



CULTIVO *In vitro* DE *Stevia rebaudiana* B.

Claudia F. Romero^b, Ada María Ríos-Cortés^a, Sandra Luz Cabrera-Hilerio^b, Minerva Rosas-Morales^a,
Javier Carbajal^a, Alma Leticia Martínez-Ayala^c.

^aCIBA-IPN, Tlaxcala, adarioscort@yahoo.com.mx, mormin@hotmail.com, pulquesdeapan@hotmail.com

^b Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Pue., kan_k_u@hotmail.com,
cabrerahilerio_sl@hotmail.com.

^c CEPROBI-IPN almarayala@hotmail.com

RESUMEN

Stevia rebaudiana B. es una planta originaria de Paraguay, ocupada como edulcorante natural no contiene calórico, la cual posee varios usos medicinales. Recientemente ha aumentado el interés en su propagación, no obstante la semilla de estevia tiene un bajo porcentaje de ya que la mayoría son estériles. La propagación más común es por esquejes pero presenta diversas desventajas. Por esto en el presente trabajo se estableció el cultivo *in vitro* de esta planta permitiendo con esto, obtener propagación masiva con características uniformes y teniendo un mayor control sobre la sanidad del material que se propaga, todo esto con el fin de proveer la gran demanda que se espera por el interés creciente en el país. Se utilizaron explantes de yemas, tallos y hojas de la variedad morita II y criolla. El cultivo aséptico consistió en una inmersión de estos explantes en una solución de Cloruro de Mercurio al 0.1%. Los explantes se cultivaron en medio MS al 50% con una combinación de auxinas, citocininas, conteniendo 15g/L de sacarosa y 8 g/L de agar, cisteína (200 mg/L) ajustando pH 5.7. Los cultivos preparados fueron incubados a 26± 1°C y fotoperiodo de 16 horas luz (32 µM/seg m²) y 8 horas de oscuridad. Al transcurrir 28 días se observaron plántulas sanas de 10-12 cm de largo que presentaban raíces. El alto porcentaje de sobrevivencia y de crecimiento, indican que las condiciones beneficiaron el desarrollo y crecimiento de las plántulas. La viabilidad de la multiplicación *in vitro* es el punto de partida para obtener plantas en forma masiva con características seleccionadas y uniformes en cuanto a su crecimiento, satisfaciendo la demanda de la planta, para así dar origen a nuevas plantas en menor tiempo.

1. INTRODUCCIÓN

Stevia es un género de plantas pertenecientes a la familia de las asteráceas; se estima que el número de especies dentro del género es de más de 300, de la cual *Stevia rebaudiana* Bertoni, es la única especie con principios edulcorantes y bajo contenido calórico (Grashoff, 1972). La estevia constituye una prometedora alternativa como edulcorantes naturales, más aún, cuando los edulcorantes sintéticos están seriamente cuestionados por los efectos de su consumo a corto y largo plazo (Martin, 2004), cuyo poder edulcorante en estado puro y cristalino puede ser 300 veces mayor que la sacarosa; las moléculas responsables de esta característica son glucósidos de diterpeno que se encuentran en su mayoría en las hojas y en menor porción en tallo y raíz, los cuales son el esteviósido y rebaudiósido A (Genus, 2003). La estevia en su forma natural, es usada como bactericida, sobre todo las bacterias responsables de la caries; el extracto, se usa para el control de la glicemia tanto en personas sanas como en personas con enfermedades de tipo metabólicas tal como es el caso de la diabetes mellitus tipo 2; también se ha demostrado, que decrece la hipertensión arterial, mediante la inducción a la vasodilatación y controla la glicemia (Brandle, 2005); es por ello, el alto interés comercial que se le ha atribuido en la industria alimentaria. En la búsqueda de alternativas menos riesgosas que los edulcorantes artificiales; ha permitido que el cultivo de *S. rebaudiana* prospere en países como Brasil, Japón e Israel. China



actualmente cultiva el 90% de la producción global de esta planta. Por ello, recientemente ha aumentado el interés en su propagación, esto con el fin de proveer la gran demanda que se espera por el interés creciente en el país.

2. TEORÍA

La estevia es una planta que puede propagarse por todos los sistemas de reproducción habituales, no obstante, se siembra principalmente por medio de semillas, que resultan de la polinización cruzada; esta forma de reproducción implica recombinación genética y por lo tanto alta heterogeneidad en las semillas resultantes, al tener un porcentaje de germinación entre el 10-38 %, que se reflejan tanto en su crecimiento como en la producción de steviósidos (Jordán, 1983).

Se ha recurrido a la reproducción asexual mediante estacas para tratar de obtener materiales homólogos, pero dentro de sus desventajas se menciona que cuando planta entra en floración, disminuye la posibilidad de enraizamiento; cuando existe un mal riego, provoca la desecación de las futuras plántulas y se corre el riesgo de presentar enfermedades fúngicas (Jordán 1983); por lo que no ha sido muy satisfactorio con respecto a la uniformidad del material obtenido, por lo que se ha tenido que buscar otras alternativas propagativas.

Una alternativa es el cultivo de tejidos que permite obtener plantas en forma masiva con características seleccionadas y uniformes en cuanto a su crecimiento y la producción de steviósidos, Asimismo, mediante el cultivo de tejidos es posible producir steviósidos cultivando explantes (tejidos, células) en un medio nutritivo para posteriormente, extraerlos y purificarlos sin requerir de la planta completa.

En la micropropagación se realiza un procedimiento aséptico que comprende la manipulación de plantas, ya sea de órganos, tejidos o células; en el cual, se obtendrá una descendencia uniforme con plantas genéticamente idénticas. Dentro de las ventajas que presenta, en comparación con sistemas convencionales, son: incremento acelerado del número de plantas, disminución del tiempo de multiplicación, mayor número de plantas por superficie, mayor control de sanidad, fácil transporte para comercio de materiales y la posibilidad de multiplicar rápidamente especies en peligro de extinción (Orozco, 2004; Levitus, 2010). Se tiene que tomar en cuenta los cambios tanto cuantitativos como cualitativos que se dan durante el desarrollo, a través del fenómeno de morfogénesis, que es definida como el origen y cambios en la forma específica durante el desarrollo de un organismo y comprende el crecimiento y la diferenciación celular. La respuesta morfogenética puede manifestarse siguiendo dos rutas alternativas: la organogénesis y la embriogénesis.

Una amplia gama de condiciones ambientales desfavorables como daños mecánicos, herbicidas, cambios bruscos de temperatura y la pérdida de nutrientes, provocan estrés oxidativo en las plantas que alteran su desarrollo y metabolismo; esto, mediante la formación de radicales libres que se producen continuamente como subproductos del metabolismo aeróbico provocando la inactivación de enzimas, oxidación de compuestos fenólicos, envejecimiento, incluso conducir a la muerte de la planta.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron yemas axilares y apicales con tallo y hojas de aproximadamente 3 a 5 cm de longitud, variedad morita 2 y criolla. Se realizó un cultivo aséptico de los explantes, los cuales fueron lavados con agua corriente, luego en una solución Tween 20, posteriormente, una inmersión en una solución de Cloruro de Mercurio 0.1% y finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril. El medio de cultivo empleado fue el MS al 50% con diferentes antioxidantes: carbón activado, PVP y cisteína (1g/L, 0.5 g/L y 0.2 g/L respectivamente) a un pH de 5.7.



En condiciones asépticas los explantes se cortaron en segmentos aproximadamente 1 cm en campana de flujo laminar y se colocarán 6 explantes en cada recipiente con el medio MS; para la inducción a callogénesis se usaron diferentes combinaciones de fitorreguladores: BAP 2.5 y 3.0 mg/ml y 2,4-D en intervalos de 1.0 y 1.5 mg/ml; y para la inducción a brote se usaron diferentes combinaciones de ANA en concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/ml y 2,4-D en concentraciones de 1.0 y 1.5 mg/ml.

Posteriormente, se incubaron durante 28 días de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ bajo un régimen de fotoperiodo de 16 horas ($32 \mu\text{M}/\text{seg m}^2$) y 8 horas de oscuridad. Después de la etapa de inducción, los explantes con brotes se pasaron a etapa de multiplicación, donde fueron subcultivados después 4 semanas, en el mismo medio de cultivo para su multiplicación y enraizamiento, con las auxinas ANA y AIA en concentraciones 2.0 y 3.0 mg/ml. Para la aclimatación, se seleccionaron plántulas que presentarán raíz ni oxidación.

4. CONCLUSIONES

Durante las condiciones de incubación, se evaluó, la respuesta morfológica (figura 1) y la oxidación de las plántulas; no se presentó oscurecimiento de tejidos en los explantes incubados con medio MS complementado con PVP más cisteína, a diferencia de los explantes con Carbón activado, que a las 2 semanas, ya presentaban oxidación principalmente en sus hojas; también se observaron plántulas 10-12 cm de largo y que presentaron de 2 a 4 raíces.

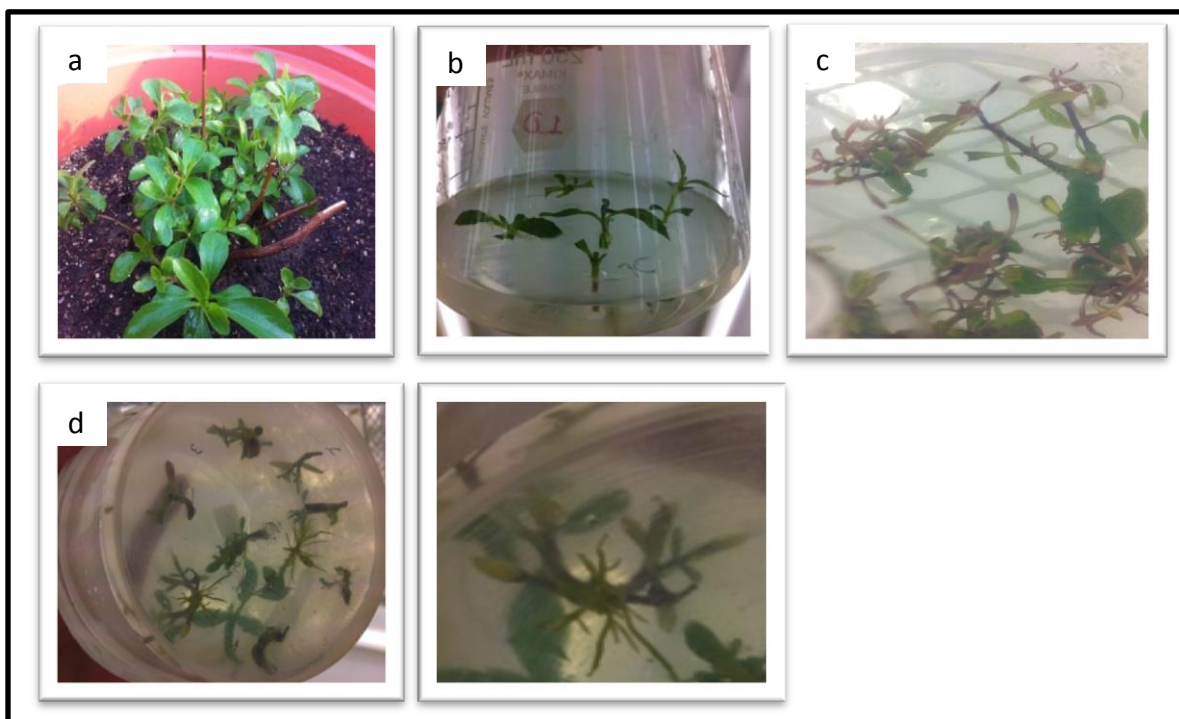


Figura: 1. Cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. (a) Planta madre, (b) Crecimiento y c) multiplicación de brotes estevia, d) Enraizamiento de los brotes.



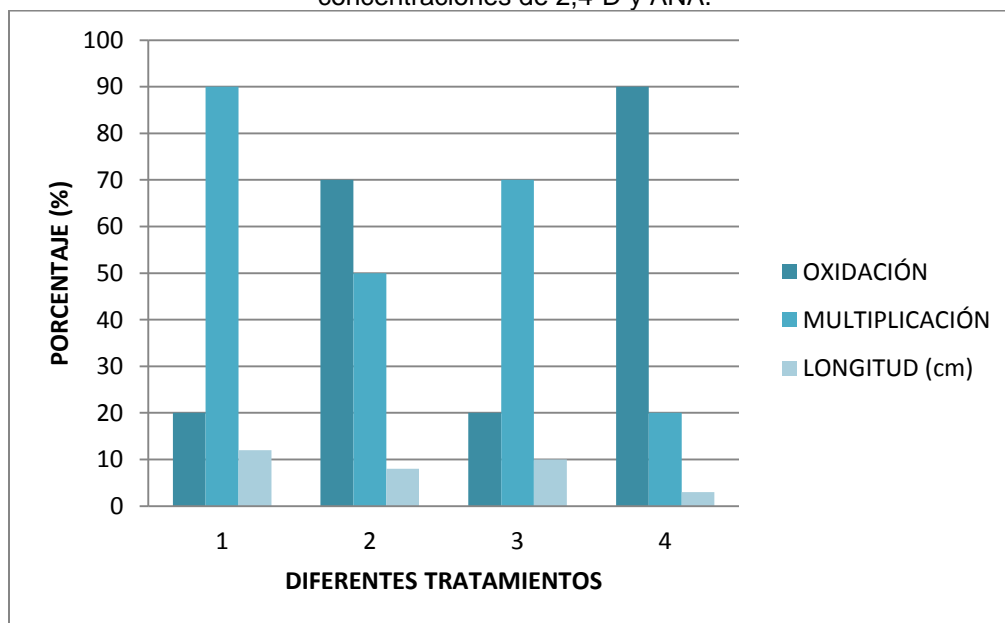
Se observó que ANA [0.5mg/ml] y a mayor concentración de 2,4-D [1.0 mg/ml] dio como resultado la multiplicación de brotes (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos de diversas concentraciones de 2,4-D y ANA (mg / ml) en la longitud de brotes y porcentaje de multiplicación de brotes en *Stevia rebaudiana*

% de explantes que formaron brotes múltiples		% de brotes por explantes	Longitud promedio de brote (cm)
ANA	2,4-D		
0.5	1.0	90	12
0.5	1.5	50	8
1.0	1.0	70	10
1.0	1.5	20	3

El cultivo *in vitro* de estevia, ha sido bien documentado; Pratibha Gupta en 2010 utilizó el cultivo *in vitro* de estevia, para obtener callos en cortos periodos, mediante varias concentraciones de hormonas, tales como IBA, Kinetina, ANA y 2,4 D pero con concentraciones elevadas de ANA; sin embargo, en el presente trabajo se logró bajar la concentración a 0.5 mg/ml con la ayuda de la auxina 2,4-D, para multiplicación de brotes (Gráfica 1). En todos los estudios anteriores que implican la regeneración de brotes *in vitro* de *S. rebaudiana*; a diferencia de este trabajo, fue el fitorregulador 2,4-D a concentración [1.0 mg/ml], donde se observó el óptimo desarrollo de los explantes.

Gráfica 1. Porcentaje de explantes de *Stevia rebaudiana* con multiplicación de brote en diferente concentraciones de 2,4-D y ANA.





Se obtuvieron brotes sanos y de 12 cm aproximadamente de longitud, dentro de las primeras 4 semanas. La regeneración y la mayor longitud de brotes fue significativamente mayor en el tratamiento con ANA [0.5mg/ml] en comparación con la que se consiguió con la otra concentración de [1.0 mg/ml]. Para la inducción de la raíz, los brotes individuales fueron subcultivados en medio MS con auxinas. La mejor inducción y crecimiento de raíces sanas (3 a 4 raíces por explante) se obtuvo en medio MS con ANA [2.0 mg/ml]. Las plántulas con raíces expuestas tuvieron un porcentaje de supervivencia del 95% después de 28 días. Las plantas aclimatadas exhibieron un desarrollo normal y ninguna variación morfológica. El alto porcentaje de crecimiento, indican que las condiciones beneficiaron el desarrollo y crecimiento de las plántulas. La viabilidad de la multiplicación *in vitro* permitió obtener plantas en forma masiva con características seleccionadas y uniformes y en menor tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

1. E.I., Suárez. "Propagación In Vitro de *Stevia rebaudiana* Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis". Universidad de Córdoba, Departamento de ingeniería Agronómica. Temas Agrarios., Vol. 13. 2008, pp.40-48.
2. .F. Jordán. "La propagación de Ka'a he'e, *Stevia rebaudiana* Bertoni. Primer Simposio Nacional de la *Stevia* (Ka'a he'e)". Asunción, Paraguay, 1983.
3. Genus, J.M.C." Molecules of Interest: Stevioside". *Phytochemistry*. 2003. 64:913–921.
4. Grashoff, J.L."A systematic a study of the North Central and Souter". University of Texas. Austin .1972, p.p 609.
5. H. Hartmann, D. Kester, "Propagación de las plantas", 6ta. Ed. C.E.C.S.A., México; 1998, p.p.620..
6. J.E. Brandle, "Stevia, Nature`s natural low calorie sweetener", *Journal of Small-Scale Forest Economics, Management and Policy*, 2005, p.p185-204.
7. Jordán, Francisco. "La propagación de Ka'a he'e. *Stevia rebaudiana* Bertoni". Primer Simposio Nacional de la *Stevia* (ka'a he'e). Asunción, Paraguay. 1983, p.p 12.
8. Orozco, Carlos." Situación actual de la Biotecnología en Guatemala". Consejo Nacional de Áreas Protegidas-CONAP. Primera Edición. Guatemala. 2004.
9. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Morginski, A."Biotecnología y Mejoramiento Vegetal". II Edición. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información el Desarrollo de la Biotecnología. Argentina. 2010.