

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**EVALUACIÓN DEL DESARROLLO *IN VITRO* DE *Stevia rebaudiana*
BERTONI CON EL EMPLEO DE SISTEMAS DE MICROPROPAGACIÓN
SEMI-SÓLIDO, INMERSIÓN TEMPORAL RITA® Y BIORREACTOR DE
BURBUJEO**

Karol María Jiménez Quesada



Cartago, 2011



EVALUACIÓN DEL DESARROLLO IN VITRO DE *Stevia rebaudiana* BERTONI CON EL EMPLEO DE SISTEMAS DE MICROPROPAGACIÓN SEMI-SÓLIDO, INMERSIÓN TEMPORAL RITA® Y BIORREACTOR DE BURBUJEJO

Karol María Jiménez Quesada*

RESUMEN

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta medicinal originaria del norte de Paraguay, que se caracteriza por la acumulación de compuestos edulcorantes en sus hojas, los cuales son hasta 300 veces más dulces que la sacarosa. Actualmente se desarrollan numerosas investigaciones enfocadas en la obtención de productos comerciales, dirigidos especialmente a personas con problemas de obesidad y diabetes; no obstante, los bajos porcentajes de germinación de sus semillas y los pocos individuos regenerados mediante propagación vegetativa, representan un reto para el asentamiento de poblaciones de calidad. Es por eso que las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se presentan como una atractiva opción para dicho fin. Dentro de este contexto, la presente investigación se enfocó en comparar la efectividad de tres sistemas para la micropropagación de esta planta: medio semi-sólido, inmersión temporal en RITA e inmersión permanente en biorreactor de burbujeo, bajo condiciones de $22 \pm ^\circ\text{C}$, luz directa, 2000 lux y un fotoperíodo de 16 horas. Se determinó que un tratamiento en RITA con 5 minutos de inmersión cada 8 horas favorece las características de color, vigorosidad y desarrollo radical de los explantes, además de generar excelentes resultados en cuanto a brotación, elongación, número de hojas, masa seca y masa fresca. El crecimiento en medio-semisólido se vio afectado por la temperatura, y la incidencia de luz directa ocasionó la acumulación de antocianinas en los explantes. El crecimiento de biorreactor no se recomienda para la micropropagación de *S. rebaudiana*, ya que causa malformaciones y decoloración en las hojas, que constituyen la principal fuente de compuestos de interés.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2011

**EVALUACIÓN DEL DESARROLLO IN VITRO DE *Stevia rebaudiana*
BERTONI CON EL EMPLEO DE SISTEMAS DE MICROPROPAGACIÓN
SEMI-SÓLIDO, INMERSIÓN TEMPORAL RITA® Y BIORREACTOR DE
BURBUJEO**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología**

Miembros del Tribunal

**M.SC. Silvana Alvarenga Venutolo,
Profesora Asesora-ITCR**

**Ing. Tatiana Salazar Aguilar
Asesora-CIB**

**Dra. Ana Abdelnour Esquivel
Lectora**

DEDICATORIA

*A mi mamá, mi
hermano, mi abuelita y mi tía, los pilares de mi vida.*

Karol

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque existo gracias a Él, que me regaló las virtudes que hoy me permiten finalizar con éxito y satisfacción mi Bachillerato...

A mi mamá Hazel Quesada por ser mi apoyo y sostén, por permanecer a mi lado a lo largo de este camino de estudio e impulsarme a ser una mejor persona y alcanzar mis metas...

A mi hermano José por su paciencia al escucharme y brindarme siempre un consejo sabio para enriquecer mi vida, y por tener guardado un abrazo dispuesto en todo momento...

A mi abuelita Marta por confiar en la nieta que educó, que al estar a su cuidado aprendió a regirse por principios morales, éticos y religiosos...

A mi tía Ana por ser la madrina que me impulsó a continuar con firmeza y alegría, y la amiga que compartió mis experiencias como estudiante...

A mi novio Rodrigo por su consejo, paciencia y cariño que han incrementado en mí la ilusión de un mejor mañana...

A los familiares y amigos que tuvieron palabras y gestos de apoyo porque me estimularon a continuar dando lo mejor de mí...

A la profesora Silvana Alvarenga, la ingeniera Tatiana Salazar, la profesora Ana Abdelnour y el profesor Francisco Monge, por confiar en mi capacidad y compartirme su conocimiento...

GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

AG₃: Ácido Giberélico

AIA: Ácido Indol-Acético

AIB: Ácido Indol-Butírico

ANA: Ácido Naftalen-Acético

BAP: Bencil-Amino Purina

BIT: Biorreactor de Inmersión Temporal

CEQIATEC: Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos

CIB: Centro de Investigación en Biotecnología

CIPRONA: Centro de Investigación en Productos Naturales

ITCR: Instituto Tecnológico de Costa Rica

M & S: Murashige and Skoog

MIPYMES: Micro, Pequeña y Mediana Empresa

RITA: Recipiente de Inmersión Temporal Automatizada

SIT: Sistema de Inmersión Temporal

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE APÉNDICES	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
<i>Stevia rebaudiana</i>	4
Origen e importancia del Cultivo.....	4
Cultivo <i>In Vitro</i> de la especie	5
Aprovechamiento Comercial	9
Importancia del Cultivo en Costa Rica.....	10
<i>Cultivo de Tejidos Vegetales</i>	12
Concepto General.....	12
Sistemas de Cultivo en Medio Semi-sólido.....	13
Sistemas de Cultivo en Medio Líquido	14
– Sistemas de Inmersión Temporal	15
RITA [®]	16
– Sistemas de Inmersión Permanente	17
Biorreactor de Burbujeo	18
OBJETIVOS	19
Objetivo General.....	19
Objetivos específicos	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20

A. Desinfección de explantes.....	20
B. Introducción de explantes	20
C. Multiplicación de explantes	21
D. Micropropagación del material	21
– Sistema 1: Medio semi-sólido.....	22
– Sistema 2: Inmersión Temporal en RITA®	22
– Sistema 3: Biorreactor de burbujeo	23
E. Medición de variables cualitativas.....	24
F. Medición de variables cuantitativa.....	24
G. Análisis estadístico de datos	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
A. Desinfección de explantes.....	26
B. Introducción de explantes	26
C. Multiplicación de explantes	27
D. Micropropagación del material	28
– Sistema 1: Medio semi-sólido.....	29
– Sistema 2: Inmersión Temporal en RITA	30
– Sistema 3: Biorreactor de burbujeo	30
E. Variables cualitativas evaluadas	31
F. Variables cuantitativas evaluadas	36
G. Análisis estadístico de datos	41
CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES	54
APÉNDICES	56
ANEXOS.....	83
BIBLIOGRAFÍA	84

ÍNDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
1	Tratamientos evaluados para la comparación de tres sistemas de micropropagación de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.	24
2	Características cualitativas de las plántulas después de dos semanas de cultivo en los distintos sistemas de micropropagación.	31
3	Incremento en el número de brotes de los explantes por tratamiento para cada repetición.	36
4	Incremento en el número de hojas de los explantes por tratamiento para cada repetición.	37
5	Incremento en la longitud de los explantes por tratamiento para cada repetición.	37
6	Masa fresca de los explantes por tratamiento para cada repetición.	38
7	Masa seca de los explantes por tratamiento para cada repetición.	38
8	Cálculo del coeficiente de multiplicación promedio para cada tratamiento.	40
9	Comparación de medias de las distintas variables para todos los tratamientos, mediante la Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.	41
10	Comparación de medias de las distintas variables para los tratamientos en RITA [®] , mediante la Prueba Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.	47
11	Promedio del número de brotes inicial por repetición en cada tratamiento.	59
12	Promedio del número de brotes final por repetición en cada tratamiento.	59
13	Promedio del número de hojas inicial por repetición en cada tratamiento.	60
14	Promedio del número de hojas final por repetición en cada tratamiento.	60
15	Promedio de la longitud final por repetición en cada tratamiento.	61
16	Medición de las variables cuantitativas en estudio para T6 y T7.	72

ÍNDICE DE TABLAS

Núm.	Título	Pág.
1	Análisis de varianza del número de brotes por tratamiento para los tres sistemas.	62
2	Comparación de medias del número de brotes por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.	62
3	Comparación de medias del número de brotes por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.	63
4	Análisis de varianza del número de hojas por tratamiento para los tres sistemas.	64
5	Comparación de medias del número de hojas por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.	64
6	Comparación de medias del número de hojas por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.	65
7	Análisis de varianza de la longitud por tratamiento para los tres sistemas.	66
8	Comparación de medias de la longitud por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.	66
9	Comparación de medias de la longitud por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.	67
10	Análisis de varianza de masa fresca por tratamiento para los tres sistemas.	68
11	Comparación de medias de masa fresca por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.	68
12	Comparación de medias de masa fresca por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.	69
13	Análisis de varianza de masa seca por tratamiento para los tres sistemas.	70
14	Comparación de medias de masa seca por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.	70
15	Comparación de medias de masa seca por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.	71

16	Análisis de varianza de número de brotes por tratamiento en RITA [®] .	73
17	Comparación de medias de número de brotes por tratamiento en RITA [®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.	73
18	Comparación de medias de número de brotes por tratamiento en RITA [®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.	74
19	Análisis de varianza de número de hojas por tratamiento en RITA [®] .	75
20	Comparación de medias de número de hojas por tratamiento en RITA [®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.	75
21	Comparación de medias de número de hojas por tratamiento en RITA [®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.	76
22	Análisis de varianza de longitud por tratamiento en RITA [®] .	77
23	Comparación de medias de la longitud por tratamiento en RITA [®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.	77
24	Comparación de medias de la longitud por tratamiento en RITA [®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.	78
25	Análisis de varianza masa fresca por tratamiento en RITA [®] .	79
26	Comparación de medias de masa fresca por tratamiento en RITA [®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.	79
27	Comparación de medias de masa fresca por tratamiento en RITA [®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.	80
28	Análisis de varianza masa seca por tratamiento en RITA [®] .	81
29	Comparación de medias de masa seca por tratamiento en RITA [®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.	81
30	Comparación de medias de masa seca por tratamiento en RITA [®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Esquema del funcionamiento de RITA [®]	16
2	Esquemas de biorreactores sin agitación.	18
3	Plántulas de <i>Stevia rebaudiana</i> en etapa de multiplicación en medio semi-sólido.	22
4	Prototipo de biorreactor de burbujeo.	23
5	Fórmula para el cálculo del coeficiente de multiplicación.	25
6	Estaca de <i>S. rebaudiana</i> introducida en medio semi-sólido.	26
7	Plántulas <i>in vitro</i> de <i>S. rebaudiana</i> .	28
8	Contaminación en medio semi sólido.	30
9	Coloración anómala en los tratamientos.	33
10	Desarrollo radical en los tratamientos.	35
11	Comparación de medias del número de brotes en las plántulas.	42
12	Comparación de medias del número de hojas de las plántulas.	43
13	Comparación de medias de la longitud de las plántulas.	44
14	Comparación del crecimiento en los tratamientos.	44
15	Comparación de medias de la masa fresca de las plántulas.	45
16	Comparación de medias de la masa seca de las plántulas.	46
17	Sistema de medio semi-sólido.	56
18	Explantes en el sistema de medio semi-sólido.	56
19	Sistema de inmersión temporal en RITA [®] .	57
20	Explantes en el sistema de inmersión temporal en RITA [®] .	57
21	Sistema de inmersión permanente en biorreactor de burbujeo.	58
22	Explantes en el sistema biorreactor burbujeo.	58
23	Paleta de verde monocromático.	83

ÍNDICE DE APÉNDICES

Núm.	Título	Pág.
1	Tratamiento de medio semi-sólido.	56
2	Ensayos de inmersión temporal mediante RITA [®] .	57
3	Tratamiento con el empleo de biorreactores de burbujeo.	58
4	Datos de las variables evaluadas.	59
5	Análisis estadístico para la variable de número de brotes en los tres sistemas.	62
6	Análisis estadístico para la variable de número de hojas en los tres sistemas.	64
7	Análisis estadístico para la variable de longitud en los tres sistemas.	66
8	Análisis estadístico para la variable de masa fresca en los tres sistemas.	68
9	Análisis estadístico para la variable de masa seca en los tres sistemas.	70
10	Valores de referencia en T6 y T7.	72
11	Análisis estadístico para la variable de número de brotes en RITA [®] .	73
12	Análisis estadístico para la variable de número de hojas en RITA [®] .	75
13	Análisis estadístico para la variable de longitud en RITA [®] .	77
14	Análisis estadístico para la variable masa fresca en RITA [®] .	79
15	Análisis estadístico para la variable masa seca en RITA [®] .	81

ÍNDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Paleta de verde	83

INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Stevia rebaudiana*, especie originaria de Paraguay, se desarrolla principalmente en la región suramericana, pero también abarca países como China, Taiwan, Corea, Tailandia y Malasia, y actualmente se extiende por Israel, Ucrania, Filipinas, Canadá, Hawaii y California. En los países orientales es donde se ha extendido el interés por estudiar y aprovechar las propiedades edulcorantes de esta planta, lo que a su vez ha generado un incrementado en las investigaciones enfocadas en el establecimiento de plantaciones cada vez más productivas de esta especie (Ahmed *et al.*, 2007 y Sivaram y Mukundan, 2003).

La importancia comercial de *S. rebaudiana* se resume en que los esteviósidos que la caracterizan, aparte de resultar hasta 300 veces más dulce que la sacarosa, no pueden ser degradados y utilizados como fuente de energía por el cuerpo, ya que no se descompone químicamente durante el proceso digestivo, por lo que son aptos para consumo en personas diabéticas. En unión con lo anterior, contribuye con las personas con problemas de obesidad endulzando sin calorías, restringiendo la acumulación de grasas, y disminuyendo la presión arterial. Incluso se ha encontrado su aplicación en el tratamiento de caries (Das *et al.*, 2011 y Flores y Cortés, 2011).

Los compuestos glicosídicos pueden emplearse en la elaboración de gran cantidad de alimentos, como galletas, repostería, bebidas, jugos de fruta, bebidas procesadas, helados, goma de mascar, o bien añadirse en forma pulverizada a bebidas como café y té; actualmente se comercializan en gran variedad de productos sin resultar dañinos para el ser humano (Ahmed *et al.*, 2007 y Rafiq *et al.*, 2007).

La problemática inicial radica en que la reproducción por semillas de *S. rebaudiana* genera bajos porcentajes de germinación, aunado a la heterogeneidad de las poblaciones resultantes, lo que a su vez ocasiona variabilidad en las características de la planta, inclusive en los niveles y composición de las sustancias endulzantes (Sivaram y Mukundan, 2003); por otra parte, en cuanto a la propagación vegetativa,

se ha comprobado que el número de individuos regenerados por planta es muy bajo (Ahmed *et al.*, 2007).

Es por lo anterior que un gran número de autores coinciden en que el área de la biotecnología enfocada al cultivo de tejidos vegetales, se ha convertido en una opción atractiva y viable para promover la propagación masiva de *S. rebaudiana* (Rafiq *et al.*, 2007). Con esa finalidad los investigadores proponen la utilización de raíces, hojas y estacas como material para introducción, en medio con sales Murashige and Skoog (1962) y una variedad de reguladores de crecimiento. Este tipo de medio M & S con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, se ha utilizado también para la micropropagación de esta especie.

En el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica se ha desarrollado el protocolo de micropropagación de *Stevia rebaudiana*, a través de estacas nodales en medio semi-sólido, debido a la facilidad de manipulación de las vitro plantas, y a la disponibilidad de recipientes de vidrio con tapa plástica para su establecimiento. No obstante, como un objetivo del proyecto vigente para la optimización del cultivo, se pretende comparar el desarrollo de esta planta en tres sistemas de cultivo vegetal distintos, lo que permitiría que una vez establecido el mejor sistema de micropropagación de esta especie, las plantas élite puedan ser propagadas masivamente, y aclimatadas en el invernadero del CIB, con miras a la explotación comercial en territorio costarricense.

Los sistemas propuestos corresponden a medio semi-sólido, sistema de inmersión temporal mediante RITA[®], y sistema de inmersión permanente en biorreactor de burbujeo, ya que los tres proveen condiciones físicas distintas a los explantes que pueden o no incidir en su crecimiento y desarrollo; generan costos diferentes debido a la especialización del equipo de trabajo, y con los sistemas de inmersión se beneficiaría una propagación con mayor densidad de siembra (Etienne y Berthouly, 2002).

Como parte del proyecto “Optimización del cultivo y procesamiento de *Stevia rebaudiana* para la obtención de un novedoso edulcorante natural” entre el 2003 y el 2005, en el CIB se desarrollaron protocolos de propagación *in vitro* de esta planta que incluían trabajos en medio semi-sólido y en RITA[®], a través de los cuáles se determinó que el crecimiento de microestacas en erlenmeyers de 500 ml, en el cuarto de crecimiento a 25 ± 2 °C y luz difusa, aparte de generar resultados satisfactorios, se acoplaba adecuadamente con la disponibilidad de material, equipo y reactivos del centro.

No obstante, recientemente ha surgido nuevamente el interés por desarrollar protocolos de propagación masiva, que faciliten la obtención de lotes de producción *in vitro* mayores y la propagación en campo, específicamente en el sector de Guápiles; lo anteriormente expuesto constituye el paso previo a la ejecución de los procesos de secado, molienda y extracción de los esteviósidos de interés, que finalmente desencadenarían la oportunidad de explotación comercial en Costa Rica, tanto en la industria alimentaria como edulcorante natural, como en la farmacéutica y médica.

Por tanto, como parte de este trabajo se evaluarán variables cuantitativas clave para comparar y definir estadísticamente la efectividad de los sistemas a comparar, así como también se estudiarán variables cualitativas que permitan una comparación visual sencilla de las características físicas resultantes de cada tratamiento ejecutado; con lo anterior se justifica la selección de un sistema de cultivo eficiente para las necesidades actuales de propagación de la especie.

REVISIÓN DE LITERATURA

Stevia rebaudiana

Origen e importancia del Cultivo

La *Stevia rebaudiana* perteneciente a la familia Asteraceae, es una planta herbácea, perenne, que crece en climas tropicales y sub tropicales, y es originaria del norte de Paraguay y Sur América (Bourlakis y Weightman, 2006 y Shreeder *et al.*, 2008). El clima de estas regiones se caracteriza por lluvias que van desde los 1400 a los 1800 mm anuales, temperaturas óptimas de 15 a 30°C, y humedad relativa media, que favorecen la capacidad de la especie para resistir la humedad, no así la sequía (Alvarenga, 2005 y ClimaParaguay, 2009).

A través de numerosas investigaciones se ha determinado que *Stevia rebaudiana* encuentra su óptimo crecimiento a temperaturas entre los 20 a 26°C, e intensidad de luz alta, donde los fotoperíodos largos incrementan la longitud de los entrenudos, el área foliar, el peso seco y la aparición de hojas. Además, se ha descubierto que la especie se favorece con la materia orgánica de los suelos, y es capaz de adaptarse a un amplio rango de pH de los mismos, preferiblemente los suelos arenosos-humíferos, con un pH de 6,5- 7,5 en ausencia de salinidad. Se conoce también que para el caso específico de la germinación de las semillas, la temperatura debe ser superior a los 20 °C (Alvarenga, 2005, Kinghorn, 2002 y U.V.A, 2003).

Estructuralmente la *Stevia sp.* se describe como una hierba perenne herbácea, de tallo pardo y poco ramificada, que alcanza entre 30 y 80 cm de altura, elevándose desde una base corta y gruesa; posee hojas sésiles, opuestas, ovoidales, de nervadura reticulada, de 5 a 10 cm, aserradas sobre todo en su extremo final, que adquieren una textura resinosa al secarse. Presenta pequeñas flores hermafroditas blanquecinas de corona tubular que conforman inflorescencias tipo capítulo, y una raíz fibrosa que abarca una cuarta parte del tamaño total de la planta. Se sabe de la existencia de aproximadamente doscientas especies de esta planta medicinal en América, de las

cuáles en Paraguay se ubican al menos catorce, siendo la más destacada *Stevia rebaudiana* Bertoni (Djendoel, 2002 y U.V.A, 2003)

Se considera a *S. rebaudiana* como una especie de interés debido a que en sus hojas se sintetizan edulcorantes, cuyo poder endulzante es entre 100 y 400 veces mayor al de la sacarosa o azúcar de caña, comúnmente utilizada en los procesos de elaboración y preparación de alimentos; es decir, los compuestos edulcorantes de esta planta actúan como endulzantes sin calorías y termo estables que pueden ser aprovechados en las industrias alimentaria y farmacéutica, aún en pequeños volúmenes (Bourlakis y Weightman, 2006 y Suárez y Salgado, 2008).

La síntesis de estos compuestos se debe a la formación de glucósidos diterpenos con propiedades edulcorantes en las hojas, como los esteviósidos y el rebaudósido A; se conoce también la existencia de al menos ocho compuestos análogos más, como rebaudósido B, C, D, dulcósido A y esteviolbiósidos. Todos estos compuestos poseen una estructura de esteviol en común, y se diferencia entre sí por el número y unión de los residuos de carbono, lo que además afecta la intensidad del dulzor; sin embargo, sólo los dos primeros compuestos son generados por la planta en niveles aprovechables industrialmente (Bourlakis y Weightman, 2006 y Kinghorn, 2002).

Cultivo *In Vitro* de la especie

La conclusión generalizada a la que autores como Ahmed y colaboradores (2007) han llegado con respecto al cultivo tradicional de *S. rebaudiana* es que las semillas de esta especie generan porcentajes de germinación tan bajos que su reproducción sexual se convierte en un trabajo poco viable, a lo que además se agrega la heterogeneidad de las poblaciones en cuanto a características de importancia como los niveles de producción de esteviósido (Sivaram y Mukundam, 2003); se añade también que su reproducción asexual, lograda a través de brotes o estacas, limita las producciones a un número muy bajo de individuos regenerados. La necesidad de obtener poblaciones de *Stevia*, morfológica y genéticamente uniformes, es un tema que se

plantea desde varias décadas atrás, y seguirá discutiéndose mientras se encuentre en juego la cantidad y calidad de los glucósidos (Suárez y Salgado, 2008).

Por lo anteriormente expuesto, un gran número de investigadores, sobre todo en Medio Oriente, proponen el estudio del comportamiento *in vitro* de esta planta medicinal, de manera que se planteen, evalúen y optimicen protocolos enfocados en su introducción y multiplicación, lo que tendrá por objetivo final la comercialización de productos naturales que aprovechen los compuestos edulcorantes de la especie, en distintas industrias (Alvarenga, 2005).

La micropropagación garantiza la producción masiva de plantas libres de enfermedades y patógenos, aptas para la producción comercial de valiosos compuestos secundarios (Alvarenga, 2005). En cultivo *in vitro* se ha empleado la organogénesis directa mediante protocolos de cultivo de ápices meristemáticos y de segmentos nodales, y también existen estudios acerca de la embriogénesis somática en este cultivo (Uddin *et al.*, 2006).

Acerca del cultivo en medio semi-sólido, en el 2003 se publicaron una serie de pruebas para inducir callo en *S. rebaudiana* que presentara niveles adecuados de compuestos edulcorantes característicos; para este propósito se utilizaron como explantes los ápices, nudos y hojas de la planta, a partir de los cuales se obtuvieron brotes, que posteriormente fueron subcultivados en medio con sales y vitaminas M & S, suplementado con 8.87 μM de BAP y 5.71 μM de AIA, a partir de lo cual se descubrió que es posible obtener callos con un elevado contenido de edulcorantes siguiendo ese protocolo; la cantidad de compuesto de interés fue confirmado mediante técnicas cromatográficas (Sivaram y Mukundam, 2003).

El 2007 se publican varias investigaciones en el campo, una de ellas corresponde a la micropropagación de esta planta, a partir de medio con sales y vitaminas M & S suplementados con 0.5, 1, 2, 3 y 4 mg/l de BAP y 0.25 y 0.5 mg/l de AIA, separadamente y en combinación, donde el mejor nivel de brotación se obtuvo con únicamente 2 mg/l de BAP. Posteriormente, para la inducción de raíces, se emplea

nuevamente el medio con sales y vitaminas M & S al 2% de sacarosa, adicionado con 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mg/l de ANA y de AIB, de forma separada, obteniéndose el mejor resultado con 0,5 mg/l de ANA (Rafiq *et al.*, 2007).

En este mismo año se propone nuevamente el enraizamiento de la especie en medio con sales y vitaminas M & S, pero esta vez probando distintas concentraciones (0.1, 0.2, 0.5 y 1 mg/l) tanto de AIB, como de ANA y AIA; el porcentaje máximo de enraizamiento corresponde a un 97.66% utilizando 0.1 mg/l de AIA. Estos trabajos se relacionan con uno publicado previamente en 2006, donde se exponía que utilizando medio M & S con AIB (2 mg/l) como único regulador, era posible generar raíces de la planta en estudio (Hwang, 2006).

En el 2008 se elaboran estudios para obtener la regeneración de plantas de *S. rebaudiana* a partir de callo, con el empleo de quince tratamientos, los cuales tenían en común el uso de medio M & S con las sales y vitaminas al 50% suplementado con myo-Inositol (100 mg/l) y Tiamina (0.4 mg/l), pero se diferenciaban por las distintas concentraciones de BAP (0.0, 0.5, 1, 2 y 4 mg/l) y ANA (0.0, 0.1 y 1 mg/l) no obstante la regeneración de tallos de la plata no dio resultados positivos tras intentar el subcultivo de callos en medio M & S con sales y vitaminas al 50% y distintas concentraciones de BAP (0.0, 0.25, 0.5, 1,2 y 4 mg/l) y ANA/BAP (0.5/2, 0.5/4, 1/2 y 1/4 mg/l) (Suárez y Salgado, 2008).

En este mismo año, se intenta observar el comportamiento *in vitro* de la planta medicinal, cambiando la composición de sales y vitaminas del medio M & S, con lo que se establece un medio de cultivo semi-sólido útil con macroelementos modificados (H_4NO_3 - 1237.5 mg/l, KNO_3 - 950 mg /l , $MgSO_4$ - 185 mg/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - 440 mg/l y KH_2PO_4 - 85 mg/l), además de la adición de Glicina (2 ml/l), Piridoxina (0.5 m/l), Ácido Nicotínico (0.5 mg/l), Tiamina (0.1 mg/l), y una mezcla de agar con Gelrite[®] (1.5 g/l de cada uno), lo que constituye un medio bastante diferente a cualquier otro probado en *Stevia* hasta el momento (Ibrahim *et al.*, 2008a e Ibrahim *et al.*, 2008b).

Recientemente, en el presente año, se ha planteado un protocolo que acelera el crecimiento *in vitro* de la planta, y además garantiza la calidad molecular de los clones, dicho protocolo consiste en la micropropagación de los ápices principales en medio con sales y vitaminas M & S suplementado con 2 mg/l de cinetina. Por otra parte, los mejores resultados en cuanto a la elongación y el enraizamiento se obtuvieron en medio con sales y vitaminas M & S, sin la adición de AIA y BAP (Das *et al.*, 2011).

En el Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR, se ha trabajado el cultivo *in vitro* de microestacas con una yema axilar o apical de *S. rebaudiana* en medio sólido con las sales y vitaminas M & S, adicionado con 2 mg/l de Pantotenato de Calcio y 0.5 mg/l de AG₃. La introducción se realiza de igual manera con estacas desinfectadas, en medio semi-sólido con sales y vitaminas M & S sin reguladores (Alvarenga, 2005).

En cuanto al cultivo de *S. rebaudiana* en biorreactor de burbujeo, se han realizado investigaciones para la inducción de raíces y brotes de la planta medicinal, utilizando segmentos de hoja inmadura como explantes, y a partir de éstos se han generado con éxito brotes a cada lado de la nervadura central sobre la superficie adaxial (Shreedar *et al.*, 2008).

Por otra parte, en relación con la micropropagación de *S. rebaudiana* con el empleo de la inmersión temporal por el sistema de RITA[®]s aparentemente no se han publicado investigaciones que aprueben o desaprueren el uso de este sistema. Se tiene como referencia que en el 2003 en el CIB del ITCR se sometieron microestacas de la planta a una inmersión de dos minutos cada seis horas, empleando un medio con sales y vitaminas M & S suplementado con 0.5 mg/l de AG₃, 1 mg/l de Pantotenato de Calcio y 200 mg/l de extracto de malta, generando resultados satisfactorios (Alvarenga, 2005).

La información anteriormente expuesta corresponde únicamente a las metodologías de establecimiento y multiplicación *in vitro* planteadas por algunos autores, no

obstante, actualmente se conoce de una gran cantidad de información referente a estudios cuyo enfoque es la composición bioquímica de *S. rebaudiana*, sus propiedades y cualidades, la extracción y purificación de los edulcorantes, y su aprovechamiento comercial.

Aprovechamiento Comercial

Las hojas secas de *S. rebaudiana* presentan una concentración de alrededor de 10% m/m de estevioletos, no obstante esta composición es muy variable, y los protocolos de extracción estudiados aún no son precisos en cuanto a la purificación del compuesto activo. Al menos se sabe que de acuerdo con el tipo de glucósidos existentes, éstos son 100 a 450 veces más dulces que la sacarosa, por lo que se confirma su enorme potencial como endulzante natural (Bourlakis y Weightman, 2006); actualmente en el mercado circulan productos como Herbal Coffee, Migra Spray, Natuvia, Stevia clear, Stevia extracto, Stevia Spoonable, Stevita, Sweet Leaf Products, a base de esta planta (Flores y Cortés, 2011).

La *Stevia sp.* natural sin refinar contiene más de 100 elementos y aceites volátiles identificados, siendo el esteviolósido, el principal glucósido de este vegetal usado comercialmente, el cual no puede ser degradado y utilizado como fuente de energía; además la planta contiene carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales, principalmente en sus hojas (Martínez, 2002).

El consumo de la planta o de los productos a base de la misma, al día de hoy no han generado reportes relacionados con efectos secundarios ni mutagénicos perjudiciales; por el contrario, los estudios realizados por diferentes investigadores en distintos años, determinaron que el esteviolósido es bien tolerado y efectivo, pudiendo ser tomado en cuenta como alternativa para pacientes diabéticos, ya que actúa estimulando en forma directa las células beta del páncreas, generando así una secreción considerable de insulina (Alvarenga, 2005 y Flores y Cortés, 2011).

Como ya se mencionó, los compuestos edulcorantes de *S. rebaudiana* pueden ser aprovechados en la industria alimentaria, al modificar los procesos de endulzado tradicionales, y también puede dárseles uso en la industria farmacéutica al añadirse a medicamentos de ingestión oral (Bourlakis y Weightman, 2006), o bien, emplear los esteviósidos y esteviolbiósidos para la generación de compuestos híbridos sintetizados, y comprobar su efectividad como sustancias con actividad antituberculosa (Sharipova *et al.*, 2011).

Otros autores agregan que estos glucósidos, además, son reconocidos por su actividad antiácida, antidiabética, antihipertensiva, antioxidante, cardiotónica, cicatrizante, cosmética, desintoxicante, digestiva e insulino-trópica. Se hace referencia también a su capacidad de actuar como antibióticos principalmente contra las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y la levadura *Candida albicans* (Flores y Cortés, 2011).

Si bien existe un extenso número de trabajos enfocados en el estudio de las propiedades y beneficios de los endulzantes naturales provenientes de plantas como *S. rebaudiana*, aún es necesario profundizar en los métodos de reproducción de esta especie, y proponer técnicas de propagación no tradicionales, como técnicas de cultivo de tejidos, y complementar en un futuro con protocolos de transformación genética (Shreedar *et al.*, 2008).

La idea es entonces aprovechar características de interés como la que naturalmente esta planta ofrece, valiéndose de técnicas que incrementen los rendimientos y optimicen la purificación de los edulcorantes, y eviten la destrucción de los ecosistemas en los que se desarrolla.

Importancia del Cultivo en Costa Rica

Instituto Tecnológico de Costa Rica ha establecido un proyecto denominado “Estudios Preliminares para la Producción de un Edulcorante Natural Obtenido a

partir de *Stevia rebaudiana* Bertoni en Costa Rica” que actualmente se desarrolla en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) en asociación con el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA) de la UCR. El presente trabajo se desarrolla en el marco del proyecto mencionado con el objetivo de seleccionar un sistema de cultivo *in vitro* adecuado para la micropropagación de esta especie, de manera que se facilite su aprovechamiento comercial.

En el año 2005 se concluyó un proyecto denominado “Optimización del cultivo y procesamiento de *Stevia rebaudiana* para la obtención de un novedoso edulcorante natural”, que también fue desarrollado en el CIB del ITCR en coordinación con el Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC) del ITCR también, cuya finalidad fue la orientación técnica a mujeres campesinas productoras de plantas medicinales, pertenecientes a la asociación AMANDES de Roxana de Pococí, en el Asentamiento Campesino El Millón (Alvarenga, 2005).

Ese proyecto sentó la base de los conocimientos y estudios para la implementación del actual proyecto, sobre todo en lo concerniente al manejo en laboratorio de *S. rebaudiana*, tanto a nivel de introducción como de multiplicación, así como su comportamiento en invernadero y en campo abierto en suelo costarricense. La metodología de introducción y multiplicación de explantes es en efecto la que se detalla en la metodología del presente trabajo final de graduación.

Es importante que en Costa Rica se exploten racionalmente las propiedades de plantas medicinales sobresalientes como *S. rebaudiana* y *Uncaria tomentosa*, ya que estas representan una alternativa natural para innovar en las industrias farmacéuticas y médicas, proponiendo productos saludables en el mercado, de manera que podamos impulsar la economía agrícola capacitando a los agricultores acerca del manejo y domesticación de estas especies, y de esta forma contribuir con la futura creación de MIPYMES en nuestro país.

Cultivo de Tejidos Vegetales

Concepto General

La ciencia del cultivo de tejidos vegetales se basa en el principio de que las plantas pueden separarse en las células, tejidos u órganos que la componen y, a partir de su cultivo y manipulación *in vitro*, generar plantas nuevas e idénticas a la que les dio origen. Se incluyen métodos y técnicas usadas para la investigación botánica con numerosas aplicaciones prácticas (Caponetti *et al.*, 2005 y George, 2008). Las técnicas tienen como fin la propagación de especies de importancia comercial a través de técnicas y sistemas diversos que pueden o no ser automatizados (Shinsaku y Motomu, 2006).

Entre las ventajas de la propagación *in vitro* se encuentran

- Los cultivos iniciales se establecen a partir de pequeños segmentos de la planta (explantes), que se mantienen en condiciones de asepsia.
- Es posible ajustar y controlar la cantidad de nutrientes y reguladores disponibles para la planta, así como las condiciones de luz y temperatura.
- Se obtienen un gran número de plántulas en periodos cortos de tiempo en comparación con la macropropagación.
- Se pueden obtener clones de plantas de difícil propagación vegetativa o que poseen características de interés.
- El crecimiento es continuo a lo largo del año sin hacer diferenciación por las estaciones climáticas al crecer en cuartos controlados.
- Se requiere menos espacio y mantenimiento para la propagación que en los métodos tradicionales.
- Se puede certificar que determinada planta está libre de un determinado virus. (George y Deberg, 2008).

A través de numerosas investigaciones, se ha observado que para los diferentes tipos de plantas existentes se requieren variaciones en los medios de cultivo, tanto en su composición como en su consistencia, de manera que faciliten la adecuada

introducción y multiplicación de los explantes o células de interés. Si bien las sales Murashigue and Skoog (1962) representan un buen comienzo, para cada especie se deben analizar sus requerimientos nutricionales, que pueden ir desde los más simples hasta los más complejos (George y Davis, 2008).

Retomando lo anterior, los factores físicos como luz, temperatura y fotoperiodo, no son los únicos clave en el éxito del cultivo *in vitro*, sino también lo son factores químicos como el pH, compuestos orgánicos e inorgánicos, reguladores de crecimiento e incluso el estado físico del medio de cultivo, son relevantes (George y Davis, 2008). Es por eso que las técnicas de micropropagación emplean sistemas que involucren el uso de medios semi-sólidos o líquidos. La escogencia de uno u otro sistema depende de los estudios y ensayos realizados con la planta de interés, que permitan generar criterios válidos que indiquen cuál es el más conveniente, tomando en cuanto la finalidad de su propagación.

Sistemas de Cultivo en Medio Semi-sólido

Los sistemas de cultivo en medio semi-sólido son aquellos que emplean medios nutritivos a los cuales se les adiciona un agente gelificante (agar o gomas gelanas), lo que permite que el explante se mantenga estático dentro del recipiente sin sumergirse en su totalidad, sino que sólo una parte del órgano o tejido está en contacto permanente con el medio. Generalmente este tipo de medio se emplea para el crecimiento de órganos vegetales, establecimiento de callos, y mantenimiento a largo plazo de cultivos (George, 2008).

Las ventajas de este sistema incluyen la fácil visibilidad y recuperación de los explantes; éstos mantienen su orientación en el medio; no requieren de aireación dado que sobresalen por sobre el nivel del medio; brotes y raíces crecen organizadamente al ser el medio estacionario; permite el crecimiento indiferenciado en forma de callos (George y Davis, 2008).

De acuerdo con Etienne y Berthouly (2002), la micropropagación tradicional, en medio semi-sólido en algunas ocasiones se vuelve impredecible y costosa, debido al requerimiento de gran número de recipientes contenedores, uso de agente gelificante, transferencia periódica del material a medio fresco tanto para suplir los requerimientos de nutrientes como para que el crecimiento sea continuo. George y Davis (2008) comentan también que algunos gelificantes pueden contener compuestos inhibitorios o tóxicos para los explantes, pueden impedir la adecuada oxigenación de raíces, y se crea un gradiente nutritivo a medida que la plántula se elonga.

Adicionalmente, es un sistema en el que los costos por unidad de *in vitro* planta se elevan, y tan sólo en mano de obra se contempla un 60% del costo total. Por todo lo anterior, se ha concluido que para la micropropagación comercial de ciertas plantas y cultivares de interés, se puede evaluar la posibilidad de emplear técnicas más novedosas y automatizadas (Etienne y Berthouly, 2002).

Sistemas de Cultivo en Medio Líquido

Contrario a los medios semi-sólidos, los medios líquidos no emplean agentes gelificantes, por lo que las células u órganos están en contacto total con el medio temporal o permanentemente. Este sistema se aprovecha principalmente en cultivos celulares, pero también se usa en el cultivo de callos y micropropagación. Los medios líquidos pueden ser estáticos, o bien mantenerse en agitación y/o aireación dependiendo de la especie y el tipo de explante (George, 2008).

Los medios líquidos presentan ventajas como uniformidad de las condiciones de cultivo, disminución de la polaridad de la planta, renovación del medio sin necesidad de cambiar el recipiente contenedor, esterilización por microfiltración y facilidad de lavado. Las desventajas de estos sistemas de inmersión radican principalmente en problemas de hipoxia, rompimiento de órganos y el empleo de equipo complejo, y en sistemas de inmersión permanente también de hiperhidricidad (Etienne y Berthouly, 2002 y George, 2008).

Entre las técnicas de segunda generación con el uso de medios líquidos se encuentran los sistemas de inmersión temporal (SIT) y los biorreactores. Los sistemas de inmersión temporal se diferencian de los biorreactores en que en el primero, el contacto entre los explantes y el medio de cultivo es a intervalos de tiempo, mientras que en el segundo este contacto es permanente. En comparación con los medios semi-sólidos, en los sistemas de inmersión se emplean contenedores de mayor volumen, haciendo posible trabajar con mayor densidad de material, y así lograr una reducción del tiempo de transferencia de material (Etienne y Berthouly, 2002).

– **Sistemas de Inmersión Temporal**

Los sistemas de inmersión temporal (SIT), se basan en el bombeo de aire limpio a un frasco de cultivo, el cual pasa a través de un filtro mili poro, y llega hasta el compartimento donde se encuentra el medio, permitiendo que éste ascienda y entre en contacto los explantes o bien pase a otro recipiente donde se encuentren los explantes (Jiménez, 2005). El método permite que el exceso de solución en los explantes se drene por gravedad al finalizar el bombeo, y éstos se mantengan húmedos sobre una superficie apta para su contenido hasta la próxima inmersión (Afreeen, 2006).

Este tipo de sistemas reduce los costos de la propagación *in vitro* hasta en un 20% en comparación con otros sistemas de cultivo líquido y hasta en un 46% con respecto al medio semi-sólido, esto una vez que se han hecho las inversiones iniciales en la compra de los equipos correspondientes. Las labores de mano de obra se reducen también, lo mismo que el espacio al permitir la propagación masiva, y se aumentan los rendimientos y la calidad del material. Además, de acuerdo con numerosos estudios, un gran número de especies tropicales muestran un mejor crecimiento y desarrollo cuando se micropropagan mediante los SIT (Jiménez, 2005).

La clave del éxito está muchas veces en establecer los tiempos de inmersión y la frecuencia requerida para la especie. Este sistema es útil en cuanto previene la anoxia o falta de oxígeno en el medio, controla el ambiente gaseoso con cada inmersión y

facilita la renovación de medio. Dentro de los SIT se encuentran los “Biorreactores de Inmersión Temporal o Twin Flasks System” (BIT[®]) y el “ Recipiente de Inmersión Temporal Automatizada o Recipient for Automated Temporary Immersion System” (RITA[®]) sistemas que al ser automatizados, disminuyen los costos de mano de obra (Berthouly y Etienne, 2005 y Afreen, 2006).

RITA[®]

Este sistema corresponde a un recipiente con 1L de capacidad separado en dos compartimentos, uno inferior donde se coloca el medio de cultivo, y otro superior donde los explantes se colocan sobre un disco. A través de manueras por presión de aire se promueve que el medio suba al compartimento superior mojando los explantes durante un período de tiempo y una frecuencia programada, como se ilustra en la Figura 1. Posteriormente la presión será liberada a través de filtros (Etienne y Berthouly, 2002). El sistema permite disminuir la hiperhidricidad, manipular los tiempos y frecuencias de inmersión, el explante tiene contacto directo con el medio al momento que corresponde, previene contaminación mediante el uso de filtros, y disminuye el estrés ocasionado por sistemas de aireación y agitación (Afreen, 2006).

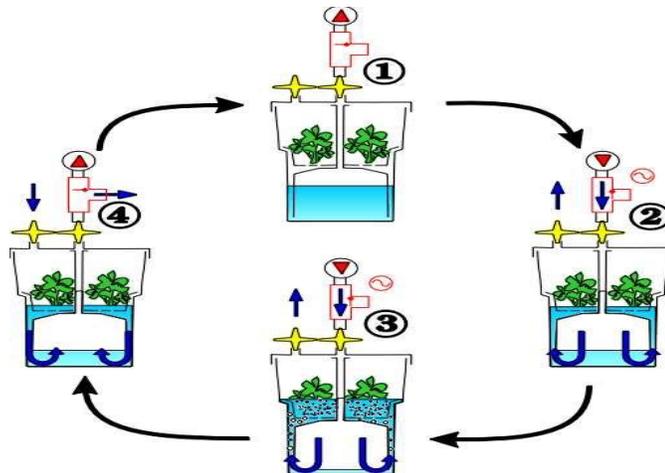


Figura 1. Esquema del funcionamiento de RITA[®].

Fuente: CIRAD, 2009.

– **Sistemas de Inmersión Permanente**

Los sistemas de inmersión permanente se refieren al uso de los biorreactores como medio de propagación masiva que disminuye los costos. Un biorreactor se describe como un recipiente de variable capacidad, en el que los parámetros físicos y químicos pueden controlarse y automatizarse; los hay de varios tipos, y entre sus utilidades está la producción de metabolitos microbianos, animales y vegetales. Además sirven para el crecimiento de células aeróbicas, inmovilización de éstas o de enzimas, producción de bulbos, cormos y tubérculos (Shinkasu y Motomu, 2006 y Tayama y Akita, 2005).

El uso de biorreactores provee ventajas como: aumento en tamaño de las células en cultivo o las plántulas propagadas masivamente; se reducen los costos de manejo, inoculación y cosecha al no requerirse muchos recipientes ni área de trabajo; el contacto directo y permanente de los explantes con el medio puede favorecer el crecimiento; la aireación forzada incrementa la biomasa, se desplaza la dominancia apical y se estimula el desarrollo de brotes laterales. Entre las desventajas del sistema se encuentran la hiperhidricidad, la variación en el tamaño de las plántulas y la grandes pérdidas de material por contaminación (Takayama y Akita, 2005).

En los biorreactores es posible analizar por computadora parámetros químicos como la demanda de oxígeno de las células o explantes, el rango de transferencia de oxígeno, la disponibilidad de este gas, así como también se controlan parámetros físicos como pH, temperatura, agitación y aireación (Curtis, 2005). En general, se componen de recipientes de variable capacidad de fondo plano (preferiblemente de vidrio); una tapa diseñada con aberturas para entrada y salida de mangueras, que tienen como finalidad garantizar la entrada y salida de aire, y la regulación de ácidos y bases; electrodos para medir los niveles de aire y oxígeno disuelto; la tapa se asegura con empaques y tuercas, y se colocan filtros para la entrada de aire estéril. Algunos diseños incluyen algún tipo de turbina o propela para la agitación (Hvoslef *et al.*, 2005).

Estos sistemas se clasifican en tres grandes grupos: los de agitación mecánica como aireación-agitación y tambor giratorio; los de agitación neumática, y los de no agitación como burbujeo sin agitación, columna de burbujeo, de aire comprimido, fase gaseosa, el de membrana permeable y el de superposición (Paek *et al.*, 2005).

Biorreactor de Burbujeo

Corresponde a un tipo de biorreactor bastante sencillo en el que se bombea aire al medio de cultivo a través de un difusor, para oxigenar los explantes. Las burbujas son adecuadamente incorporadas al medio, se evitan fuerzas de corte, se disminuye el requerimiento de energía y el diseño es simple. Pocas veces hay problemas de niveles de aireación muy elevados que hagan el medio espumoso en el nivel superficial (Paek *et al.*, 2005). En general, como todos los biorreactores de no agitación, compensa el problema de la agitación mecánica y, junto con los biorreactores de columna de burbujeo, este tipo de sistema es adecuado para la inmersión permanente de órganos vegetales, manteniéndolos en contacto directo con los nutrientes y reguladores de crecimiento (Paek *et al.*, 2005, Ziv, 2005 y Zhong, 2001). En la Figura 2 se muestra un esquema de este sistema.

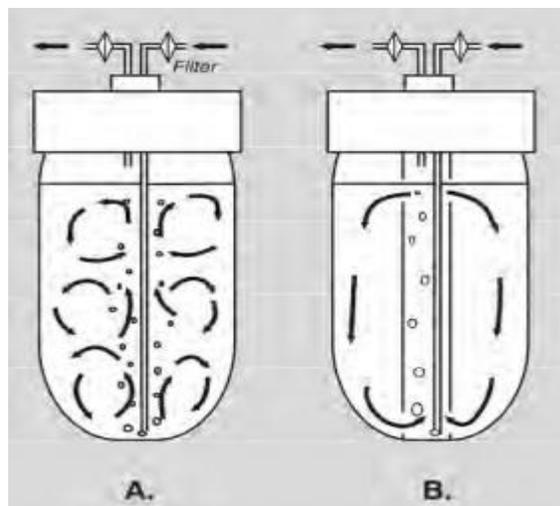


Figura 2. Esquemas de biorreactores sin agitación: A. De burbujeo. B. De aire comprimido.

Fuente: George, 2008.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de tres sistemas de micropropagación masiva de tejidos vegetales: medio semi-sólido, Sistema de Inmersión Temporal RITA[®] y biorreactor de burbujeo, en la regeneración y desarrollo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Objetivos específicos

- Establecer el tiempo y frecuencia de inmersión más favorable para el crecimiento y desarrollo de los explantes en el sistema de RITA[®]
- Evaluar los sistemas de micropropagación en estudio, mediante medición de variables comúnmente cuantificadas en cultivo de tejidos vegetales, como lo son el coeficiente de multiplicación, longitud de explantes, número de hojas por explante, masa fresca y masa seca.
- Evaluar los sistemas de micropropagación en estudio mediante la observación de las variables cualitativas de hiperhidricidad, vigorosidad, coloración y desarrollo radical.
- Recomendar el sistema de micropropagación masiva más adecuado para el desarrollo *in vitro* del cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Desinfección de explantes

Se modificó el protocolo desarrollado por Alvarenga (2005). La introducción *in vitro* de esta especie se realizó a través de microestacas que presentaran uno o dos nudos, a partir de material proveniente del invernadero del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. El material provino de plantas en edad temprana que previamente se asperjaron una vez por semana a una concentración de 3 g/l, de los productos comerciales Agry-micín[®] y Benomil[®], al menos tres semanas antes de la recolección. Una vez en cámara y después de los lavados, se eliminaron los extremos quemados por la desinfección antes de introducir las microestacas en el medio.

La desinfección se realizó mediante un lavado inicial con agua y jabón durante 30 minutos en agitación; se continuó con una inmersión en solución de Agry-micín[®] y Benlate[®] en proporción 1:1 a una concentración de 5 g/l durante 30 minutos; luego se realizó una segunda inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 60% v/v (3,5% i.a.) durante 10 minutos; finalmente se realizaron cuatro lavados de un minuto cada uno, con agua estéril.

B. Introducción de explantes

En cámara de flujo laminar, se cultivaron microestacas con uno o dos nudos en frascos de vidrio tipo Gerber[®] con 20 ml de medio semi-sólido elaborado con sales y vitaminas M & S (1962), 30 g/l de sacarosa y 3,3 g/l de Phytgel[®], se reguló el pH a 5.7.

Las microestacas permanecieron en condiciones de luz difusa a una temperatura de 25 ± 2 °C, y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Una vez que mostraron crecimiento de yemas en los entrenudos, se subcultivaron en el medio de multiplicación.

C. Multiplicación de explantes

El material introducido fue subcultivado en medio semi-sólido elaborado con sales y vitaminas M & S (1962), suplementado con 2 mg/l de Pantotenato de Calcio, 0.5 mg/l de AG₃, 30 g/l de sacarosa y 3.3 g/l de Phytgel[®], a pH regulado de 5.7 (Alvarenga, 2005). Los explantes permanecieron en condiciones de luz difusa a una temperatura de 25 ± 2 °C, y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

Las vitro plantas se subcultivaron cada 30 ó 45 días, dependiendo del crecimiento y desarrollo observado, y conservados bajo las mismas condiciones de luz y temperatura ya descritas.

D. Micropropagación del material

Se probaron y compararon los siguientes sistemas de cultivo: medio semi-sólido, inmersión temporal en RITA[®] e inmersión completa en biorreactor de burbujeo. En los tres sistemas se utilizó el medio de micropropagación citado anteriormente, con el uso del gelificante solamente en medio semi-sólido. Cada tratamiento por sistema, consistió en 4 repeticiones con 10 explantes, para un total de 40 explantes a evaluar por tratamiento. Se micropropagaron microestacas con un nudo y 12 mm de longitud inicial, en todos los tratamientos. Además se realizó un recuento inicial del número de brotes y de hojas de cada explante sembrado.

El periodo de evaluación en todos los tratamientos, fue de dos semanas. Los ensayos se desarrollaron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 22 ± 2 °C, 2000 lux y 16 horas fotoperiodo. El material seleccionado para el montaje de los tratamientos, se eligió de acuerdo con su vigorosidad y coloración verde oscuro, y siempre correspondió a plántulas con tres subcultivos, y con un mes de establecimiento desde su última multiplicación. En la Figura 3 se ilustra la apariencia de las plántulas seleccionadas:



Figura 3. Plántula de *Stevia rebaudiana* en etapa de multiplicación en medio semi-sólido

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.

– Sistema 1: Medio semi-sólido

Este sistema se evaluó a través de un único tratamiento (**T1**), que consistió en la multiplicación de un explante por frasco de cultivo con 20 ml de medio semi-sólido, hasta obtener un total de 40 frascos de un explante cada uno, separados en 4 lotes de 10 frascos.

– Sistema 2: Inmersión Temporal en RITA[®]

Para la micropropagación mediante el Sistema de Inmersión Temporal, se evaluaron nueve tratamientos empleando RITA[®]: 10 min de inmersión cada 6 horas (**T2**), 8 horas (**T3**) y 12 horas (**T4**); 15 min de inmersión cada 6 horas (**T5**), 8 horas (**T6**) y 12 horas (**T7**); y 5 min de inmersión cada 6 horas (**T8**), 8 horas (**T9**) y 12 horas (**T10**). Cada uno de los recipientes contenía 250 ml de medio de multiplicación líquido y 10 explantes, por lo que para cada tratamiento se evaluaron cuatro RITA[®]'s, completando así las 4 repeticiones.

– Sistema 3: Biorreactor de burbujeo

Se construyeron prototipos empleando frascos de vidrio de 1L de capacidad con tapas autoclavables, tubos de vidrio para la entrada y salida de aire, empaques, manueras y filtros de venteo 0,22 μ m. El difusor empleado consistió en una pieza metálica en forma de cilindro hueco de 20 mm de longitud y 7 mm de diámetro, con agujeros inferiores a 1mm de diámetro a través de los cuales se dio la salida del aire para aireación de los explantes, con un flujo regulado de 0.5 litros de aire por minuto por biorreactor (1 vvm). El sistema se evaluó mediante un único tratamiento (**T11**) en el cual se emplearon 4 biorreactores cada uno con 500 ml de medio líquido y 10 explantes. En la Figura 4 se observa el biorreactor de burbujeo empleado en el ensayo.

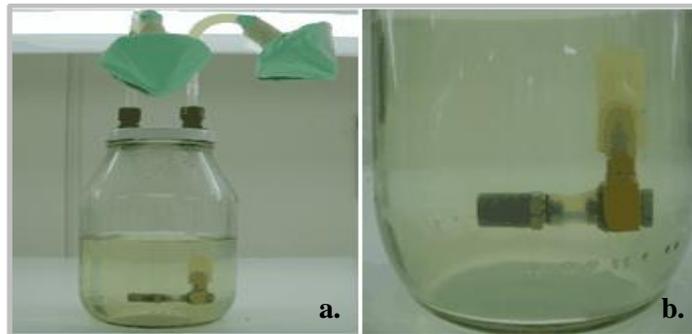


Figura 4. Prototipo de biorreactor de burbujeo: a. Modelo con medio autoclavado b. Detalle del difusor.

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.

El Cuadro 1, resume los tratamientos realizados de acuerdo con el sistema en evaluación:

Cuadro 1. Tratamientos evaluados para la comparación de tres sistemas de micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Sistema	Tratamiento	No. repeticiones	No. recipientes por repetición	No. Explantes por recipiente	Volumen medio (ml)	Inmersión	
						Tiempo (min)	Intervalos (h)
Medio semi-sólido	T1	4	10	1	20	-	-
	T2	4	1	10	250	10	6
	T3	4	1	10	250	10	8
	T4	4	1	10	250	10	12
Inmersión Temporal en RITA [®]	T5	4	1	10	250	15	6
	T6	4	1	10	250	15	8
	T7	4	1	10	250	15	12
	T8	4	1	10	250	5	6
	T9	4	1	10	250	5	8
	T10	4	1	10	250	5	12
Biorreactor de burbujeo	T11	4	1	10	500	-	-

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011

E. Medición de variables cualitativas

Se evaluaron las características cualitativas de vigorosidad, coloración, hiperhidricidad y desarrollo radical por tratamiento a través de la observación, y se documentaron a través de fotografías. En el caso específico de la determinación de la coloración, se utilizó una escala de verdes (Monsef, 2009) (anexo 1) de manera que se facilitara la comparación entre los tratamientos.

F. Medición de variables cuantitativa

Transcurrido el período de multiplicación de 2 semanas estimado para la evaluación, se registró para cada explante el número de brotes, el número de hojas, longitud, y masa fresca y se calcularon promedios de la variable por repetición en cada tratamiento.

Solamente la medición de la masa seca se registró como un solo dato para cada repetición, y se obtuvo colocando los explantes en la estufa a 70°C durante 24 horas.

El coeficiente de multiplicación se calculó para cada repetición, y posteriormente para cada tratamiento, según la fórmula propuesta por Castro y González (2002) (Figura 5). En donde: CM= coeficiente de multiplicación y N°= número.

$$CM = \frac{N^{\circ} \text{ final de brotes}}{N^{\circ} \text{ inicial de brotes}}$$

Figura 5. Fórmula para el cálculo del coeficiente de multiplicación

Fuente: Castro y González (2002).

G. Análisis estadístico de datos

Para cada una de las variables se calcularon los promedios correspondientes por repetición. Los resultados se tabularon en cuadros que mostraban el comportamiento de la variable según el tratamiento. Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA, y la comparación de medias se hizo a través de la Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta tanto de de 1% como de 5%, con el uso del software Statistix[®].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Desinfección de explantes

Las microestacas para introducción se sumergieron en una solución con Agry-micín[®] y Benomil[®], ya que el primero es un bactericida, el segundo, un fungicida. Por esa razón también es de utilidad su aplicación en invernadero, para el control de la aparición de enfermedades. En cuanto al empleo de hipoclorito de sodio en el proceso de desinfección, la importancia de esta solución radica en que actúa como un eficaz germicida, viricida y desodorante (Alfonso, 2003).

Una vez realizados los lavados de los explantes con agua destilada estéril, se eliminaron los extremos quemados por el cloro, con el fin de facilitar la regeneración del tejido. El porcentaje de sobrevivencia utilizando este protocolo fue de entre 30 y 35%, por lo que podría considerarse que no resulta del todo efectivo.

B. Introducción de explantes

Las microestacas introducidas en el laboratorio tenían una longitud de aproximadamente 1 cm, y presentaban al menos un nudo, de manera que las yemas presentes en éste posteriormente brotaron, tal y como se muestra en la Figura 6. Una vez que los brotes adquirían un tamaño de al menos 5 mm, se subcultivaban en el medio de multiplicación propuesto.

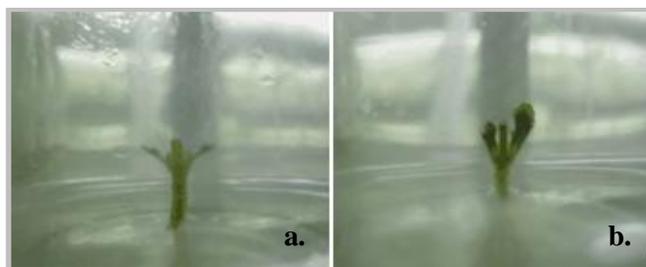


Figura 6. Estaca de *S. rebaudiana* introducida en medio semi-sólido: *a.* a la semana de la introducción, *b.* a las dos semanas.

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.

De acuerdo con la revisión de la literatura relacionada con el cultivo *in vitro* de *S. rebaudiana*, se decidió utilizar estacas para la introducción, debido a que era el explante más adecuado según diversos autores, de acuerdo con los porcentajes de regeneración. Posteriormente se decidió recortar las hojas sin eliminarlas totalmente, para evitar que las yemas se dañaran durante la desinfección, y a su vez disminuir la cantidad de tejido por desinfectar.

El medio con sales y vitaminas M & S (1962) de acuerdo con la literatura consultada, genera buenos resultados en la introducción de esta especie, aún sin adicionar reguladores de crecimiento; por lo tanto, al ser un medio sencillo y relativamente barato, se encontró favorable su empleo, además de que así lo propone Alvarenga (2005). Las condiciones de luz, temperatura, y fotoperiodo se seleccionaron de acuerdo con la propuesta de Alvarenga (2005), y se asemejan a las condiciones que favorecen a la especie en su hábitat natural.

C. Multiplicación de explantes

Los brotes provenientes de las introducciones fueron subcultivados en medio con sales y vitaminas M & S (1962), ésta vez suplementado con Pantotenato de calcio y giberelinas; el primer suplemento favorece el crecimiento al participar en procesos bioquímicos básicos; el segundo promueve la elongación de tallos y hojas al activar los meristemos intercalares (Moshkov *et al.*, 2008). Para los subcultivos posteriores se usaron microestacas, y las condiciones físicas propuestas se mantuvieron por las mismas razones expuestas en el apartado anterior.

Las plántulas subcultivadas presentaban una apariencia saludable y color verde oscuro, además de una elongación pronunciada, sobre todo cuando se trataba de brotes apicales, tal y como se ilustra en la Figura 7.

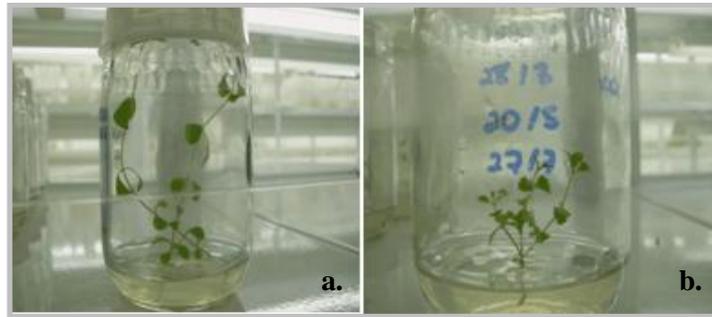


Figura 7. Plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana*: a. Plántula de 5 semanas, b. Plántula de 3 semanas.

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.

La razón por la cual los brotes apicales se elongan más se debe que la auxina desde la yema apical inhibe el crecimiento de las yemas axilares, favoreciendo el alargamiento del eje principal del brote; por tanto, al eliminar la yema apical, se favorece el crecimiento de los brotes laterales, y por ende la ramificación en lugar de la elongación (Campbell y Reece, 2005).

D. Micropropagación del material

Se trabajó con cuatro repeticiones por tratamiento, cada una con 10 explantes para un total de 40 de éstos, debido a que, de acuerdo con el ingeniero Monge (comunicación personal, 8 de junio 2011), este es el mínimo número de repeticiones manejable para realizar un análisis aceptable de los resultados; lo ideal sería trabajar con más de 30 repeticiones, sin embargo, el material *in vitro* disponible para el montaje de los sistemas no era suficiente.

Se determinó que la longitud inicial de los explantes sería de 12 mm ya que la literatura reporta el empleo de microestacas de entre 10 y 15 mm para el subcultivo. Además, se realizó un conteo de hojas y brotes de cada uno de los explantes micropropagados, ya que estos serían los datos iniciales necesarios para la comparación estadística. El tiempo de crecimiento *in vitro* se fijó en 2 semanas, para concluir a tiempo todos los tratamientos propuestos en el plazo estimado de desarrollo del proyecto.

Como se mencionó con anterioridad, debido a la escasez de material *in vitro*, se utilizaron tanto brotes apicales como laterales par la micropropagación. No obstante, como ya se señaló, los brotes apicales presentan una elongación más pronunciada y un crecimiento direccionado, mientras que los brotes laterales tienden a crecer en distintas direcciones (Campbell y Reece, 2005), por lo que lo ideal hubiese sido micropropagar únicamente brotes apicales. Para efectos del análisis estadístico se registraron las características iniciales de número de brotes y hojas, por lo que no se considera que el tipo de explante afectara los resultados finales.

El material seleccionado para los tratamientos en todas las ocasiones se observaba sano, verde y vigoroso, y no se utilizó material subcultivado más de tres ocasiones para evitar la variación somaclonal, que se refiere a las diferencias físicas y genéticas entre las plantas madre y las plántulas *in vitro* (Jayasankar, 2005). Las condiciones de luz y temperatura, durante la evaluación de los tratamientos, cambiaron con respecto a las etapas de introducción y multiplicación, debido a que los compresores de aire requeridos para el montaje de las RITA[®] y biorreactores se encontraban en el cuarto de crecimiento frío del CIB.

Por lo tanto, los explantes se expusieron a luz directa y a una temperatura de 22 ± 2 °C, en lugar de luz difusa y 25 °C, lo cual incidió en el desarrollo de especie, como se analizará más adelante, dado que el hábitat natural de *S. rebaudiana* se caracteriza por temperaturas cálidas, de 20 a 26°C (U.V.A, 2003). Aunado a lo anterior, la luz directa no es la más favorable para la especie, de acuerdo con la investigación de Alvarenga (2005) ya que disminuye el crecimiento y promueve la acumulación de antocianinas.

– Sistema 1: Medio semi-sólido

En el apéndice 1 se muestra el tratamiento con medio semi-sólido. El principal problema que se presentó en T1, único tratamiento para este sistema, fue la contaminación, principalmente por hongos, como levaduras y aparentemente *Penicillium sp.* como se observa en la Figura 8.

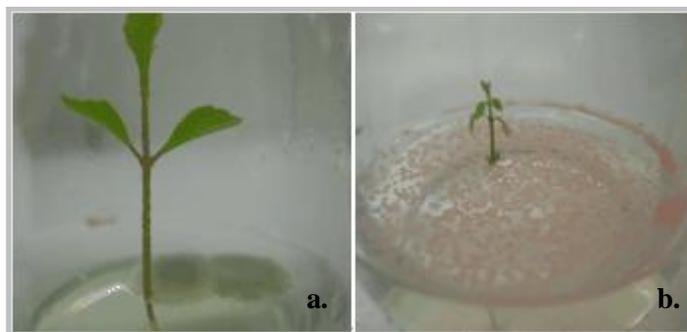


Figura 8. Contaminación en medio semi sólido: *a.* Hongo blanco y filamentoso, *b.* Levadura.

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.

– Sistema 2: Inmersión Temporal en RITA[®]

En el apéndice 2 se ilustra el sistema de inmersión temporal mediante RITA[®].

– Sistema 3: Biorreactor de burbujeo

El tratamiento en biorreactores de burbujeo se ilustra en el apéndice 3. Los mismos presentaron problemas a nivel de acabado del diseño, ya que los tubos de escape de aire, al quedar muy cerca de la superficie del medio, permitieron que este subiera durante el autoclavado y mojara los filtros de escape de aire. Al estar los poros de los filtros tapados, se creó una presión dentro de los frascos que generó el desprendimiento del silicón que sellaba los empaques de la tapa, ocasionando que éstos se levantaran y permitieran el escape de medio cultivo, por lo que al final del proceso en todos los biorreactores se perdió entre un 46% y un 73% de éste.

La pérdida de medio afectó el crecimiento promedio, masa fresca y masa seca de los explantes del biorreactor 1, que en total perdió 270 ml, lo que se analizará más adelante en el apartado de variables cuantitativas evaluadas. Además el flujo de aire no fue el mismo (0,5 l/min) en todo momento para los 4 recipientes, sin embargo, al no monitorearse el sistema mediante sistemas computacionales, no se tiene el dato exacto de la variación, ni en cómo esto afectó los explantes.

E. Variables cualitativas evaluadas

La vigorosidad de los explantes se definió como baja, media o alta, de acuerdo con el grosor del tallo de las plántulas. La hiperhidricidad se evaluó de acuerdo con la textura de los tallos para determinar si estaba presente o ausente. La coloración se determinó con el uso de la paleta monocromática del color verde propuesta por Monsef (2009), en la cual cada tono se identificó con un número del 1 al 10 en intensidad ascendente del verde, como aparece en el anexo 1.

Finalmente, el desarrollo radical se evaluó en cuanto a número de raíces por planta en tres grupos: de 0 a 3 y de 3 a 7, y de 7 a 11, y de acuerdo con la longitud de las raíces, en cuatro grupos: de 0 a 3 mm, de 3 a 6 mm, de 6 a 9 mm y de 9 a 12 mm. En el Cuadro 2 se resumen los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa de los explantes.

Cuadro 2. Características cualitativas de las plántulas después de dos semanas de cultivo en los distintos sistemas de micropropagación.

Sistema	Tratamiento	Vigorosidad	Hiperhidricidad	Coloración	Desarrollo radical	
					No. raíces	Longitud (mm)
Medio semisólido	T1	Baja	Ausente	5	3-7	3-6
	T2	Alta	Ausente	7	0-3	0-3
Inmersión Temporal en RITA [®]	T3	Alta	Ausente	7	3-7	3-6
	T4	Media	Ausente	5	0-3	0-3
	T5	Media	Ausente	5	0-3	0-3
	T6	Media	Ausente	6	3-7	3-6
	T7	Alta	Ausente	7	0-3	3-6
	T8	Media	Ausente	9	3-7	6-9
	T9	Alta	Ausente	8	3-7	9-12
	T10	Media	Ausente	8	3-7	9-12
Biorreactor de burbujeo	T11	Alta	Presente	4	7-11	3-6

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

De acuerdo con el cuadro anterior, los mejores resultados cualitativos pertenecen a T9, seguido por T8 y T10, lo que indica que la micropropagación de *S. rebaudiana* a través de RITA[®] favorece las variables en estudio, ya que los explantes se desarrollan con una coloración y vigorosidad atractiva indicadora de un adecuado funcionamiento fisiológico; no presentan hiperhidricidad lo que les confiere resistencia y fortaleza, y en su mayoría poseen un aceptable desarrollo radical (Zeiger y Taiz, 2007).

En este último aspecto, cabe añadir que si el desarrollo radical no es el ideal, puede utilizarse un medio alternativo, suplementado con AIB. Este compuesto promueve la iniciación del desarrollo radical, tanto en plantas como en estacas (Machakova *et al.*, 2008). Nótese que si el pase a invernadero no se ve afectado por el pequeño tamaño de las raíces, entonces no es necesario utilizar ese suplemento.

Los tratamientos T1 y T11 no resultaron tan favorecedores para la micropropagación de la especie, ya que en el primero las plántulas se mostraron débiles y con una coloración verde claro que indica que no hay un crecimiento óptimo en esas condiciones, y en el segundo, el verde-amarillo refleja que el desarrollo de las plántulas se vio afectado a nivel fisiológico (Zeiger y Taiz, 2007).

La hiperhidricidad que únicamente se observó en T11, se apreció con el desarrollo de hojas gruesas y traslúcidas con un ligero tono verde claro o amarillo, y textura húmeda, que a su vez daba la impresión de plántulas con células muy turgentes.

El sistema de cultivo en medio líquido ofrece ventajas en comparación con el medio semi-sólido, como lo son mayor densidad de siembra en espacios menores, disminución de mano de obra, ahorro en el tiempo de micropropagación, entre otros. Pero una de las principales limitantes es este tipo de sistemas es la aparición de hiperhidricidad, fenómeno que se presenta como un desarrollo anormal de las plantas, que se manifiesta en un desarrollo pobre, con plántulas frágiles de apariencia vidriosa, hojas suculentas y un escaso desarrollo apical y radical; esto es lo que sucedió en en el tratamiento T11 (Hernández *et al.*, 2007).

En algunos tratamientos se observó una coloración anómala, es decir, distinta al verde natural de la especie, como se muestra en la Figura 9, donde aparecen las fotografías más representativas de las tonalidades que se obtuvieron como resultado, las cuales fueron principalmente blanco, rojo-vino, amarillo, y verde muy claro.



Figura 9. Coloración anómala en los tratamientos: a. Etiolación en T1, b. Enrojecimiento en T1, c. Amarillamiento en T11, d. Enrojecimiento en T5

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.

La tonalidad blanca en ciertos explantes solamente se presentó en el tratamiento T1, lo que pudo deberse a que todos los sistemas se expusieron a luz directa, contrario a la recomendación de Alvarenga (2005) que desarrolló su investigación con explantes en erlenmeyer bajo luz difusa. No obstante, no es posible saber con certeza si realmente esa coloración blanca no deseada se debe al efecto de la luz directa o al estrés por el cambio de temperatura de 25 ± 2 a 22 ± 2 °C, que por alguna razón interfieren con la generación de los cloroplastos que dan el color verde a las plantas (Zeiger y Taiz, 2007).

La razón de la tonalidad rojo-vino en los explantes en este mismo tratamiento, puede ser la incidencia de la luz directa sobre los explantes, ya que Alvarenga (2005) observó la acumulación de antocianinas en plántulas expuestas bajo este tipo de iluminación, generando coloraciones rojo-vino o morado, que disminuyeron considerablemente hasta desaparecer, al colocar los explantes en luz difusa.

Entonces, comparando los resultados obtenidos entre luz difusa y luz directa, se puede decir que la segunda forma de iluminación genera una coloración indeseada en las plántulas. El hecho de que el efecto de la luz directa en la coloración se presentara con mayor frecuencia y claridad en medio semi-sólido, es probable que se deba a que los frascos de vidrio, y sus respectivas tapas, facilitan el paso de la luz, la cual logra incidir de forma más efectiva que en los restantes dos sistemas, en los cuales el tono ámbar de las RITA[®] y las tapas blancas de los biorreactores, dificultaban la incidencia directa de la luz, imitando condiciones de luz difusa. Este efecto de los recipientes con respecto a la incidencia de la luz, se observó en una investigación para la micropropagación de jengibre en vaso fermentador, donde se presentó hiperhidricidad y clorosis en los explantes (Hernández *et al.*, 2008).

Si bien en sistema de RITA[®] en los tratamientos T4 y T5 también se observó una coloración rojo-vino, ésta apareció en las zonas de crecimiento como los ápices meristemáticos y las yemas axilares, lo que permite suponer que dicha apariencia es producto del estrés que genera un período muy extenso sin inmersión (10 minutos cada 12 horas en T4) o caso contrario, una inmersión demasiado extensa (15 minutos cada 6 horas en T5). Debido a que en los demás tratamientos de este sistema no se apreció este resultado, no se considera que esté relacionado con la exposición a luz directa. Además, en investigaciones realizadas en especies de interés como café (*Coffea arabica.*), también se ha observado que períodos de inmersión cortos (1 minuto cada 4 horas) en inmersión temporal, resultan más favorecedores para el desarrollo de explantes, en comparación con períodos muy extensos (15 minutos cada 4 horas) (Albarran *et al.*, 2004).

Con respecto al crecimiento en biorreactores, en el tratamiento T11 también se apreció una coloración amarilla sobre todo a nivel de hojas, las que además crecieron en su mayoría de forma anormal y/o enrolladas, lo que puede relacionarse con la forma en la que los sistemas de inmersión permanente afectan el desarrollo de uno o más órganos, de acuerdo con la apreciación del investigador Berthouly (comunicación personal, 24 de octubre 2011).

En cuanto al desarrollo radical, en la Figura 10 se compara esta variable para los tres sistemas. Solamente en T2, T4 y T5 el crecimiento de raíces fue prácticamente nulo, y en los demás tratamientos esta característica varió. Se podría decir que ninguno de los tratamientos mostró el desarrollo radical que presentan las plántulas de un mes subcultivadas en medio semi-sólido en cuarto de crecimiento caliente; por tanto se intuye que el tiempo de evaluación y la temperatura, juegan un papel importante en la apreciación de esta variable (Zeiger y Taiz, 2007).

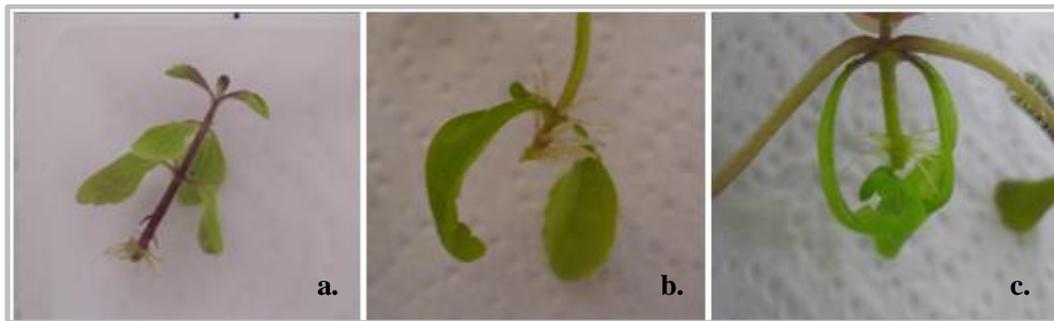


Figura 10. Desarrollo radical en los tratamientos: *a.* T1, *b.* T9, *c.* T11.

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.

El mejor desarrollo radical se observó en RITA[®], específicamente en el tratamiento T9, además en este sistema las esponjas sirvieron como sostén para el crecimiento de este órgano; por otra parte, en medio semi-sólido y en biorreactor el crecimiento de raíces no fue tan favorecido pero al menos sí observable.

En general, las plántulas en el sistema de medio semi-sólido presentaron un crecimiento direccionado, mientras que en RITA[®] y biorreactor, éstas tienden a elongarse sin dirección fija, no obstante, las plántulas del tratamiento T9 trasladadas a invernadero directamente de la RITA[®] a las macetas, mostraron un 100% de sobrevivencia.

F. Variables cuantitativas evaluadas

En los Cuadros 3, 4 y 5 se presentan los resultados del incremento entre el número brotes finales menos los iniciales, número de hojas finales menos iniciales, y longitudes finales menos los 12 mm iniciales; estos datos se utilizaron para la comparación de medias mediante la prueba de Tukey. En el apéndice 4 aparecen los datos primarios recolectados.

Cuadro 3. Incremento en el número de brotes de los explantes por tratamiento para cada repetición.

Sistema	Tratamiento	Δ Número de brotes por repetición			
		1	2	3	4
Medio semi-sólido	T1	0.9	0.8	2.3	3.3
	T2	2.2	3.0	4.1	4.7
	T3	3.4	3.5	2.8	2.4
Inmersión Temporal en RITA [®]	T4	2.0	2.2	2.3	3.5
	T5	2.0	2.4	1.2	3.0
	T8	3.2	4.2	1.0	3.1
	T9	3.6	3.3	3.7	4.6
	T10	1.7	1.8	4.0	1.3
Biorreactor de burbujeo	T11	2.8	3.2	4.9	2.4

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

Cuadro 4. Incremento en el número de hojas de los explantes por tratamiento para cada repetición.

Sistema	Tratamiento	Δ Numero de hojas por repetición					
		1	2	3	4		
Medio semi-sólido	T1	5.5	4.3	8.2	10.8		
	T2	6.3	7.2	9.5	10.7		
	T3	9.4	14.8	3.8	6.9		
	Inmersión	T4	4.0	2.9	0.2	6.7	
	Temporal en RITA [®]	T5	1.5	1.0	4.5	3.8	
		T8	6.5	7.9	5.7	6.1	
		T9	9.5	10.2	9.5	10.3	
		T10	6.7	5.6	7.9	5.8	
		Biorreactor de burbujeo	T11	23.1	32	32.2	32.1

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

Cuadro 5. Incremento en la longitud de los explantes por tratamiento para cada repetición.

Sistema	Tratamiento	Δ Longitud por repetición					
		1	2	3	4		
Medio semi-sólido	T1	3.1	6.1	5.8	10.5		
	T2	9.1	15.6	9.3	26.9		
	T3	19.8	29.6	6.7	30.9		
	Inmersión	T4	10.0	9.2	11.9	19.4	
	Temporal en RITA [®]	T5	7.9	11.7	12.2	18.3	
		T8	19.5	24.1	18.6	22.7	
		T9	26.1	29.5	28.0	30.3	
		T10	21.4	18.7	32.5	19.3	
		Biorreactor de burbujeo	T11	23.1	32	32.2	32.1

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011

De los cuadros anteriores, aún sin análisis estadístico, se puede inferir que para las variables de número de hojas y longitud, en la repetición 1 del tratamiento 11, ambos promedios presentan una baja en comparación con las demás repeticiones, lo que pudo deberse a la pérdida del medio de cultivo en el biorreactor correspondiente, afectando el crecimiento y desarrollo de los explantes debido a la disminución de nutrientes.

La literatura reporta que en ocasiones la pérdida de medio por evaporación en biorreactores tipo *air-lift* es frecuente, y desencadena la disminución en el desarrollo de explantes por las razones anteriores (Mehrotra *et al.*, 2007). También es posible observar la similitud de los promedios en las repeticiones de T9 para las 3 variables expuestas anteriormente, lo que indica que este tratamiento genera resultados aceptables y constantes.

En cuanto a los resultados de masa fresca y masa seca, en los cuadros 6 y 7 se presentan los datos registrados para estas variables, una vez concluido el período de crecimiento *in vitro* de los explantes en los tratamientos en los distintos sistemas.

Cuadro 6. Masa fresca de los explantes por tratamiento para cada repetición.

Sistema	Tratamiento	Promedio de masa fresca por repetición			
		1	2	3	4
Medio semi-sólido	T1	29.16	28.56	29.26	58.37
	T2	21.97	59.20	53.35	77.00
	T3	74.56	117.47	33.41	117.61
Inmersión Temporal en RITA®	T4	28.85	22.30	32.92	52.37
	T5	38.23	33.27	38.33	53.21
	T8	110.23	113.35	62.27	79.71
	T9	107.06	107.62	102.95	111.47
	T10	105.82	55.42	126.07	93.93
Biorreactor de burbujeo	T11	86.97	194.6	225.47	242.34

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011

Cuadro 7. Masa seca de los explantes por tratamiento para cada repetición.

Sistema	Tratamiento	Promedio de masa seca por repetición			
		1	2	3	4
Medio semi-sólido	T1	0.18	1.28	1.86	3.80
	T2	1.18	5.74	4.49	8.31
	T3	8.16	13.84	2.23	12.17
Inmersión Temporal en RITA®	T4	0.52	1.19	0.73	3.87
	T5	2.05	1.40	3.21	5.44
	T8	12.72	11.48	3.05	6.84
	T9	10.81	11.13	8.40	8.98
	T10	10.59	4.13	12.61	9.08
Biorreactor de burbujeo	T11	5.86	18.69	24.68	25.02

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

La medición de la masa seca de los explantes es importante por dos motivos principales: la calidad del material y el aprovechamiento comercial de *S. rebaudiana*. El primer motivo se refiere a que la masa seca funciona como un indicador de calidad de las plantas, ya que al eliminar el agua, el tejido restante se compone principalmente de lignina y polisacáridos de la pared celular, además de componentes del protoplasma como proteínas, lípidos, aminoácidos, ácidos orgánicos y algunos elementos inorgánicos como el potasio (Castro y González, 2002), por lo que entre mayor sea el valor de masa seca, en mayor cantidad se encuentran los compuestos mencionados, que como en este caso, pueden ser aprovechados industrialmente.

En relación con el comercio de productos edulcorantes derivados *S. rebaudiana*, los esteviósidos de interés se obtienen luego de un proceso de secado, molienda y extracción; por lo que el peso seco de las hojas definitivamente influye en el rendimiento (Alvarenga, 2005). Por tanto, tratamientos como T8 y T9 son muy importantes a nivel de micropropagación, ya que el fin último del presente proyecto es la obtención de plantaciones de calidad en cuanto a la producción de esteviósidos. Lo contrario se presenta en T1, T4 y T5, donde los promedios de masa seca por repetición son muy bajos en comparación con lo demás tratamientos.

En el análisis de T11 se determinó que la pérdida del 73% del medio de cultivo en el biorreactor 1 influyó levemente en la masa fresca, y por ende en la masa seca de los explantes, lo cual se evidencia en la baja del promedio obtenido para ambas variables en la repetición 1, en comparación con las tres repeticiones restantes. Lo anterior se explica en función de la pérdida de sales, vitaminas y reguladores disponibles para los explantes, ocasionando incluso la competencia por la absorción de dichos compuestos (George, 2008). En este análisis los valores de masa fresca se utilizan para el cálculo de la masa seca, no obstante, en otros casos, como la comercialización de plantas ornamentales y follajes, la masa fresca es mejor parámetro para evaluar la calidad del material vegetal (Fernández y Revilla, 2003).

Por otra parte, tal y como se presenta en el Cuadro 8 el mayor coeficiente de multiplicación se obtuvo en T5, seguido de T2, ambos tratamientos de RITA[®], por lo que nuevamente se evidencia la efectividad de este sistema en la generación de plántulas sanas y con un buen crecimiento y desarrollo. Sin embargo, como se analizó con anterioridad, en T2 las características cualitativas evaluadas no resultaron favorecedoras, por lo que sería preferiría implementar el T9, que generó mejores resultados en dicho apartado, y que además presenta uno de los mejores coeficientes de multiplicación. El tratamiento menos recomendado a nivel de coeficiente de multiplicación es T1.

Cuadro 8. Cálculo del coeficiente de multiplicación promedio para cada tratamiento.

Sistema	Tratamiento	Coeficiente de multiplicación	
Medio semi-sólido	T1	1.6464	
	T2	3.3286	
	T3	2.8919	
	T4	2.2528	
	T5	3.4473	
	T8	2.7734	
	T9	3.2364	
	T10	2.7148	
	Inmersión Temporal en RITA [®]	T5	3.4473
		T8	2.7734
Biorreactor de burbujeo	T11	3.2702	

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

La razón por la cual el coeficiente de multiplicación es una variable importante para la comparación de sistemas de cultivo, se debe a que refleja la posibilidad de generar nuevas plantas a partir de una en común; es decir, a mayor coeficiente se aumenta la eficacia del sistema. En el caso de la micropropagación esto representa ganancia en cuanto a cantidad y calidad de material *in vitro* disponible, lo que adquiere aún más relevancia cuando se trabaja con especies de difícil manejo en laboratorio, haciendo indispensable la implementación de tratamientos eficaces (Nagata y Ebizuca, 2002).

G. Análisis estadístico de datos

Para el análisis estadístico de los datos fue necesario trabajar con promedios por repetición, ya que en las RITA[®] y los biorreactores era imposible dar seguimiento del desarrollo explante por explante, para relacionar los conteos iniciales con los finales, ya que por la naturaleza de estos sistemas, al ponerlos en funcionamiento, los explantes se mezclan unos con otros. Para amortiguar esa situación, lo ideal hubiese sido trabajar con un mayor número de repeticiones, no obstante, la carencia de material suficiente limitó esa posibilidad.

En el Cuadro 9 se presentan las medias obtenidas para las variables cuantitativas en estudio; en esta primera comparación se toman en cuenta los tres sistemas juntos. Se observa que el error estándar de las mediciones es bastante elevado, por lo que una vez más se evidencia la necesidad de trabajar con más repeticiones.

Cuadro 9. Comparación de medias de las distintas variables para todos los tratamientos, mediante la Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.

Sistema	Tratamiento	Media de las variables				
		Δ No. Brotes (± 0.6992)	Δ No. Hojas (± 1.6380)	Δ Longitud (± 4.1938) mm	Masa fresca (± 22.340) mg	Masa seca (± 2.9634) mg
Medio semi-sólido	T1	1.8250	7.2000	6.3750	36.337	1.7800
	T2	3.5000	8.4250	15.225	52.880	4.9300
	T3	3.0250	8.7250	21.750	85.762	9.1000
Inmersión Temporal en RITA [®]	T4	2.5000	3.4500	12.625	34.110	1.5775
	T5	2.1500	2.7000	12.525	40.760	3.0250
	T8	2.8750	6.5500	21.225	91.390	8.5225
	T9	3.8000	9.8750	28.475	107.28	9.8300
	T10	2.2000	6.5000	22.975	95.310	9.1025
Biorreactor de burbujeo	T11	3.3250	8.3500	29.850	187.34	18.563

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

De acuerdo con el análisis realizado, no existe diferencia significativa en el número de brotes por tratamiento ($p = 0.1882$) (apéndice 5), por lo que todos los tratamientos fueron homogéneos; en otras palabras, las medias de los tratamientos son estadísticamente iguales, como se ilustra en la Figura 11, donde se recalca que el medio con mayor media fue T9, con 3.8 brotes por explante, y el de menor media fue T1, con 1.825 brotes por explante. Es recomendable seleccionar un tratamiento con una alta tasa de brotes, porque incrementa las posibilidades de propagación.

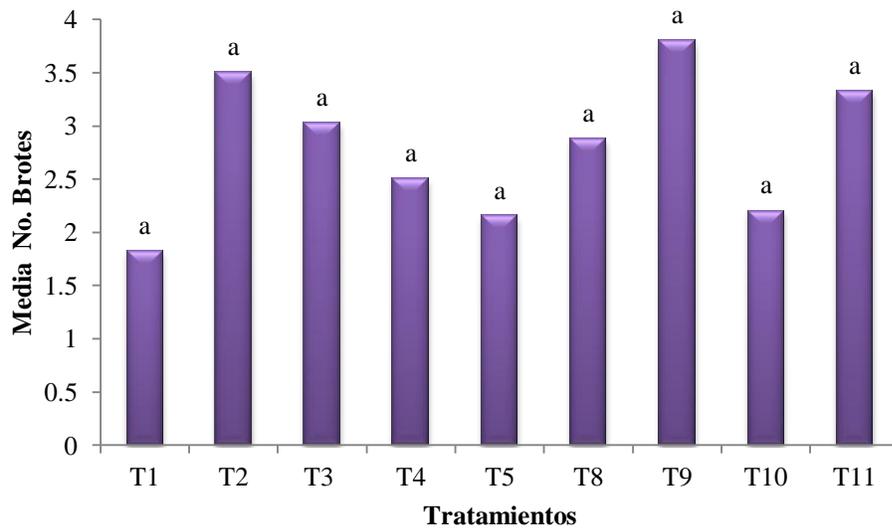


Figura 11. Comparación de medias del número de brotes en las plántulas.

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

En cuanto al número de hojas, se determinó que existe una diferencia significativa alta entre los tratamientos para esta variable ($p = 0.0019$) (apéndice 6), por lo que éstos no se comportaron de manera homogénea; es decir, no todas las medias de los tratamientos son estadísticamente iguales, como se ilustra en la Figura 12, donde se muestra la comparación mediante Prueba de Tukey con un 99% de confianza. Es posible notar que la máxima diferencia se encuentra entre T9, tratamiento con la mayor media con 9.875 hojas por explante, y T5, tratamiento con la menor media con 2.7 hojas por explante.

De acuerdo con lo anterior, T9 es un tratamiento adecuado para el desarrollo de hojas, lo cual adquiere mucha relevancia en *S. rebaudiana*, ya que los esteviósidos de interés comercial se acumulan principalmente en este órgano (Das *et al.*, 2011).

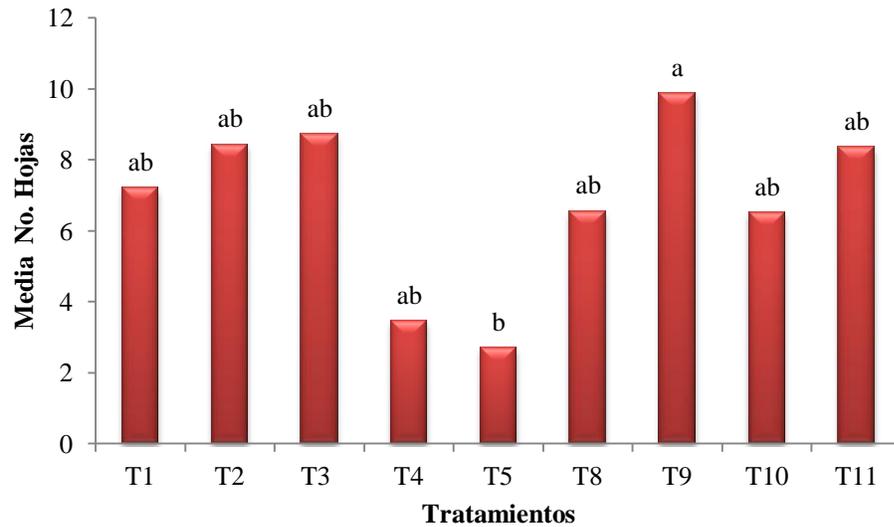


Figura 12. Comparación de medias del número de hojas de las plántulas.

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

La longitud de las plántulas también presentó una diferencia significativa alta entre los tratamientos ($p = 0.0001$) (apéndice 7), como se ilustra en la Figura 13, donde se muestra la comparación mediante Prueba de Tukey con un 99% de confianza. Se observa que los grupos resultaron aún más heterogéneos que en la comparación del número de hojas.

Para esta variable el tratamiento con mayor media fue T11 con 29.85 mm por explante; sin embargo, como ya se discutió en apartados anteriores, T11 es un tratamiento poco recomendable debido a que promueve la malformación de las hojas, por lo que en su lugar es más adecuada la implementación de T9, que generó la segunda media más alta con 28.475 mm por explante. Además, las medias de ambos tratamientos son estadísticamente iguales.

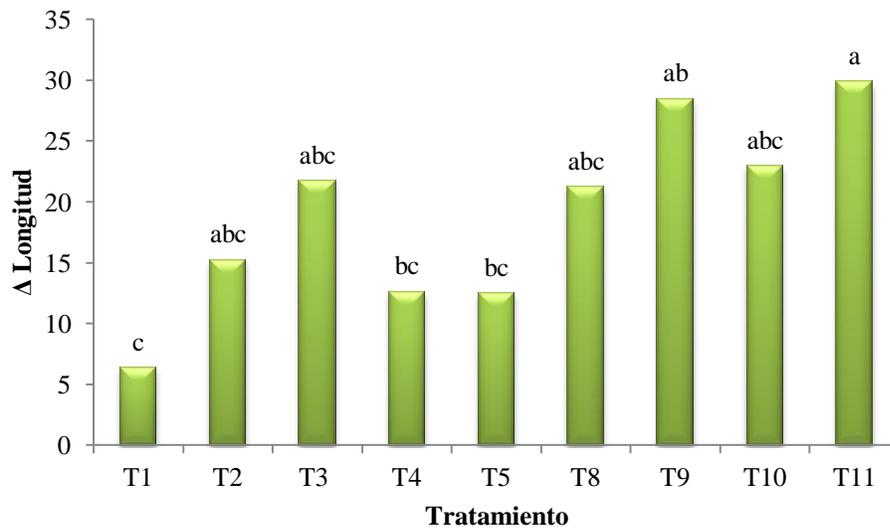


Figura 13. Comparación de medias de la longitud de las plántulas.

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

El tratamiento T1 del todo promovió muy poco crecimiento de los explantes, y en la Figura 14 se puede apreciar con mayor claridad la gran diferencia existente entre este tratamiento y T9. El rápido y vigoroso crecimiento en T9 lo hace un tratamiento favorable inclusive para el traspaso de plántulas a invernadero, sin los protocolos que requiere el paso de medio semi-sólido a invernadero (Majada y Sánchez, 2003).



Figura 14. Comparación del crecimiento en los tratamientos: *a.* A la derecha, explante proveniente de T1, a la izquierda, explante proveniente de T9. *b.* Plántula de T9 trasladada a invernadero.

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.

En el análisis de masa fresca se determinó que existe una diferencia significativa alta entre los tratamientos ($p = 0.0000$) (apéndice 8), dado que T11 reflejó una media muy elevada en relación con el resto de tratamientos, con 187.34 mg por explante, como se presenta en la figura 15, donde se muestra la comparación mediante Prueba de Tukey con un 99% de confianza.

Una vez más, a pesar de que a través de T11 se generó la mayor cantidad de masa fresca, no se recomienda el empleo de este sistema de biorreactor dado el daño que genera en los tejidos; por tanto es preferible el uso de cualquier otro tratamiento, dado que estos presentan medias estadísticamente iguales; no obstante cabe destacar que la mayor media después de T11 se obtuvo con T9, con 107.28 mg por plántula.

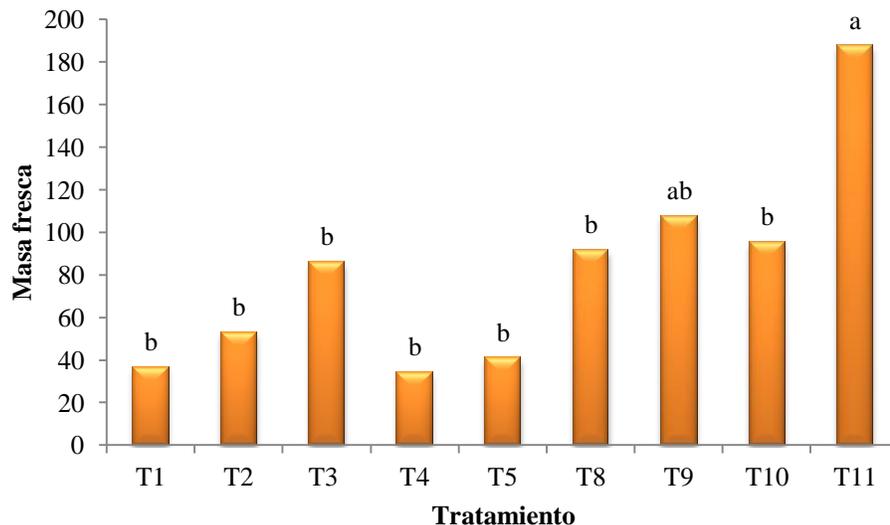


Figura 15. Comparación de medias de la masa fresca de las plántulas.

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

Finalmente en cuanto a los valores de masa seca obtenidos, se determinó que para esta variable también existe una diferencia significativa alta ($p = 0.0001$) (apéndice 9), representada en la Figura 16 donde se muestra la comparación mediante Prueba de Tukey con un 99% de confianza. Nuevamente el tratamiento que marcó la diferencia fue T11 (18,563 mg), ya que los demás son estadísticamente iguales.

El tratamiento T9 es el tratamiento más adecuado después de T11, ya que generó la segunda mejor medio con 9,87 mg por explante. Los resultados de masa seca son importantes ya que permiten dilucidar la cantidad de material disponible para molienda, luego de un proceso de secado, con miras a la extracción de los compuestos de interés para la elaboración de distintos productos a base de *S. rebaudiana* (Alvarenga, 2005).

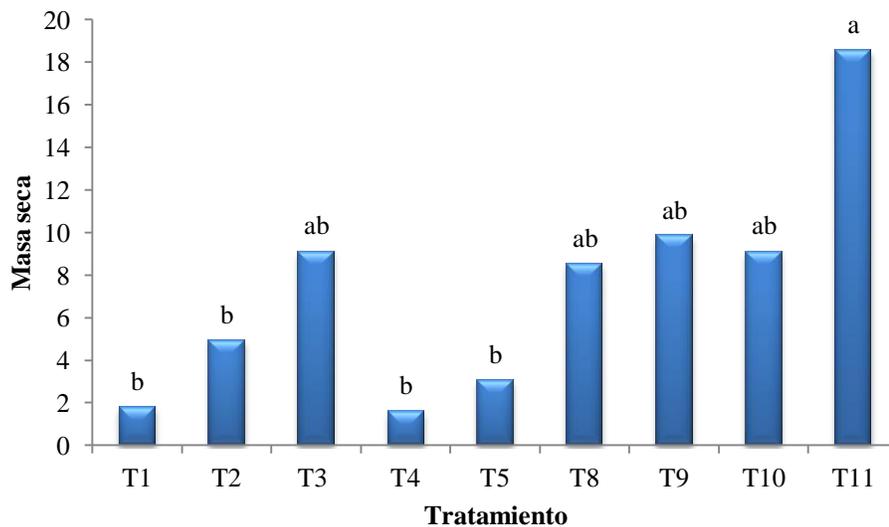


Figura 16. Comparación de medias de la masa seca de las plántulas.

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

Tal y como se aprecia en las comparaciones gráficas anteriores y sus respectivas explicaciones, los tratamientos T6 y T7 fueron excluidos del análisis estadístico debido a que se presentó un problema con las espumas de las RITA[®] correspondientes; las mismas, al parecer por estar nuevas y no ser suficientemente porosas, impidieron que el medio de cultivo bajara al compartimento inferior de los recipientes, por lo que el tiempo de inmersión no correspondía al programado. Solamente una RITA[®] de cada tratamiento no presentó esta dificultad, y en lugar de evaluarse como repeticiones, se tomaron como referencia (apéndice 10).

Como parte de los objetivos planteados en la presente investigación, se realizó un segundo análisis estadístico para la comparación únicamente de los tratamientos de inmersión temporal. Como se resume en el Cuadro 10, las medias de los tratamientos fueron exactamente las mismas discutidas con anterioridad, sin embargo, el error estándar de las mediciones varió con respecto a las presentadas en el Cuadro 9. A pesar de la variación, el error sigue demostrando que se requiere aumentar el número de repeticiones para este tipo de análisis.

Cuadro 10. Comparación de medias de las distintas variables para los tratamientos en RITA[®], mediante la Prueba Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.

Sistema	Tratamiento	Media de las variables				
		Δ No. Brotes (± 0.6631)	Δ No. Hojas (± 1.6506)	Δ Longitud (± 4.5273) mm	Masa fresca (± 16.688) mg	Masa seca (± 2.3239) mg
Inmersión Temporal en RITA [®]	T2	3.5000	8.4250	15.225	52.880	4.9300
	T3	3.0250	8.7250	21.750	85.762	9.1000
	T4	2.5000	3.4500	12.625	34.110	1.5775
	T5	2.1500	2.7000	12.525	40.760	3.0250
	T8	2.8750	6.5500	21.225	91.390	8.5225
	T9	3.8000	9.8750	28.475	107.28	9.8300
	T10	2.2000	6.5000	22.975	95.310	9.1025

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

Se determinó que en relación con el número de brotes por explantes, no hay diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0.1453$) (apéndice 11), y en cuanto al número de hojas por explante existe una alta diferencia significativa ($p = 0.0017$) (apéndice 12). En el caso de la longitud, existe una diferencia significativa muy sutil entre los tratamientos ($p = 0.0150$) (apéndice 13), ya que se presentaron diferencias solamente entre la media de T9 con respecto a las de T4 y T5, las demás medias son estadísticamente iguales al 95% de confianza; al 99% de confianza todos los tratamientos en RITA[®] son estadísticamente iguales para la variable de longitud.

En la evaluación de masa fresca se determinó que existe una alta diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0.0008$) (apéndice 14), mientras que en relación con la masa seca se obtuvo una diferencia significativa sutil ($p = 0.0066$) (apéndice 15), al 95% de confianza, entre T9 y T4 ya que las medias de los restantes tratamientos son estadísticamente iguales. Al 99% todas las medias de masa seca son estadísticamente iguales.

En resumen, a nivel de inmersión temporal, para todas las variables evaluadas el tratamiento T9 fue el que mejores resultados generó, mientras que los datos más bajos se obtuvieron en los tratamientos T4 y T5. A pesar de que las diferencias en algunas variables fueron mínimas, dada la consistencia en los resultados mostrada por T9, definitivamente este es el tratamiento más adecuado a nivel de RITA[®].

Retomando los análisis tanto cualitativos como cuantitativos, el tratamiento T9 es el más recomendable para la micropropagación de *S. rebaudiana*, debido a que los explantes micropropagados se observaron con un color verde fuerte característico de la especie, sin tonos de rojo o blanco, lo que indica que el tratamiento no genera estrés en las plántulas, y permite un adecuado establecimiento aún a una temperatura de 22 °C.

Por parte, la vigorosidad mostrada y el desarrollo radical, denotan un adecuado desarrollo anatómico, y la ausencia de hiperhidricidad, un buen funcionamiento fisiológico. La tasa de brotación, el desarrollo de hojas, y el crecimiento de los explantes en T9 fueron superiores a todos los demás tratamientos, y sólo en los promedios de masa fresca y seca fueron superados por T11, un tratamiento que al perjudicar el desarrollo de las hojas, se considera cuestionable, consolidando a T9 en la primera posición.

La literatura reporta que el crecimiento de *S. rebaudiana* en medio semi-sólido es la técnica de cultivo de tejidos vegetales más utilizada para la micropropagación de esta especie, y su establecimiento *in vitro* se ha comparado empleando distintos explantes, que pueden ser hojas, segmentos nodales, brotes apicales y axilares. A partir de estos

explantes se ha intentado la regeneración de callos, raíces y plántulas completas (Ahmed *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2011 y Rafiq *et al.*, 2007).

La diferencia entre los estudios radica primordialmente en la utilización de diversos tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, lo que a su vez conlleva a distintos resultados. Lo esencial por rescatar de las investigaciones, es que la gran mayoría coincide en que para este tipo de sistema, la temperatura óptima de crecimiento es de 25°C, como en el hábitat natural de la planta, lo que sirve como parámetro para explicar porqué durante la realización del presente trabajo, una temperatura de 22 °C afectó el crecimiento y coloración de los explantes.

Aunque en menor cantidad, existen algunos estudios acerca de la micropropagación, vía organogénesis o embriogénesis somática, de especies medicinales y hortalizas en biorreactor, el cual puede ser tipo balón, air-lift, columna de burbujeo (Paek *et al.*, 2005). Por ejemplo, para la multiplicación de *Chrysanthemum* sp. de la familia Asteraceae, se encontró que la inoculación de biorreactores de burbujeo de 10 L con 80 explantes nodales, resulta en una elevada tasa de brotación, longitud, masa fresca y seca, y vigorosidad (Curtis, 2005).

No obstante, a pesar de que *S. rebaudana* también pertenece a la familia Asteraceae, su cultivo en biorreactor no ha sido del todo exitoso. Un ejemplo de lo anterior, es un estudio en el que se inocularon 460 g de brotes en un biorreactor de agitación de 500 L, para generar 64.6 kg de masa fresca; en este caso, a pesar de la ganancia en masa, la mayoría de los brotes presentaron etiolación, y el desarrollo de las hojas fue suprimido debido que la luz no penetró a todos los brotes con la misma intensidad (Takayama y Akita, 2005).

En la presente investigación, para el tratamiento en biorreactor de burbujeo, los resultados fueron muy similares a los obtenidos en el ejemplo anterior, ya que la malformación de las hojas, y el tenue color verde de las mismas (etiolación), reflejan que las condiciones de cultivo no fueron favorecedoras, sobre todo en lo relacionado con la la incidencia de la luz.

Se podría suponer que las tapas de los biorreactores construidos, impidieron la adecuada penetración de la luz al medio, causando la etiolación de los explantes, y en cuanto a las malformaciones de las hojas, según el investigador Marc Berthouly, esto es a veces una consecuencia del uso de sistemas de inmersión permanente (comunicación personal, 24 de octubre 2011). Por tanto, así como lo exponen Takayama y Akita (2005), al ser las condiciones de crecimiento en biorreactor distintas a las de medio semi-sólido, falta optimizar dichos parámetros, para poder aprovechar los biorreactores en la propagación comercial.

Finalmente, para el cultivo de *S. rebaudiana* en sistemas de inmersión temporal se concluyó que no se ha generado información suficiente respecto al tema, por lo que a falta de investigaciones, se dificulta la comparación de resultados. Lo anterior también resulta favorable para el presente trabajo, ya que lo hace innovador en su propuesta.

Se tiene conocimiento que Alvarenga (2005), realizó un trabajo con *S. rebaudiana*, en el que sometió microestacas nodales a una inmersión de 2 minutos cada 6 seis horas en RITA[®], a una temperatura de 20 ± 2 °C, y obtuvo mejores resultados en cuanto a crecimiento y brotación, en comparación con el medio-semisólido. Lo anterior confirma que una temperatura inferior a la óptima de 25 °C, no impide el desarrollo de explantes de esta especie en RITA[®], como se dio en esta investigación, y que por el contrario, resulta ser un mejor sistema para la micropropagación de la planta medicinal.

En otras plantas de interés comercial, como el café y piña, se ha reportado que los sistemas de inmersión temporal resultan más favorables para la micropropagación, en comparación con medios semi-sólidos, ya que el contacto con el medio estimula la toma de nutrientes y fitohormonas, resultado en un mejor crecimiento y mejor brotación (Albarrán et al., 2004, Hernández et al., 2008 y Mehrotra *et al.*, 2007). Las afirmaciones anteriores apoyan los resultados obtenidos en RITA[®] en la presente investigación.

En el caso del cultivo en sistema de biorreactor, la hiperhidricidad es el fenómeno que posiblemente causó la malformación y decoloración de las hojas de *S. rebaudiana*. Esto se apoya en los resultados generados durante una investigación en cultivo de jengibre en vaso fermentador, en la cual el uso de este sistema produjo hiperhidricidad y clorosis en los explantes, debido al contacto permanente con el medio líquido, la falta de oxigenación, y la escasa luminosidad debido a la obstrucción de las tapas de los recipientes (Hernández *et al.*, 2008), tal y como sucedió con los biorreactores utilizados en este trabajo.

La razón principal por la cual los sistemas de inmersión temporal como RITA[®], pueden generar mejor desarrollo de explantes que los sistemas de inmersión permanente como biorreactores y medio líquido en agitación, es que en los primeros, las inmersiones cortas favorecen la retención, por capilaridad, de una capa fina de medio que envuelve los explantes, sin impedir el intercambio gaseoso, y disminuyendo el riesgo de hiperhidricidad. Además, la composición química se renueva con cada nueva inmersión (Albarrán *et al.*, 2004). Los resultados en RITA[®] a nivel fisiológico, comparados con los obtenidos en biorreactor, pueden encontrar su lógica en la explicación anterior.

La eficacia de un sistema de inmersión en relación con el cultivo *in vitro* tradicional en medio semi-sólido, depende de la adecuada optimización de parámetros bioquímicos y físicos como lo son la densidad de siembra, volumen de medio, composición del medio, pH, aireación, agitación. Por ende, para poder implementar uno de esos sistemas, se debe tener el máximo control en dichas variables (Albarrán, 2004). Justamente la falta de control sobre estas variables durante el crecimiento de *S. rebaudiana*, ocasionó su inadecuado desarrollo en biorreactor.

Al implementar cualquier sistema, se debe tener conocimiento acerca de los recursos materiales y económicos disponibles. La salvedad anterior es muy importante, ya que los tres sistemas comparados en este trabajo poseen diferencias muy marcadas, sobre todo a nivel de costos.

A pesar de que la inversión inicial para el montaje de un sistema de inmersión temporal mediante RITA[®] es alta, dado que el costo de un solo recipiente asciende a ¢70 000 (\$ 140), se debe valorar que la mano de obra requerida para el trabajo de micropropagación disminuye, además de que al ser un sistema de cultivo masivo, permite mantener alrededor de 30 a 40 explantes por recipiente, los cuales además pueden ser directamente trasladados a macetas en invernaderos, acortando el tiempo de aclimatación.

De cualquier manera, si existe interés por micropropagar a mayor escala, entonces se pueden evaluar otros sistemas de inmersión temporal, o plantear modificaciones al sistema de RITA[®]. No se recomienda el trabajo de *S. rebaudiana* en sistemas de inmersión permanente, a menos que se realicen ensayos exhaustivos para optimizar las condiciones físicas y químicas de cultivo (Mehrotra *et al.*, 2007), ya que aparte de elevar los costos debido al equipo especializado que se requiere, daña los tejidos de las hojas disminuyendo la calidad de las plántulas. Si la única posibilidad es el uso de medio semi-sólido, sería preferible que los cuartos de crecimiento se mantengan a una temperatura de aproximadamente 25 °C, y no de 22 ± °C como se hizo en este trabajo.

CONCLUSIONES

La inmersión temporal en RITA durante 5 minutos cada 8 horas (T9) generó los mejores resultados para la micropropagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, con explantes color verde intenso, sin estrés por luz o temperatura, y vigorosidad y desarrollo radical dados por un adecuado desarrollo anatómico y fisiológico, en ausencia de hiperhidricidad. Además fue superior a cualquier otro tratamiento en cuanto a tasa de brotación, el desarrollo de hojas, y el crecimiento de los explantes.

La micropropagación de *S. rebaudiana* en el biorreactor de burbujeo utilizado es este ensayo, ocasionó la deformación y decoloración de las hojas, que constituyen el órgano más importante para la extracción de esteviósidos, por lo que no resulta recomendable para esta especie, dada su importancia comercial.

El sistema de cultivo de *S. rebaudiana* en medio semi-sólido es severamente afectado por la luz directa y temperaturas inferiores a 25°C, perjudicando mayoritariamente el crecimiento, y provocando la acumulación de antocianinas, lo que indica estrés en las plántulas.

Todos los tratamientos comparados presentaron un insuficiente desarrollo radical, en comparación con el subcultivo de *S. rebaudiana* en medio semi-sólido a 25 °C, por lo que se requieren estudios alternativos enfocados en el desarrollo de este órgano para que sea posible su aclimatación en invernadero.

RECOMENDACIONES

Se recomienda la selección de una única planta madre a partir de la cuál establecer las introducciones, de manera que los explantes posean el mismo material genético, y por tanto esto no sea una variable al momento de comparar sistemas de micropropagación.

Es favorable emplear únicamente un tipo de explante, eligiendo entre brotes apicales y brotes laterales, para evaluar la elongación y la brotación secundaria, dado que se ha documentado diferencias en el crecimiento de la plántula de *Stevia rebaudiana* dependiendo del tipo de brote que le dio origen.

Ensayos preliminares realizados en el CIB, mostraron que las condiciones ideales para el crecimiento *in vitro* de la *Stevia* corresponden a luz difusa a 25 ± 2 °C, por lo que se pueden preparar nuevos ensayos que comparen los sistemas en estudio pero bajo estas condiciones.

Para mejorar la vigorosidad de las plantas en medio sólido, se pueden diseñar ensayos en los que se empleen distintas concentraciones de sacarosa, así como en el caso de las RITA[®] se pueden probar medios que contengan AIB en distintas concentraciones con el objetivo de mejorar el enraizamiento.

Se puede diseñar un SIT en el que se empleen dos recipientes conectados con manueras, uno con medio de cultivo y otro con explantes, de manera que el aire desplace el medio de cultivo de un frasco a otro, y la densidad de siembra sea mayor que en la RITA[®] de 1 l.

El diseño de los biorreactores de burbujeo debe impedir el daño a los filtros de salida de aire debido al escape de medio de cultivo, el cual se acumula en su interior, por lo que el diseño propuesto debe ser mejorado. Además se debe asegurar que el sistema de compresión utilizado sea adecuado para mantener el flujo de aire deseado en todos los biorreactores.

Se puede dar continuidad a la comparación de los sistemas propuestos, a través de análisis moleculares, sobre todo a nivel de regeneración de raíz y hojas, para determinar la actividad de los genes involucrados en los procesos.

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico, es necesario aumentar el número de repeticiones por explante al menos a 30, para disminuir el error de muestreo.

Ya que el interés final de la micropropagación *in vitro* de *S. rebaudiana* es la comercialización de productos que aprovechen su contenido de glucósidos, sería conveniente que para los tres sistemas se realicen ensayos tendientes a comparar la producción de estos compuestos en sus hojas.

APÉNDICES

Apéndice 1. Tratamiento de medio semi-sólido.



Figura 17. Sistema de medio semi-sólido.

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.

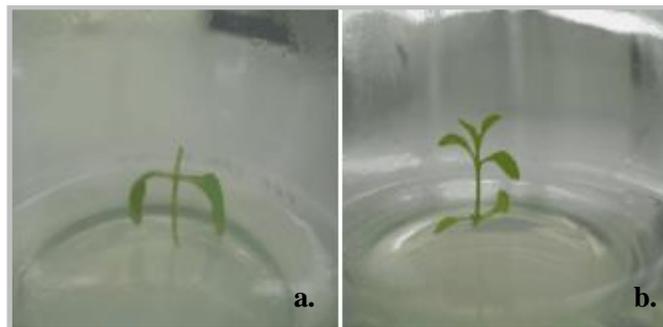


Figura 18. Explantes en el sistema de medio semi-sólido: a. Brote lateral, b. Brote apical.

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.

Apéndice 2. Ensayos de inmersión temporal mediante RITA[®].

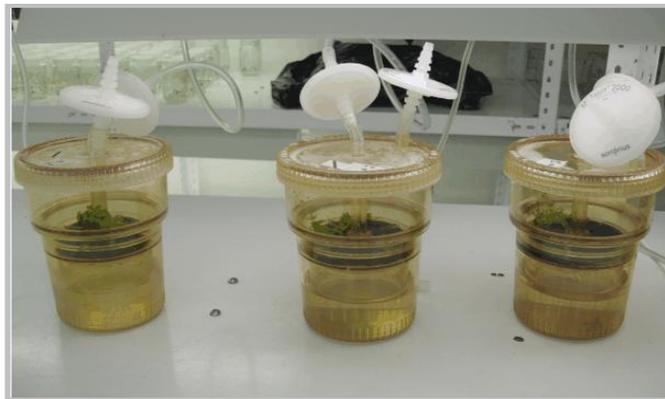


Figura 19. Sistema de inmersión temporal en RITA[®].

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.



Figura 20. Explantes en el sistema de inmersión temporal en RITA[®].

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.

Apéndice 3. Tratamiento con el empleo de biorreactores de burbujeo.



Figura 21. Sistema de inmersión permanente en biorreactor de burbujeo.

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.



Figura 22. Explantes en el sistema biorreactor burbujeo.

Fuente: Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR, 2011.

Apéndice 4. Datos de las variables evaluadas.

Cuadro 11. Promedio del número de brotes inicial por repetición en cada tratamiento.

Sistema	Tratamiento	Promedio de no. inicial de brotes por repetición			
		1	2	3	4
Medio semi-sólido	T1	2.3	3.3	2.7	3.0
	T2	1.2	2.0	2.4	1.1
	T3	1.3	2.2	1.7	1.4
Inmersión Temporal en RITA®	T4	1.8	2.3	2.6	1.7
	T5	0.5	1.8	1.7	0.8
	T8	1.6	1.8	1.7	1.6
	T9	1.0	1.7	1.8	3.1
	T10	1.5	1.0	1.3	1.2
Biorreactor de burbujeo	T11	1.7	1.2	2.0	1.1

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

Cuadro 12. Promedio del número de brotes final por repetición en cada tratamiento.

Sistema	Tratamiento	Promedio de no. final de brotes por repetición			
		1	2	3	4
Medio semi-sólido	T1	3.2	4.1	5.0	6.3
	T2	3.4	5	6.5	5.8
	T3	4.7	5.7	4.5	3.8
Inmersión Temporal en RITA®	T4	3.8	4.5	4.9	5.2
	T5	2.5	4.2	2.9	3.8
	T8	4.8	6.0	2.7	4.7
	T9	4.6	5.0	5.5	7.7
	T10	3.2	2.8	5.3	2.5
Biorreactor de burbujeo	T11	4.5	4.4	6.9	3.5

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

Cuadro 13. Promedio del número de hojas inicial por repetición en cada tratamiento.

Sistema	Tratamiento	Promedio de no. inicial de hojas por repetición			
		1	2	3	4
Medio semi-sólido	T1	2.4	4.5	4.6	3.4
	T2	1.2	2.0	2.4	1.1
	T3	2.8	4.4	4.0	3.0
Inmersión Temporal en RITA®	T4	2.9	3.4	4.4	4.2
	T5	3.2	4.4	2.4	3.4
	T8	4.2	4.3	2.6	4.6
	T9	4.0	3.8	3.9	6.4
	T10	3.0	3.0	4.2	2.4
Biorreactor de burbujeo	T11	3.8	2.4	3.9	2.4

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

Cuadro 14. Promedio del número de hojas final por repetición en cada tratamiento.

Sistema	Tratamiento	Promedio de no. final de hojas por repetición			
		1	2	3	4
Medio semi-sólido	T1	7.9	8.8	12.8	14.2
	T2	7.5	9.2	11.9	11.8
	T3	12.2	19.2	7.8	9.9
Inmersión Temporal en RITA®	T4	6.9	6.3	4.6	10.9
	T5	4.7	5.4	6.9	7.2
	T8	10.7	12.2	8.3	10.7
	T9	13.5	14.0	13.4	16.7
	T10	9.7	8.6	12.1	8.2
Biorreactor de burbujeo	T11	11.7	10.2	14.2	9.8

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

Cuadro 15. Promedio de la longitud final por repetición en cada tratamiento.

Sistema	Tratamiento	Promedio de longitud final por repetición			
		1	2	3	4
Medio semi-sólido	T1	15.1	18.1	17.8	22.5
	T2	21.1	27.6	21.3	38.9
Inmersión Temporal en RITA®	T3	31.8	41.6	18.7	42.9
	T4	22.0	21.2	23.9	31.4
	T5	19.9	23.7	24.2	30.3
	T8	31.5	36.1	30.6	34.7
	T9	38.1	41.5	40.0	42.3
	T10	33.4	30.7	44.5	31.3
Biorreactor de burbujeo	T11	35.1	44.0	44.2	44.1

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

Apéndice 5. Análisis estadístico para la variable de número de brotes en los tres sistemas.

Tabla 1. Análisis de varianza del número de brotes por tratamiento para los tres sistemas.

```

ONE-WAY AOV FOR BROTE BY TRAT

SOURCE      DF      SS      MS      F      P
AAAAAAA    AAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAA  AAAAA
BETWEEN     8      14.5800  1.82250  1.86   0.1082
WITHIN     27      26.4000  0.97778
TOTAL      35      40.9800

BARTLETT'S TEST OF CHI-SQ      DF      P
EQUAL VARIANCES  AAAAA  AAAAA  AAAAA
                   4.93      8      0.7646

COCHRAN'S Q      0.2056
LARGEST VAR / SMALLEST VAR  6.7214

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS  0.21118
EFFECTIVE CELL SIZE  4.0

      TRAT      MEAN      SAMPLE      GROUP
      AAAAAAAA  AAAAAAAA  SIZE        STD DEV
      AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAA  AAAAAAAA
1          1.8250      4          1.1983
2          3.5000      4          1.1165
3          3.0250      4          0.5188
4          2.5000      4          0.6782
5          2.1500      4          0.7550
8          2.8750      4          1.3451
9          3.8000      4          0.5598
10         2.2000      4          1.2193
11         3.3250      4          1.0996
TOTAL     2.8000      36         0.9888

CASES INCLUDED 36  MISSING CASES 0
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 2. Comparación de medias del número de brotes por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF BROTE BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
      AAAAAAAA  AAAAAAAA  GROUPS
      AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA
9          3.8000      I
2          3.5000      I
11         3.3250      I
3          3.0250      I
8          2.8750      I
4          2.5000      I
10         2.2000      I
5          2.1500      I
1          1.8250      I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

CRITICAL Q VALUE      4.758  REJECTION LEVEL  0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON  2.3524
STANDARD ERROR FOR COMPARISON  0.6992
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 3. Comparación de medias del número de brotes por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF BROTE BY TRAT

TRAT	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
AAAAAAAAA	AAAAAAAAA	AAAAAAAAA
9	3.8000	I
2	3.5000	I
11	3.3250	I
3	3.0250	I
8	2.8750	I
4	2.5000	I
10	2.2000	I
5	2.1500	I
1	1.8250	I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

CRITICAL Q VALUE	5.719	REJECTION LEVEL	0.010
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	2.8277		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.6992		

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Apéndice 6. Análisis estadístico para la variable de número de hojas en los tres sistemas.

Tabla 4. Análisis de varianza del número de hojas por tratamiento para los tres sistemas.

```

ONE-WAY AOV FOR HOJA BY TRAT

SOURCE      DF      SS      MS      F      P
AAAAAAA   AAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAA  AAAAA
BETWEEN     8      186.051  23.2563  4.33   0.0019
WITHIN     27      144.893  5.36639
TOTAL      35      330.943

BARTLETT'S TEST OF CHI-SQ      DF      P
EQUAL VARIANCES  AAAAA  AAAAA  AAAAA
                   17.50   8      0.0253

COCHRAN'S Q      0.4482
LARGEST VAR / SMALLEST VAR  114.44

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS  4.47248
EFFECTIVE CELL SIZE  4.0

TRAT      MEAN      SAMPLE      GROUP
AAAAAAA   AAAAA    SIZE        STD DEV
AAAAAAA   AAAAA    AAAAA    AAAAAAAA
1          7.2000     4          2.9017
2          8.4250     4          2.0288
3          8.7250     4          4.6529
4          3.4500     4          2.6913
5          2.7000     4          1.7108
8          6.5500     4          0.9574
9          9.8750     4          0.4349
10         6.5000     4          1.0488
11         8.3500     4          1.3178
TOTAL     6.8639     36         2.3165

CASES INCLUDED 36  MISSING CASES 0

```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 5. Comparación de medias del número de brotes por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF HOJA BY TRAT

TRAT      MEAN      HOMOGEOUS
AAAAAAA   AAAAA    GROUPS
AAAAAAA   AAAAA    AAAAAAAA
9          9.8750     I
3          8.7250     I I
2          8.4250     I I
11         8.3500     I I
1          7.2000     I I I
8          6.5500     I I I
10         6.5000     I I I
4          3.4500     .. I I
5          2.7000     .... I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE      4.758  REJECTION LEVEL  0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON  5.5109
STANDARD ERROR FOR COMPARISON  1.6380

```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 6. Comparación de medias del número de brotes por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF HOJA BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
AAAAAAAAAA  AAAAAAAAAAA  AAAAAAAAAAA
      9      9.8750      I
      3      8.7250      I I
      2      8.4250      I I
     11      8.3500      I I
      1      7.2000      I I
      8      6.5500      I I
     10      6.5000      I I
      4      3.4500      I I
      5      2.7000      .. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE          5.719  REJECTION LEVEL    0.010
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON  6.6245
STANDARD ERROR FOR COMPARISON  1.6380

```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Apéndice 7. Análisis estadístico para la variable de longitud en los tres sistemas.

Tabla 7. Análisis de varianza de la longitud por tratamiento para los tres sistemas.

```

ONE-WAY AOV FOR LONG BY TRAT

SOURCE      DF      SS      MS      F      P
AAAAAAA    AAAA    AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAA  AAAAAA
BETWEEN     8      1968.08  246.010   6.99   0.0001
WITHIN     27      949.753  35.1760
TOTAL      35      2917.83

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES    CHI-SQ    DF    P
AAAAAA    AAAAAA    AAAAAA
12.97     8     0.1129

COCHRAN'S Q    0.3955
LARGEST VAR / SMALLEST VAR    36.658

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS    52.7084
EFFECTIVE CELL SIZE    4.0

      TRAT      MEAN      SAMPLE      GROUP
AAAAAAA    AAAAAAAA    SIZE    STD DEV
AAAAAAA
1          6.3750      4          3.0631
2          15.225      4          8.3480
3          21.750      4          11.190
4          12.625      4          4.6564
5          12.525      4          4.3022
8          21.225      4          2.6018
9          28.475      4          1.8482
10         22.975      4          6.4546
11         29.850      4          4.5007
TOTAL     19.003      36         5.9309

CASES INCLUDED 36    MISSING CASES 0
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 8. Comparación de medias de la longitud por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF LONG BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
AAAAAAA    AAAAAAAA    GROUPS
AAAAAAA
11         29.850      I
9          28.475      I I
10         22.975      I I I
3          21.750      I I I
8          21.225      I I I
2          15.225      .. I I I
4          12.625      .... I I
5          12.525      .... I I
1          6.3750      ..... I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE    4.758    REJECTION LEVEL    0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON    14.109
STANDARD ERROR FOR COMPARISON    4.1938
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 9. Comparación de medias de la longitud por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF LONG BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
      ^^^^^^      ^^^^^^      ^^^^^^
      11      29.850      I
      9       28.475      I I
      10      22.975      I I I
      3       21.750      I I I
      8       21.225      I I I
      2       15.225      I I I
      4       12.625      .. I I
      5       12.525      .. I I
      1        6.3750      .... I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE           5.719   REJECTION LEVEL   0.010
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 16.960
STANDARD ERROR FOR COMPARISON  4.1938
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Apéndice 8. Análisis estadístico para la variable de masa fresca en los tres sistemas.

Tabla 10. Análisis de varianza de masa fresca por tratamiento para los tres sistemas.

```

ONE-WAY AOV FOR MF BY TRAT

SOURCE      DF      SS      MS      F      P
AAAAAAA    AAAA    AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAA  AAAAAA
BETWEEN     8      75751.7  9468.96   9.49   0.0000
WITHIN     27      26949.7  998.139
TOTAL      35      102701

BARTLETT'S TEST OF      CHI-SQ      DF      P
EQUAL VARIANCES      AAAAAA    AAAAAA  AAAAAA
                      25.39      8      0.0013

COCHRAN'S Q      0.5420
LARGEST VAR / SMALLEST VAR      400.50

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS      2117.71
EFFECTIVE CELL SIZE      4.0

      TRAT      MEAN      SAMPLE      GROUP
      AAAAAAAA    AAAAAAAA    SIZE      STD DEV
      AAAAAAAA
1      36.337      4      14.692
2      52.880      4      22.930
3      85.762      4      40.356
4      34.110      4      12.936
5      40.760      4      8.6296
8      91.390      4      24.641
9      107.28      4      3.4866
10     95.310      4      29.720
11     187.34      4      69.775
TOTAL     81.241      36     31.593

CASES INCLUDED 36    MISSING CASES 0
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 11. Comparación de medias de masa fresca por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF MF BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
      AAAAAAAA    AAAAAAAA    GROUPS
      AAAAAAAA
11     187.34      I
9      107.28      .. I
10     95.310     .. I
8      91.390     .. I
3      85.762     .. I
2      52.880     .. I
5      40.760     .. I
1      36.337     .. I
4      34.110     .. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE      4.758    REJECTION LEVEL      0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON      75.158
STANDARD ERROR FOR COMPARISON      22.340
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 12. Comparación de medias de masa fresca por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF MF BY TRAT

TRAT	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
11	187.34	I
9	107.28	I I
10	95.310	.. I
8	91.390	.. I
3	85.762	.. I
2	52.880	.. I
5	40.760	.. I
1	36.337	.. I
4	34.110	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE	5.719	REJECTION LEVEL	0.010
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	90.345		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	22.340		

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Apéndice 9. Análisis estadístico para la variable de masa seca en los tres sistemas.

Tabla 13. Análisis de varianza de masa seca por tratamiento para los tres sistemas.

```

ONE-WAY AOV FOR MS BY TRAT

SOURCE      DF      SS      MS      F      P
AAAAAAA    AAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAA  AAAAA
BETWEEN     8      913.116  114.140   6.50   0.0001
WITHIN     27      474.203   17.5631
TOTAL      35      1387.32

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES  CHI-SQ  DF  P
                                           18.55  8   0.0175

COCHRAN'S Q 0.5072
LARGEST VAR / SMALLEST VAR 44.389

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 24.1441
EFFECTIVE CELL SIZE 4.0

TRAT      MEAN      SAMPLE      GROUP
AAAAAAA  AAAAAAAA  SIZE  STD DEV
AAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAA  AAAAAAAA
1          1.7800      4        1.5162
2          4.9300      4        2.9629
3          9.1000      4        5.1631
4          1.5775      4        1.5537
5          3.0250      4        1.7755
8          8.5225      4        4.4402
9          9.8300      4        1.3439
10         9.1025      4        3.6167
11        18.563      4        8.9535
TOTAL     7.3811      36       4.1908

CASES INCLUDED 36  MISSING CASES 0
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 14. Comparación de medias de masa seca por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF MS BY TRAT

TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
AAAAAAA  AAAAAAAA  GROUPS
AAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA
11        18.563      I
9         9.8300      I I
10        9.1025      I I
3         9.1000      I I
8         8.5225      .. I
2         4.9300      .. I
5         3.0250      .. I
1         1.7800      .. I
4         1.5775      .. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.758  REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 9.9697
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 2.9634
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 15. Comparación de medias de masa seca por tratamiento mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF MS BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
AAAAAAAAA  AAAAAAAAAA  AAAAAAAAAAA
      11      18.563      I
      9       9.8300     I I
     10       9.1025     I I
      3       9.1000     I I
      8       8.5225     I I
      2       4.9300     .. I
      5       3.0250     .. I
      1       1.7800     .. I
      4       1.5775     .. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE           5.719  REJECTION LEVEL    0.010
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 11.984
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 2.9634

```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Apéndice 10. Valores de referencia en T6 y T7

Cuadro 16. Medición de las variables cuantitativas en estudio para T6 y T7.

Tratamiento	Repetición	Δ No. Brotes	Δ No. de hojas	Δ Longitud	Masa fresca	Masa seca
T6	4	4.8	8.7	13.5	40.20	2.19
T7	3	3.6	5.2	12.0	52.47	4.83

Fuente: Karol Jiménez, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2011.

Apéndice 11. Análisis estadístico para la variable de número de brotes en RITA®.

Tabla 16. Análisis de varianza de número de brotes por tratamiento en RITA®.

```

ONE-WAY AOV FOR BROTE BY TRAT

SOURCE      DF      SS      MS      F      P
AAAAAAA    AAAA    AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAA  AAAAAA
BETWEEN     6      9.55929  1.59321  1.81   0.1453
WITHIN     21     18.4650  0.87929
TOTAL      27     28.0243

BARTLETT'S TEST OF    CHI-SQ    DF    P
EQUAL VARIANCES      4.53     6    0.6055

COCHRAN'S Q          0.2939
LARGEST VAR / SMALLEST VAR  6.7214

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS  0.17848
EFFECTIVE CELL SIZE 4.0

      TRAT      MEAN      SAMPLE      GROUP
AAAAAAA    AAAAAAAA    AAAAAA    AAAAAAAA
      2          3.5000      4          1.1165
      3          3.0250      4          0.5188
      4          2.5000      4          0.6782
      5          2.1500      4          0.7550
      8          2.8750      4          1.3451
      9          3.8000      4          0.5598
     10          2.2000      4          1.2193
TOTAL          2.8643     28          0.9377

CASES INCLUDED 28    MISSING CASES 0
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 17. Comparación de medias de número de brotes por tratamiento en RITA® mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF BROTE BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
AAAAAAA    AAAAAAAA    AAAAAAAA
      9          3.8000      I
      2          3.5000      I
      3          3.0250      I
      8          2.8750      I
      4          2.5000      I
     10          2.2000      I
      5          2.1500      I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

CRITICAL Q VALUE          4.597    REJECTION LEVEL    0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON  2.1554
STANDARD ERROR FOR COMPARISON  0.6631
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 18. Comparación de medias de número de brotes por tratamiento en RITA[®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF BROTE BY TRAT		
TRAT	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
9	3.8000	I
2	3.5000	I
3	3.0250	I
8	2.8750	I
4	2.5000	I
10	2.2000	I
5	2.1500	I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

CRITICAL Q VALUE	5.645	REJECTION LEVEL	0.010
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	2.6468		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.6631		

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Apéndice 12. Análisis estadístico para la variable de número de hojas en RITA®.

Tabla 19. Análisis de varianza de número de hojas por tratamiento en RITA®.

```

ONE-WAY AOV FOR HOJA BY TRAT

SOURCE      DF      SS      MS      F      P
AAAAAAAAA  AAAAA  AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA  AAAAAA
BETWEEN     6      174.867  29.1445  5.35   0.0017
WITHIN     21      114.423  5.44869
TOTAL      27      289.290

BARTLETT'S TEST OF      CHI-SQ      DF      P
EQUAL VARIANCES        AAAAAA    AAAAAA  AAAAAA
                        15.92         6      0.0142

COCHRAN'S Q              0.5676
LARGEST VAR / SMALLEST VAR 114.44

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS  5.92396
EFFECTIVE CELL SIZE                        4.0

      TRAT      MEAN      SAMPLE      GROUP
AAAAAAAAA  AAAAAAAAAA  AAAAAA  AAAAAAAAAA
      2          8.4250      4          2.0288
      3          8.7250      4          4.6529
      4          3.4500      4          2.6913
      5          2.7000      4          1.7108
      8          6.5500      4          0.9574
      9          9.8750      4          0.4349
     10          6.5000      4          1.0488
TOTAL          6.6036      28          2.3342

CASES INCLUDED 28      MISSING CASES 0
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 20. Comparación de medias de número de hojas por tratamiento en RITA® mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF HOJA BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
AAAAAAAAA  AAAAAAAAAA  AAAAAAAAAA
      9          9.8750      I
      3          8.7250      I I
      2          8.4250      I I
      8          6.5500      I I I
     10          6.5000      I I I
      4          3.4500      .. I I
      5          2.7000      .... I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE              4.597      REJECTION LEVEL  0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON  5.3654
STANDARD ERROR FOR COMPARISON  1.6506
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 21. Comparación de medias de número de hojas por tratamiento en RITA® mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF HOJA BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
AAAAAAAAAA  AAAAAAAAAA  AAAAAAAAAA
      9      9.8750      I
      3      8.7250      I I
      2      8.4250      I I
      8      6.5500      I I
     10      6.5000      I I
      4      3.4500      I I
      5      2.7000      .. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE      5.645      REJECTION LEVEL      0.010
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON      6.5886
STANDARD ERROR FOR COMPARISON      1.6506
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Apéndice 13. Análisis estadístico para la variable de longitud en RITA®.

Tabla 22. Análisis de varianza de longitud por tratamiento en RITA®.

```

ONE-WAY AOV FOR LONG BY TRAT

SOURCE      DF      SS      MS      F      P
AAAAAAA   AAAA   AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAA  AAAAAA
BETWEEN     6      857.774  142.962   3.49   0.0150
WITHIN     21      860.835   40.9921
TOTAL      27      1718.61

BARTLETT'S TEST OF      CHI-SQ      DF      P
EQUAL VARIANCES      AAAAAA   AAAAAA   AAAAAA
                     10.79      6      0.0950

COCHRAN'S Q      0.4364
LARGEST VAR / SMALLEST VAR      36.658

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS      25.4925
EFFECTIVE CELL SIZE      4.0

      TRAT      MEAN      SAMPLE      GROUP
AAAAAAA   AAAAAAAA  SIZE      STD DEV
AAAAAAA   AAAAAAAA  AAAAAA   AAAAAAAA
      2      15.225      4      8.3480
      3      21.750      4      11.190
      4      12.625      4      4.6564
      5      12.525      4      4.3022
      8      21.225      4      2.6018
      9      28.475      4      1.8482
     10      22.975      4      6.4546
TOTAL      19.257      28      6.4025

CASES INCLUDED 28      MISSING CASES 0
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 23. Comparación de medias de la longitud por tratamiento en RITA® mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF LONG BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
AAAAAAA   AAAAAAAA  GROUPS
AAAAAAA   AAAAAAAA  AAAAAAAA
      9      28.475      I
     10      22.975      I I
      3      21.750      I I
      8      21.225      I I
      2      15.225      I I
      4      12.625      .. I
      5      12.525      .. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE      4.597      REJECTION LEVEL      0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON      14.717
STANDARD ERROR FOR COMPARISON      4.5273
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 24. Comparación de medias de la longitud por tratamiento en RITA[®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF LONG BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
      AAAAAAAAA  AAAAAAAAA  AAAAAAAAA
      9          28.475      I
     10          22.975      I
      3          21.750      I
      8          21.225      I
      2          15.225      I
      4          12.625      I
      5          12.525      I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

CRITICAL Q VALUE          5.645    REJECTION LEVEL    0.010
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 18.072
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 4.5273

```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Apéndice 14. Análisis estadístico para la variable masa fresca en RITA®.

Tabla 25. Análisis de varianza masa fresca por tratamiento en RITA®.

```

ONE-WAY AOV FOR MF BY TRAT
SOURCE      DF      SS      MS      F      P
AAAAAAA    AAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAA  AAAAAA
BETWEEN     6      20513.9  3418.99   6.14   0.0008
WITHIN     21      11696.5  556.975
TOTAL      27      32210.4

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES    CHI-SQ    DF    P
                                           AAAAAA  AAAAAA  AAAAAA
                                           14.58    6      0.0238

COCHRAN'S Q                                0.4177
LARGEST VAR / SMALLEST VAR                133.97

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS    715.504
EFFECTIVE CELL SIZE                          4.0

      TRAT      MEAN      SAMPLE      GROUP
      AAAAAAAA  AAAAAAAA  SIZE        STD DEV
      AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAA     AAAAAAAA
2          52.880      4          22.930
3          85.763      4          40.356
4          34.110      4          12.936
5          40.760      4          8.6296
8          91.390      4          24.641
9          107.28      4          3.4866
10         95.310      4          29.720
TOTAL     72.498      28         23.600

CASES INCLUDED 28    MISSING CASES 0
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 26. Comparación de medias de masa fresca por tratamiento en RITA® mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF MF BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
      AAAAAAAA  AAAAAAAA  GROUPS
      AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA
9          107.28      I
10         95.310     I I
8          91.390     I I I
3          85.763     I I I I
2          52.880     .. I I I
5          40.760     .... I I
4          34.110     ..... I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE                4.597    REJECTION LEVEL    0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON    54.247
STANDARD ERROR FOR COMPARISON    16.688
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 27. Comparación de medias de masa fresca por tratamiento en RITA® mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF MF BY TRAT

TRAT	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
9	107.28	I
10	95.310	I I
8	91.390	I I
3	85.762	I I
2	52.880	I I
5	40.760	I I
4	34.110	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE	5.645	REJECTION LEVEL	0.010
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	66.614		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	16.688		

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Apéndice 15. Análisis estadístico para la variable masa seca en RITA®.

Tabla 28. Análisis de varianza masa seca por tratamiento en RITA®.

```

ONE-WAY AOV FOR MS BY TRAT

SOURCE      DF      SS      MS      F      P
AAAAAAA    AAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAA  AAAAAA
BETWEEN     6      269.739  44.9564   4.16   0.0066
WITHIN     21      226.814  10.8007
TOTAL      27      496.552

BARTLETT'S TEST OF      CHI-SQ      DF      P
EQUAL VARIANCES        AAAAAA    AAAAAA  AAAAAA
                        8.06         6     0.2336

COCHRAN'S Q              0.3526
LARGEST VAR / SMALLEST VAR 14.761

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS      8.53894
EFFECTIVE CELL SIZE                             4.0

      TRAT      MEAN      SAMPLE      GROUP
      AAAAAAAA  AAAAAAAA  SIZE        STD DEV
      AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAA    AAAAAAAA
      2          4.9300     4          2.9629
      3          9.1000     4          5.1631
      4          1.5775     4          1.5537
      5          3.0250     4          1.7755
      8          8.5225     4          4.4402
      9          9.8300     4          1.3439
      10         9.1025     4          3.6167
TOTAL          6.5839     28         3.2864

CASES INCLUDED 28      MISSING CASES 0
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 29. Comparación de medias de masa seca por tratamiento en RITA® mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 5%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF MS BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
      AAAAAAAA  AAAAAAAA  GROUPS
      AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA
      9          9.8300     I
      10         9.1025     I I
      3          9.1000     I I
      8          8.5225     I I
      2          4.9300     I I
      5          3.0250     I I
      4          1.5775     .. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE              4.597      REJECTION LEVEL      0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON  7.5541
STANDARD ERROR FOR COMPARISON  2.3239
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

Tabla 30. Comparación de medias de masa seca por tratamiento en RITA[®] mediante Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1%.

```

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF MS BY TRAT

      TRAT      MEAN      HOMOGENEOUS
AAAAAAAAA  AAAAAAAAAA  AAAAAAAAAAA
      9      9.8300      I
     10      9.1025      I
      3      9.1000      I
      8      8.5225      I
      2      4.9300      I
      5      3.0250      I
      4      1.5775      I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

CRITICAL Q VALUE      5.645      REJECTION LEVEL      0.010
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON      9.2763
STANDARD ERROR FOR COMPARISON      2.3239
    
```

Fuente: Statistix para Windows, 2011.

ANEXOS

Anexo 1. Paleta de verde.

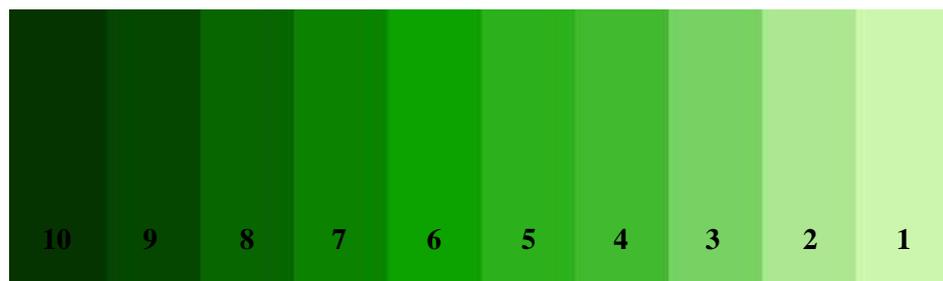


Figura 23: Paleta de verde monocromático.

Fuente: Monsef, 2009.

BIBLIOGRAFÍA

- AFREEN, F. (2006). *Temporary Immersion Bioreactor*. IN: Plant Tissue Culture Engineering. Editado por Dutta Gupta y Yasuomi Ibaraki. 6ta Edición. Países Bajos, Springer. p. 187-201.
- AHMED, M.; SALAHIN, M.; KARIM, R.; RAZVY, M.; HANNAN, M.; SULTANA, R.; HOSSAIN, M.; ISLAM, R. 2007. An efficient method or in vitro clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in Bangladesh. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*. Rajshahi, Bangladés. 2 (2): 121-125.
- ALBARRÁN, B.; BERTRAND, M.; LARTAUD, M.; ETIENNE, H. 2004. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea Arabica* L.) somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Países Bajos. 0: 1-10.
- ALFONSO, R. 2003. *Remington Farmacia*. 20 va Edición. Argentina, Editorial Médica Panamericana. 1388 p.
- ALVARENGA, S. 2005. *Optimización del cultivo y procesamiento de Stevia rebaudiana para la obtención de un edulcorante natural*. CONICIT. San José, Costa Rica. Consultado el 10 de setiembre en:
http://www.conicit.go.cr/boletin/boletin67/cultivo_salvarenga.html
- BERTHOULY, M.; ETIENNE, H. 2005. *Temporary Immersion System: A New Concept for Use Liquid Medium in Mass Propagation*. IN: Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation. Editado por Anne-Kathrine Hvoslef y Walter Preil. Países Bajos, Springer. p. 165-195.
- BOURLAKIS, M.; WEIGHTMAN, P. 2006. *Food Supply Chain Management*. 1era Edición. Estados Unidos, Blackwell Publishing. 413 p.

- CAMPBELL, N.; REECE, J. 2005. *Biology*. 7ma Edición. Estados Unidos, Pearson Education. 1532 p.
- CAPONETTI, J.; GRAY, D.; TRIGIANO, R. 2005. *History of Plant Tissue and Cell Culture*. IN: Plant Development and Biotechnology. Editado por Robert Trigiano y Dennis Gray. 1era Edición. Estados Unidos, Springer. p. 9-15.
- CASTRO, D.; GONZÁLEZ, J. 2002. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* HILL ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. *Agricultura Técnica* 62 (1):68-78.
- CENTRE DE COOPÉRATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT [C.I.R.A.D.]. 2009. *RITA®*, *Récepteur à Immersion Temporaire Automatique*. Francia: C.I.R.A.D. Consultado el 11 de noviembre de 2011 en: <http://www.cirad.fr/innovation-expertise/produits-et-services/equipements-et-procedes/rita-r>
- CLIMA PARAGUAY. 2009. *Geología y Relieve de Paraguay*. Consultado el 14 de octubre de 2011 en: http://www.climaparaguay.com/index.php?option=com_content&view=article&id=5&Itemid=2
- CURTIS, W. 2005. *Application of Bioreactor Design Principles to Plant Propagation of Plants*. IN: Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation. Editado por Anne-Kathrine Hvoslef y Walter Preil. Países Bajos, Springer. p. 21-40
- DAS, A.; GANTAIT, S.; MANDAL, M. 2011. Micropropagation of an Elite Medicinal Plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Agricultural Research*. Mohanpur, India. 6 (1): 40-48
- DJENDOEL, D. 2002. *Botany of Stevia and Stevia rebaudiana*. Stevia: The genus Stevia. 1era Edición. Estados Unidos, Taylor and Fransis. p. 18-39.

- ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. 2002. Temporary immersion system in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Países Bajos. 69: 215-231.
- FERNÁNDEZ, H.; REVILLA, M. 2003. In vitro culture of ornamental ferns. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Oviedo, España. 73: 1-13
- FLORES, M; CORTÉS, R. 2011. Stevia rebaudiana: *Propuesta para la Producción de Esteviósido en Biorreactor*. ITCR. Cartago, Costa Rica. p 1-7.
- GEORGE, E. 2008. *Plant Tissue Culture Procedure-Background*. IN: Plant Propagation by Tissue Culture. Editado por Edwin George, Michael Hall y Geert-Jan Klerck. 3era Edición. Países Bajos, Springer. p. 1-28.
- GEORGE, E.; DAVIS, W. 2008. *Effects of the Physical Environment*. IN: Plant Propagation by Tissue Culture. Editado por Edwin George, Michael Hall y Geert-Jan Klerck. 3era Edición. Países Bajos, Springer. p. 423-464..
- GEORGE, E.; DEBERGH, P. 2008. *Micropropagation: Uses and Methods*. IN: Plant Propagation by Tissue Culture. Editado por Edwin George, Michael Hall y Geert-Jan Klerck. 3era Edición. Países Bajos, Springer. p. 29-64.
- HERNÁNDEZ, A.; GATICA, A.; ALVARENGA, S. 2008. Vaso fermentador de bajo costo para la micropropagación masiva de jengibre. *Agronomía Mesoamericana*. Cartago, Costa Rica. 19 (1): 73-78.
- HVOSLEF, A.; OLSEN, O.; LYNQVED, R.; MUNSTER, C.; HEYERDAHL, P. *Bioreactor Design for Propagation of Somatic Embryos*. IN: Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation. Editado por Anne Kathrine Hvoslef y Walter Preil. Países Bajos, Springer. p. 41-60.
- HWANG, S. 2006. Rapid *In Vitro* Propagation and Enhanced Stevioside Accumulation in Stevia rebaudiana Bertoni. *Journal of Plant Biology*. Naju, Korea. 49(4): 267-270

- IBRAHIM, I.; NASR, M.; MOHAMMEDM, B.; EL-ZEFZAFI, M. 2008a. Plant growth regulators affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech*. El Cairo, Egipto. 10(3) : 254-259
- IBRAHIM, I.; NASR, M.; MOHAMMEDM, B.; EL-ZEFZAFI, M. 2008b. Nutrient factors affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech*. El Cairo, Egipto. 10(3) : 248-253.
- JAYASANKAR, S. 2005. *Variation in Tissue Culture*. IN: Plant Development and Biotechnology. Editado por Robert Trigiano y Dennis Gray. 1era Edición. Estados Unidos, Springer. p. 301-310.
- JIMÉNEZ, E. 2005. *Mass Propagation of Tropical Crops in Temporary Immersion Systems*. IN: Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation. Editado por Anne Kathrine y Walter Preil. Países Bajos, Springer. p. 197-211
- KINGHORN, A. 2002. *Stevia: The genus Stevia*. 1era Edición. Estados Unidos, Taylor and Fransis. p. 1-17.
- MACHAKOVA, I.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. 2008. *Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors*. IN: Plant Propagation by Tissue Culture. Editado por Edwin George, Michael Hall y Geert-Jan Klerck. 3era Edición. Países Bajos, Springer. p. 175-204.
- MAJADA, J.; SÁNCHEZ, T. 2003. *Ecofisiología del cultivo in vitro*. La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis. Barcelona, España. p. 1017-1054.
- MARTÍNEZ, T. 2002. *La Hierba Dulce: Historia, Usos y Cultivo de la Stevia rebaudiana Bertoni*. 1era Edición. España, Colección Ciencias de la Salud. s.p.
- MEHROTRA, S.; KUMAR, M.; KUMAR, A.; NATH, B. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards

commercialization. *African Journal of Biotechnology*. Lucknow, India. 6 (13): 1484-1492.

MONSEF, D. 2009. Best of Color Inspiration: 130+ Green Color Palettes. Consultado el 9 de noviembre de 2011 en:
<http://www.colourlovers.com/blog/2007/08/02/best-of-color-inspiration-130-green-color-palettes/>

MOSHKOV, I.; NOVIKOVA, G.; HALL, M.; GEORGE, E. 2008. *Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds*. IN: Plant Propagation by Tissue Culture. Editado por Edwin George, Michael Hall y Geert-Jan Klerck. 3era Edición. Países Bajos, Springer. p. 227-282.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.

NAGATA, T.; EBIZUKA, Y. 2002. *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medicinal and Aromatic Plants*. XII. Alemania, Springer. 348 p.

PAEK, K.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. 2005. ZIV, M. 2005. *Application of Bioreactor Systems for Large Scale Production of Horticultural and Medicinal Plants*. IN: Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation. Editado por Anne Kathrine y Walter Preil. Países Bajos, Springer. p. 95-116

RAFIQ, M.; DAHOR, M; MANGRIO, S.; NAQVI, H.; QARSHI, I. 2007. *In vitro* clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pak. J. Bot.* Pakistán. 39 (7): 2476-2474.

- SHARIPOVA, R.; STROBYKINA, Y.; MORDOVSKOI, G.; CHESTNOVA, R.; MIRONOV, F.; KATAEV, V. 2011. Antituberculosis activity of glycosides from *Stevia rebaudiana* and hybrid compounds of steviolbioside and pyridinecarboxylic acid hydrazides. *Chemistry of Natural Compounds*. Kazán, República de Tartaristán. 46 (6): 902-905.
- SHINSAKU, T.; MOTOMU, A. 2006. *Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation*. IN: Plant Tissue Culture Engineering. Editado por Dutta Gupta y Yasuomi Ibaraki. 6ta Edición. Países Bajos, Springer. p. 83-100.
- SHREEDAR, R.; VENKATACHALAM, L.; THIMMARAJU, N.; BHAGYALAKHMI, N.; NARAYAN, M.; RAVISHANKAR, G. 2008. Direct organogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana* and cultivation in bioreactor. *Biologia Plantarum*. Mysore, India. 52 (2): 355-360.
- SIVARAM, L.; MUKUNDAN, U. 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. Mumbai, India. 39 (5): 520-523.
- SUÁREZ, I.; SALGADO, J. 2008. Propagación in vitro de *Stevia rebaudiana* Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis. *Temas Agrarios*. Córdoba, Argentina. 13 (1): 40-48
- TAKAYAMA, S.; AKITA, M. *Practical Aspects of Bioreactor Application in Mass Propagation of Plants*. IN: Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation. Anne Kathrine y Walter Preil. Países Bajos, Springer. p. 61-78
- UDDIN, M.; HOSSAIN, M.; HAQUE, M.; BELAL, M.; AHMED, R.; BATEN, A. 2006. *In vitro* propagación of *Stevia rebaudiana* Bert. In Bangladesh. *African Journal of Biotechnology*. Shah Jalal, Bangladés. 5(13): 1238-1240

- UNIÓN VEGETARIANA ARGENTINA [U.V.A.]. 2003. *Stevia o yerba dulce*. Argentina: U.V.A. Consultado el 15 de octubre de 2011 en: <http://www.uva.org.ar/stevia.html>
- ZEIGER, E.; TAIZ, L. 2007. *Fisiología Vegetal*. España, Publicaciones Universidad Jaume. 1338 p
- ZHONG, J. 2001. *Biochemical Engineering of the Production of Plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures*. Advances in Biochemical Engineering. Berlín, Alemania. 2: 1-26.
- ZIV, M. 2005. *Simple Bioreactors for mass propagation of Plants*. IN: Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation. Editado por Anne Kathrine y Walter Preil. Países Bajos, Springer. p. 75-93