Se debe probar el efecto de la luminosidad en la aclimatación de las plantas.

Realizar otra investigación evaluando sustratos constituidos de suelo, turba, cascarilla de arroz, arena u otro tipo de abono orgánico con diferentes características en distintas proporciones para lograr una mejor adaptación de las plantas y a la vez disminuir los costos de la aclimatación.

Con las ventajas que ofrecen las cámaras edafoclimáticas es recomendable instalar nuevos experimentos con simulaciones de climas diferentes hasta encontrar una adecuada relación entre supervivencia de plantas y crecimiento.

Realizar evaluaciones incrementando la frecuencia y duración del riego.

VII BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Dávila, C. (2008). Evaluación de un sistema de producción *in vitro* y en invernadero de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. (Tesis inédita de Licenciatura) Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Al-Maarri, K.; Y. Arnaud, X.; Miginiac, E. (1994). Micropropagación de cultivares *Pyrus communis* passe crassane plántulas y cultivar Williams: factores que afectan la formación de raíces *in vitro* y *ex vitro*, *Sci. Hortic*, 58, 207-214.
- Anton, S.; Martin, C.; Han, H.; Coulon, S.; Cefalu, W.; Geiselman, P. (2010). Effects of Stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite* 55, 37–43.
- Borys, S. J.; Leszczyńska, H. (1995) Relaciones raíz/bulbo y otras características de la *Sprekelia* (*Sprekelia formosissima* (L.) Herbert.). *Rev. Chapingo S. Hort.* 1, 77–84.
- Cantero, E. (2014). Influencia hormonal en el uso eficiente del agua y en respuesta el estrés hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Recuperado de: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/134936/TECN.pdf?sequence=1>
- Carbonell-Capella, J.; Barba, F.; Esteve, M.; Frígola, A. (2013). High pressure processing of fruit juice mixture sweetened with *Stevia rebaudiana* Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 18, 48-56.
- Choque, T. (2018). Plan de negocios basado en el modelo canvas para la factibilidad de la producción y comercialización de derivados a base de stevia en Arequipa.
- Chotikadachanarong, K.; Dheeranupattana, S. (2013). Micropropagation and Acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 16. 887-90. 10.3923/pjbs.2013.887.890.

- Cifuentes-Hidalgo, E. (2003) Enraizamiento *in vitro* y aclimatación de *Stevia rebaudiana* B. Tesis de Licenciatura, Zamorano, Zamorano, Honduras.
- Cortés Cortés, J. (2012). Análisis de crecimiento del cultivo de stevia (*Stevia rebaudiana* B.) con proyección agroindustrial en el Valle del Cauca. Tesis bachiller Santiago de Cali – Colombia. Universidad de San Buenaventura Cali. (pp. 32-35).
- Cueva, V. (2016). Estudio de rentabilidad del cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) en Trujillo, La Libertad.
- De Lima, O.; Malavolta, E. (1997). Absorção e acumulação de nutrientes em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: I. Macronutrientes. Sci. Agric. 54(1-2):23-30
- Delgado, D (2007). Estudio de pre-factibilidad para la industrialización y comercialización de la stevia. Tesis inédita de licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.
- Domínguez, V. A. (1989). Tratado de Fertilización. Segunda Edición. Madrid-España. (pp. 42-48).
- Duke, J (1993). *Stevia rebaudiana*. Handbook of alternative cash crops. (pp. 422-424). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Dumas, P.; Evangelista, S. (2015). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un Cultivo Promisorio para México.
- Eafit, D. (2004). Escuela de Administración y Finanzas. Inteligencia de mercados internacionales de *Stevia rebaudiana*. Departamento de Negocios Internacionales, Medellín, Colombia.
- Equipo de Desarrollo Agropecuario Cajamarca - EDAC (2008). Manual técnico de producción de stevia.
- Espinal de Rueda, D.; Del Valle, W.; Cifuentes, E. (2006). Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. Ceiba 47(1-2): 11-18.
- Gattoni, L. A. (1945). Caa-Jhee A wild shrub native to Paraguay (*Stevia rebaudiana* Bert.) September. Typed Material. STICA, Paraguay.

- Geuns, J. (2003). Stevioside phytochemistry. 64, 913-21.
- Gil, A.; López, S. (2017). Aclimatación de plántulas *in vitro* de *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (Gesneriaceae) “violeta africana” en condiciones de invernadero.
- Gilabert, J.; Encinas, T. (2014). De la stevia al E-960: un dulce camino. Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. Reduca (Recursos Educativos). Serie Congresos Alumnos 6, 305-311.
- Gonzales-Hernández, F. (2019). Micropropagación de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de explantes ex vitro.
- Hartmann, H. T.; Kester, D.; Davies, P. T.; Geneve, L. (1997). Plant propagation: principles and practices, 6th edition. Uper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall.
- Hernández, J. L.; Combatt, E. M.; Jarma O. A.; Polo, S. J. (2016). Rendimiento y calidad de hojas de *Stevia rebaudiana* bajo la oferta edafológica y dos niveles de radiación en cinco regiones de Colombia.
- Hwang, S.J. (2006). Rapid *in vitro* propagation and enhanced stevioside accumulation in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J. Plant Biol.* 49, 267–270. <https://doi.org/10.1007/BF03031153>
- Ibnu, E.; Bin, A.; Mimi, A. (2014). Evaluación de la tolerancia a los metales pesados en hojas, tallos y flores de la *Stevia rebaudiana* Planta. *Ciencias Ambientales* 20, 386-393.
- Jeppesen, P.; Gregersen, S.; Rolfsen, S.; Jepsen, M.; Colombo, M.; Agger, A. (2003). Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism*, 52, 372–378.
- Jordán, F. (1983). “La propagación de Ka´a he´e. *Stevia rebaudiana* Bertoni”. Primer Simposio Nacional de la Stevia (ka´a he´e). Asunción, Paraguay.
- Khan, M. K.; Misra, P.; Sharma, T.; Shukla, P. K.; Ramteke, P. W. (2014) Effect of adenine sulphate on *in vitro* mass propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni.

- Kittisak, Chotikadachanarong; Srisuluk, Dheeranupattana (2013). Micropropagación y aclimatación de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Pakistan Journal of Biological Sciences, 16, 887-890.
- Landazuri, P.; Tigrero, J. (2009). *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Boletín Técnico Edición Especial. Escuela Politécnica Del Ejército Departamento De Ciencias De La Vida Carrera De Ingeniería En Ciencias Agropecuarias (IASA I). Sangolquí – Ecuador. (pp. 2, 3, 20).
- Lemus-Mondaca, R.; Vega-Gálvez, A.; Zura-Bravo, L.; Ah-Hen K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry 132, 1121–1132.
- Lyakhovkin, A. G.; Tran, D. L.; Titov, D. A.; Mai, P. A. 1993. Cultivation and utilization of Stevia. Agricultural Publishing House. (Vietnam). 5 – 43 p.
- Martínez, D. (2016) Estrategia para la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Medellín, Colombia.
- Midmore, D. (2019) A report for the Rural Industries Research and Development Corporation.
- Monteiro, R. (1982). Taxonomía e biología da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. I Seminario Brasileiro sobre *Stevia rebaudiana* Bertoni. IV 1. Resumos ITAL Campinas 9/82. Instituto de Tecnología de Alimentos, Sao Paulo. Pagliosa
- Molinas, S. (1989). Fortuna Stevia del Paraguay S.R.L. Promoción, cultivo, industrialización y comercialización de la *Stevia rebaudiana* Bertoni (Ka´a he´e). Asunción, Paraguay. (pp. 22-24).
- Mroginski, L.; Sansberro, P.; Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Buenos Aires, Argentina. (pp. 17-25).

- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, 15(3), 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Osorio C. (2007). Plan estratégico Stevia.
- Oviedo-Pereira, D.; Alvarenga, S. (2015). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un Cultivo Promisorio para México
- Penner, R. (2004). Stevia from Paraguay. Asunción, Paraguay. United States Agency for International Development.
- Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Trad. L. Eyerbe. 3 ed. Madrid, España, Mundi – Prensa (pp. 312-325).
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT[®], BIG, and RITA[®]) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 52, 154–160. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>
- Renwick, A.; Tarka, S. (2008). Microbial hydrolysis of steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology* 46: 70–74.
- Rodríguez P. (1998). Yerba dulce (*Stevia rebaudiana* B.). Técnicas de producción. Secretaria de la producción de Salta Argentina. Pág. 14
- Santillán Rojas, G. J. (2002). Perspectivas de producción del cultivo de la yerba dulce (*Stevia rebaudiana* B.) en la provincia de Rodríguez de Mendoza, Lima. Universidad Agraria La Molina.
- Santos, A.; Cabrera, M.; Gómez-Kosky, R., Beovides, Y. (2011). Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga “Viequera” (*Xanthosoma* spp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 97-106. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4808854>
- Shock Clinton, C. (1982). Experimental Cultivation of Rebaudi's Stevia in California. *Agronomy Prog* No. 122. Univ, of California, Davis.

- Sivaram, L. and Mukundan, U. (2003) *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 39, 520-523. doi:10.1079/IVP2003438
- Soejarto, D. D.; Compadre, C.M.; Medon, P.J. (1983) Potential sweetening agents of plant origin, field search for sweet-tasting *Stevia rebaudiana* B. species. *Economic Botany*, 37, 71–79. Recuperado de: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjtl aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2299808](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjtl aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2299808)
- Suárez, E. I.; Salgado, A. J. (2008). Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni a través de organogénesis. *Revista Temas Agrarios* 13(1), 40-48.
- Susuki, H.; Kasai, T.; Sumihara, M. (1977). Effects of oral administration of stevioside on level of blood glucose and liver glycogen of intact rats. *Nippon Nogei Kagaku kaishi* 51: 171–173.
- Tamayo-Vélez, A. (2006). Tecnología para el cultivo de la estevia. Manual técnico 7. CORPOICA. Centro de Investigación La Selva. Rio Negro, Antioquia, Colombia. (pp. 112-116).
- Vasquez-Baxcajay, L.; Robledo, A. (2014). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y detección de esteviósidos.
- Vilchez, J. (2007). Aclimatización de vitroplantas de zábila (*Aloe vera* (L.) Burm. f): efectos del sustrato1 *Rev. Fav. Agron.* 24 Supl. 1: 57-61. Disponible en: http://revfacagronluz.org.ve/PDF/supl_mayo_2007/v24supl10.pdf
- Yantis, M. (2011). Refrescos bajos en calorías. *Nursing* 29(3): 52.
- Zubaite, F. (2008) Manual del cultivo de la stevia (Hierba Dulce). Universidad Agraria La Molina, Lima. Recuperado de: www.lamolina.edu.pe.

VIII ANEXOS

Anexo 1: Datos colectados de altura de planta en Lima

Código	17-Jun	22-Jun	27-Jun	2-Jul	7-Jul	14-Jul	19-Jul
U1	5.8	5.9	6.5	6.9	7.4	7.8	8.3
U2	1.9	2	2.2	2.6	2.9	3.5	3.9
U3	4.3	4.4	4.4	4.7	5	5.3	5.5
U4	5.1	5.2	5.3	5.5	5.7	5.8	5.9
U5	2.2	2.3	2.3	2.5	2.9	3.2	3.5
U6	2.7	2.8	2.9	3.2	3.6	3.8	3.9
U7	4.8	5	5.2	5.4	5.6	5.8	6
U8	0.1	0.2	0.2	0.3	0.5	0.8	1.1
U9	4	4.1	4.2	4.5	5.1	5.5	5.9
U10	3.4	3.5	3.9	4.2	4.5	4.8	4.9
U11	2.7	2.9	3.3	3.7	4.2	4.6	4.5
U12	2.4	2.5	2.6	2.8	3	3.2	3.3
U13	1.4	1.5	1.6	2	2.2	2.6	3.1
U14	1.7	1.8	2.1	2.3	2.6	2.9	3.6
U15	1.2	1.3	1.7	2	2.3	2.6	2.8
U16	2.5	2.6	2.9	3.4	3.8	4.6	5.3
U17	1.6	1.7	2	2.3	2.6	2.9	3.2
U18	1.9	2	2.3	2.6	2.9	3.2	3.4
U19	2.5	2.6	2.9	3.3	3.7	4.2	4.8
U20	0.4	0.5	0.7	1	1.4	1.7	2.1
U21	6	6.1	6.2	6.4	6.6	6.9	7.2
U22	2.9	3	3.4	3.7	4	4.3	4.8
U23	0.7	0.8	0.9	1.2	1.5	1.8	2.3
U24	1.3	1.4	1.7	2	2.4	2.8	3.3
U25	2.2	2.3	2.3	2.4	2.6	2.8	3
U26	1.7	1.8	2.1	2.4	2.7	3	3.3
U27	2.9	3	3.3	3.7	3.9	4.2	4.7
U28	2.8	2.9	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4
U29	2.7	2.8	3.1	3.4	3.7	4	4.3
U30	0.2	0.2	0.3	0.6	0.9	1.2	1.4
U31	3.9	4	4.3	4.6	4.9	5.2	5.7
U32	3.8	3.9	4	4.1	4.2	4.4	4.6

U33	1.3	1.5	1.6	1.9	2.4	2.7	3.1
U34	1.2	1.3	1.5	1.9	2.1	2.6	3
U35	0.5	0.6	0.7	1	1.5	1.9	2.3
U36	3.4	3.5	3.6	3.8	4	4.3	4.6
U37	1.6	1.8	2.2	2.7	2.9	3.2	3.6
U38	0.3	0.4	0.5	0.8	1.2	1.4	1.9
U39	4.8	4.9	4.9	5	5.1	5.2	5.3
U40	5.3	5.4	5.5	5.6	5.6	5.7	5.8
U41	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.6	3.6
U42	1.6	1.7	1.8	2	2.2	2.4	2.6
U43	4.3	4.4	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8
U44	5.7	5.8	6.1	6.4	6.7	7.2	7.7
U45	2.4	2.5	3	3.5	4.1	4.7	5.6
U46	1.6	1.6	1.9	2.4	2.6	3.1	3.6
U47	2.4	2.5	2.8	3.1	3.4	3.7	4.1
U48	1.4	1.5	1.8	2	2	2.2	2.6
U49	1.3	1.4	1.7	2	2.2	2.3	2.5
U50	4.5	4.6	4.7	4.8	4.8	4.9	4.9

Anexo 2: Datos colectados de altura de planta en la cámara climática – Najua

Código	9-Set	14-Set	19-Set	24-Set	29-Set	3-Oct	8-Oct
U51	3.1	3.2	3.3	3.6	3.8	3.9	4.2
U52	2.4	2.4	2.6	2.8	3	3.2	3.4
U53	5.4	5.5	5.6	5.9	6.1	6.3	6.5
U54	6.1	6.2	6.4	6.6	6.8	7	7.2
U55	2.9	2.9	3.1	3.3	3.5	3.7	3.9
U56	8.7	8.7	8.8	9.1	9.3	9.5	9.7
U57	7.1	7.3	7.5	7.7	7.9	8.1	8.3
U58	8.6	8.6	8.7	8.8	8.9	9	9.1
U59	3.5	3.5	3.7	3.9	4.1	4.3	4.5
U60	5.5	5.7	5.8	6.1	6.3	6.5	6.7
U61	6.6	6.6	6.8	7	7.2	7.4	7.6
U62	5.7	5.8	5.9	6.1	6.2	6.4	6.5
U63	2.9	2.9	3.1	3.3	3.5	3.7	3.9
U64	1.6	1.6	1.8	2	2.2	2.4	2.6
U65	8.2	8.5	8.7	8.9	9.1	9.3	9.5
U66	7.5	7.7	7.9	8.1	8.3	8.5	8.7
U67	1.2	1.2	1.4	1.6	1.8	2	2.2
U68	6.7	7	7.2	7.4	7.6	7.8	8.2
U69	6.4	6.5	6.7	6.9	7.1	7.3	7.5
U70	1.1	1.3	1.5	1.7	1.9	2.1	2.3
U71	4.5	4.5	4.7	4.9	5.1	5.3	5.5

U72	7.9	7.9	8.1	8.3	8.5	8.7	8.9
U73	3.2	3.3	3.5	3.7	3.9	4.1	4.3
U74	8.2	8.3	8.5	8.7	8.9	9.1	9.3
U75	3.4	3.4	3.6	3.8	4	4.2	4.4
U76	1.8	1.8	2	2.2	2.4	2.6	2.8
U77	3.4	3.5	3.7	3.9	4.1	4.3	4.5
U78	5.5	5.7	5.9	6.1	6.3	6.5	6.9
U79	5.1	5.2	5.4	5.6	5.8	6	6.2
U80	2.3	2.3	2.5	2.7	2.9	3.1	3.3
U81	5.6	5.6	5.8	6	6.2	6.4	6.6
U82	2.1	2.2	2.4	2.6	2.8	3	3.3
U83	8.1	8.1	8.3	8.5	8.7	8.9	9.1
U84	2.2	2.2	2.4	2.6	2.8	3	3.3
U85	6.5	6.5	6.7	6.9	7.1	7.3	7.6
U86	5.3	5.3	5.5	5.7	5.9	6.1	6.3
U87	1.9	1.9	2.1	2.3	2.4	2.7	2.9
U88	7.6	7.6	7.7	7.8	7.9	7.9	8.3
U89	3.2	3.3	3.5	3.7	3.9	4.1	4.5
U90	3.3	3.4	3.6	3.8	4	4.2	4.4
U91	1.9	2.2	2.4	2.6	2.8	3	3.2
U92	6.6	6.7	6.9	7.1	7.3	7.5	7.7
U93	8.4	8.7	8.9	9.1	9.3	9.5	9.7
U94	7.7	7.8	7.8	7.9	7.9	8	8
U95	4.5	4.5	4.6	4.9	5.1	5.3	5.5
U96	6.7	6.7	6.8	6.8	6.9	7	7.1
U97	1.8	1.8	1.8	1.9	1.9	2	2.4
U98	4.6	4.6	4.8	4.9	5	5.1	5.3
U99	5.1	5.2	5.4	5.6	5.8	6	6.2
U100	4.8	4.9	5	5.1	5.2	5.2	5.5

Anexo 3: Datos colectados de altura de planta en la cámara climática - Piura

Código	3-Set	8-Set	13-Set	18-Set	23-Set	28-Set	3-Oct
U101	3.2	3.3	3.5	3.8	4.1	4.2	4.3
U102	2.5	2.6	2.8	3.1	3.4	3.7	3.9
U103	3.3	3.4	3.6	3.9	4.2	4.5	4.8
U104	1.6	1.6	1.7	1.7	1.9	2	2.2
U105	7.9	8.1	8.3	8.4	8.5	8.6	8.9
U106	1.2	1.2	1.3	1.4	1.6	1.7	1.8
U107	6.8	7	7.2	7.4	7.7	7.9	8.1
U108	4.5	4.8	5	5.3	5.8	6.2	6.7
U109	0.5	0.5	0.6	0.9	1.2	1.7	2.1
U110	2.9	3	3.1	3.3	3.5	3.8	4.1
U111	3.8	4	4.4	4.6	4.8	5.1	5.5

U112	5.5	5.6	5.8	6.2	6.6	6.9	7.2
U113	0.9	1.2	1.5	2	2.6	3	3.5
U114	10	10.2	10.5	10.9	11.3	11.8	12.3
U115	7	7.2	7.5	7.8	8.2	8.6	9.1
U116	1.5	1.5	1.6	1.7	1.7	1.8	1.9
U117	7.5	7.7	8.1	8.6	9	9.3	9.5
U118	6	6.2	6.5	6.8	7.2	7.6	8.2
U119	5.6	5.8	6.1	6.4	6.8	7.3	7.9
U120	5.5	5.7	6.1	6.4	6.7	7	7.3
U121	6.6	6.8	7	7.3	7.6	8	8.5
U122	7	7	7.1	7.3	7.5	7.9	8.6
U123	6.1	6.2	6.5	6.9	7.3	7.8	8.5
U124	8	8	8.2	8.3	8.5	8.9	9.4
U125	4.7	4.7	4.7	4.8	4.9	5	5.2
U126	2.4	2.4	2.5	2.7	2.9	3	3.3
U127	2.4	2.4	2.5	2.5	2.6	2.6	2.7
U128	2	2.2	2.5	2.8	3.2	3.6	4.1
U129	3.5	3.7	4	4.4	4.8	5.2	5.5
U130	1.8	1.8	1.9	2.1	2.2	2.6	3.1
U131	5	5	5.2	5.5	5.9	6.1	6.5
U132	2.4	2.4	2.5	2.6	2.7	2.7	2.9
U133	4.3	4.3	4.4	4.6	4.8	5.1	5.7
U134	8.8	9	9.1	9.2	9.4	9.7	10.1
U135	7.7	7.8	8	8.1	8.3	8.7	9.2
U136	7.7	7.9	8.2	8.5	8.7	9.2	9.7
U137	2.5	2.7	2.9	3.2	3.4	3.7	4.1
U138	5.2	5.3	5.4	5.6	5.7	5.9	6.1
U139	7.4	7.5	7.5	7.7	7.9	8.2	8.5
U140	1	1.1	1.3	1.6	1.8	2.1	2.5
U141	4.5	4.6	4.9	5.3	5.5	6	6.6
U142	4	4.3	4.8	5.5	6	6.5	7.2
U143	4.5	4.6	4.9	5.4	5.8	6.2	6.6
U144	6.9	7	7.2	7.5	7.8	8.1	8.5
U145	5.7	5.7	5.8	6	6.3	6.7	7.3
U146	3.3	3.4	3.4	3.5	3.6	3.8	4.1
U147	6.3	6.5	6.9	7.5	8	8.5	9
U148	5.4	5.4	5.4	5.6	5.8	6.2	6.5
U149	6.2	6.3	6.3	6.4	6.8	7.2	7.7
U150	4.7	4.7	4.9	5.1	5.4	5.8	6.2

Anexo 4: Datos colectados de número de hojas en Lima

Código	17-Jun	22-Jun	27-Jun	2-Jul	7-Jul	14-Jul	19-Jul
U1	4	4	6	8	12	14	14
U2	4	4	6	8	10	12	14
U3	4	4	6	6	8	10	12
U4	6	8	10	12	14	16	18
U5	4	4	4	6	8	10	12
U6	4	4	6	8	10	12	14
U7	6	4	6	6	8	10	12
U8	8	6	6	6	8	12	14
U9	4	4	4	6	8	10	12
U10	6	4	6	8	12	16	18
U11	4	6	8	10	10	14	16
U12	4	4	6	8	10	12	14
U13	8	8	8	10	12	16	18
U14	4	4	6	6	8	10	12
U15	6	4	6	6	6	8	10
U16	4	4	6	6	8	10	12
U17	6	4	6	8	10	14	16
U18	5	4	6	8	10	12	14
U19	4	4	6	6	8	10	12
U20	4	4	6	8	10	12	14
U21	6	4	6	8	10	12	14
U22	6	6	6	6	8	10	12
U23	8	6	6	8	10	12	14
U24	6	4	6	6	8	10	12
U25	6	8	10	12	14	16	18
U26	8	6	8	10	12	14	16
U27	6	6	8	10	10	12	14
U28	4	4	4	6	8	10	12
U29	4	4	6	8	10	10	12
U30	8	6	8	8	10	12	14
U31	10	10	12	16	20	24	26
U32	6	4	6	8	8	10	12
U33	8	6	6	6	6	8	10
U34	6	4	6	6	8	10	12
U35	6	6	6	8	8	10	12
U36	6	4	4	6	6	8	10
U37	4	4	6	8	10	12	14
U38	4	4	4	6	8	10	12
U39	6	6	6	6	8	10	12
U40	6	4	4	6	8	10	12
U41	8	6	6	8	10	12	14

U42	6	4	6	8	8	10	12
U43	8	6	6	8	10	10	14
U44	10	8	10	12	14	14	16
U45	6	6	8	10	10	14	16
U46	6	4	6	8	10	12	14
U47	8	6	8	10	12	12	16
U48	6	4	6	8	10	12	14
U49	8	6	8	8	10	10	12
U50	4	2	4	4	6	6	8

Anexo 5: Datos colectados de número de hojas en la cámara climática - Naju

Código	9-Set	14-Set	19-Set	24-Set	29-Set	3-Oct	8-Oct
U51	10	10	12	14	14	16	16
U52	10	8	8	10	12	14	14
U53	8	6	6	8	8	10	10
U54	8	8	10	10	12	12	14
U55	10	12	12	12	14	14	14
U56	12	12	12	14	14	14	16
U57	8	6	8	10	12	14	16
U58	12	10	12	12	14	16	16
U59	12	10	10	10	10	12	14
U60	24	26	26	28	28	30	34
U61	16	16	16	18	18	18	20
U62	18	16	16	18	18	20	22
U63	14	12	12	12	12	14	14
U64	14	12	12	12	14	16	18
U65	14	14	14	16	18	20	22
U66	14	12	12	14	16	18	20
U67	12	12	12	14	16	16	18
U68	10	10	10	10	12	14	16
U69	14	14	16	16	18	18	20
U70	16	18	18	20	22	24	26
U71	10	10	10	12	12	12	14
U72	12	10	10	12	14	16	16
U73	8	10	12	14	16	18	20
U74	18	16	18	18	20	22	22
U75	10	8	8	10	12	14	16
U76	10	8	10	12	14	14	14
U77	10	8	10	10	12	14	16
U78	22	20	22	24	24	26	26
U79	20	22	22	24	24	26	30
U80	26	28	30	32	36	40	44
U81	18	20	20	20	22	22	22

U82	14	12	12	14	16	18	22
U83	12	12	14	16	18	20	24
U84	16	16	18	20	20	22	26
U85	10	10	12	12	14	14	16
U86	22	20	22	22	24	24	24
U87	10	8	8	10	12	12	14
U88	12	12	14	14	14	16	16
U89	12	10	10	10	10	12	14
U90	12	10	10	12	12	14	16
U91	14	12	12	12	16	20	24
U92	8	8	10	10	12	12	14
U93	12	10	12	12	14	14	16
U94	12	12	12	14	14	16	18
U95	14	14	16	18	20	22	24
U96	10	10	10	10	12	14	14
U97	8	8	8	10	10	12	14
U98	12	12	12	14	14	16	18
U99	12	14	14	16	16	18	18
U100	22	22	22	24	26	28	34

Anexo 6: Datos colectados de número de hojas en la cámara climática - Piura

Código	3-Set	8-Set	13-Set	18-Set	23-Set	28-Set	3-Oct
U101	10	10	10	12	14	18	18
U102	4	0	0	2	2	4	8
U103	4	2	2	4	4	6	8
U104	16	14	16	20	24	28	32
U105	2	0	4	4	8	10	10
U106	6	4	4	4	6	6	10
U107	2	2	4	4	6	8	10
U108	10	8	12	14	16	16	18
U109	2	2	4	6	6	8	8
U110	4	4	4	6	6	8	8
U111	2	2	4	6	6	6	8
U112	6	4	8	10	12	10	14
U113	16	16	18	18	20	22	22
U114	2	2	4	6	8	8	10
U115	6	4	8	10	12	16	16
U116	4	2	6	8	10	12	14
U117	6	4	8	10	12	12	10
U118	12	10	14	16	18	18	20
U119	8	6	10	12	12	12	12

U120	8	6	10	12	14	14	16
U121	2	2	4	4	6	8	10
U122	4	2	6	8	10	12	12
U123	24	22	22	24	30	32	34
U124	8	6	10	12	14	14	16
U125	4	2	4	6	8	10	12
U126	4	4	4	4	6	10	12
U127	4	2	6	8	10	8	10
U128	6	4	8	10	12	18	24
U129	2	2	2	4	6	8	10
U130	2	4	4	6	8	10	12
U131	2	4	4	6	8	10	10
U132	2	2	4	4	6	8	10
U133	18	16	16	18	22	24	26
U134	4	2	6	8	8	10	12
U135	8	6	10	12	12	14	14
U136	6	4	4	6	12	14	18
U137	18	16	16	16	24	24	26
U138	4	2	6	8	10	12	14
U139	12	10	12	16	18	24	26
U140	10	8	12	14	16	18	20
U141	2	2	4	6	10	14	18
U142	12	10	10	16	18	22	26
U143	12	10	12	16	18	22	28
U144	6	4	4	10	12	14	16
U145	2	2	2	6	8	14	20
U146	18	16	20	22	24	28	28
U147	10	8	12	14	14	18	20
U148	20	18	18	24	24	28	32
U149	4	2	2	6	6	10	14
U150	10	6	4	8	12	16	20

Anexo 7: Datos colectados de la evaluación final en Lima

Código	Longitud de tallo	Longitud de raíz	N° de hojas	Peso fresco tallo	Peso fresco raíz	Peso seco tallo	Peso seco raíz
A1	8.259	7.34	16	0.387	0.1414	0.0694	0.0498
A2	5.887	6.21	12	0.2678	0.1545	0.0409	0.0489
A3	3.636	5.385	8	0.192	0.0993	0.0317	0.0474
A4	5.551	8.766	10	0.278	0.1882	0.0476	0.0467
A5	7.792	7.077	13	0.1833	0.1548	0.0423	0.0534
A6	5.607	6.805	11	0.1753	0.1214	0.0227	0.0681
A7	7.121	6.539	15	0.3451	0.1454	0.0651	0.0425
A8	7.656	7.629	10	0.3014	0.1447	0.0522	0.0582
A9	5.479	5.011	10	0.2527	0.0974	0.0476	0.0561
A10	5.683	8.262	8	0.2556	0.1279	0.0491	0.0391
A11	5.553	8.989	9	0.2243	0.1259	0.0431	0.0578
A12	6.068	8.326	14	0.2566	0.1336	0.0489	0.0655
A13	4.256	5.447	10	0.1414	0.0966	0.0491	0.0373
A14	5.504	6.918	12	0.1996	0.1133	0.0479	0.0436
A15	4.047	5.351	10	0.0622	0.0641	0.0295	0.0226

Anexo 8: Datos colectados de la evaluación final en la cámara climática - Naju

Código	Longitud de tallo	Longitud de raíz	N° de hojas	Peso fresco tallo	Peso fresco raíz	Peso seco tallo	Peso seco raíz
A16	6.030	6.202	14	0.1865	0.1263	0.0398	0.0381
A17	7.662	8.949	22	0.2494	0.1845	0.0589	0.0288
A18	5.123	4.521	10	0.1704	0.0693	0.0408	0.0298
A19	5.138	4.421	10	0.1863	0.0678	0.0393	0.0141
A20	7.196	6.798	20	0.1923	0.1322	0.0504	0.0183
A21	3.648	4.419	10	0.1646	0.0644	0.0386	0.1720
A22	5.638	4.245	7	0.1563	0.1022	0.0406	0.0129
A23	5.782	5.184	12	0.1991	0.1324	0.0535	0.0188
A24	3.256	4.832	24	0.2652	0.1245	0.0894	0.0141
A25	4.276	4.714	15	0.1070	0.0101	0.0196	0.0133
A26	4.398	5.375	12	0.1242	0.0567	0.0345	0.0511
A27	3.988	4.976	10	0.1341	0.0458	0.0243	0.0124
A28	5.265	6.768	14	0.1537	0.0967	0.0486	0.0145
A29	3.472	5.132	10	0.1221	0.0857	0.0355	0.0163
A30	6.341	7.452	16	0.1764	0.1224	0.0537	0.0195

Anexo 9: Datos colectados de la evaluación final en la cámara climática - Piura

Código	Longitud de tallo	Longitud de raíz	N° de hojas	Peso fresco tallo	Peso fresco raíz	Peso seco tallo	Peso seco raíz
A31	7.251	9.653	14	0.2665	0.1662	0.0625	0.0275
A32	10.475	7.526	12	0.3701	0.2762	0.0892	0.0447
A33	5.856	7.236	18	0.4301	0.2518	0.0621	0.0409
A34	11.012	7.149	16	0.4158	0.2931	0.0899	0.0503
A35	9.712	7.842	14	0.4185	0.1821	0.0966	0.0331
A36	8.415	5.871	20	0.2577	0.0643	0.0586	0.0096
A37	9.369	5.126	18	0.2070	0.0935	0.0471	0.0185
A38	9.157	5.794	14	0.2721	0.1199	0.0673	0.0219
A39	12.415	7.136	16	0.3308	0.1294	0.0852	0.0275
A40	12.148	7.011	17	0.4361	0.2212	0.0844	0.0503
A41	9.598	6.984	16	0.4368	0.2962	0.0827	0.0517
A42	10.733	8.376	14	0.4395	0.1852	0.0794	0.0345
A43	9.436	7.264	12	0.2787	0.1025	0.0614	0.0586
A44	10.390	7.451	18	0.2841	0.1066	0.0649	0.0399
A45	10.178	6.328	20	0.2931	0.1274	0.0701	0.0418