

Propagación *in vitro* de estevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*): un edulcorante natural a partir de segmentos nodales

Henry Omar Calderón Acuña¹

María Elena Montes de Godoy²

Facultad de Ingeniería y Arquitectura

Universidad Católica de El Salvador, El Salvador

Fecha de recepción: 21-12-2016 / Fecha de aceptación: 12-02-2017

Resumen

La estevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) es un arbusto perenne de la familia Asteraceae. Esta especie tiene un alto valor comercial y medicinal debido a que contiene un glucósido de diterpeno bajo en calorías, cuya capacidad edulcorante en estado puro y cristalino es 300 veces más alta que la sacarosa. La reproducción por semilla de esta especie presenta problemas de heterogeneidad en la población por lo que el cultivo *in vitro* ofrece una solución a este inconveniente.

El material utilizado para su reproducción fueron segmentos nodales seccionados a partir de plantas adultas obtenidas en el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. Se utilizaron esquejes de 10-12cm de largo, los cuales se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.5%. Luego se aplicaron tres enjuagues con agua destilada estéril, y se sembraron en un medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con macrosales al 50% y distintas dosis de citoquininas (sin combinación entre ellas); BAP (Bencilamino purina) y KIN (Kinetina), siendo 0.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0mg/l. De estas, se eligió la citoquinina KIN en las dosis de 2.0 y 2.5mg/l para la fase de multiplicación.

La variable evaluada en la fase de multiplicación fue la tasa de producción de brotes durante tres ciclos de producción. Se obtuvieron mejores resultados con la dosis de 2.5mg/l sin diferencias significativas. La mayor altura de planta (13.5cm) se consiguió con la dosis de 2.0mg/l, y el mayor número de hojas con la de 2.5mg/l. Estas dosis ofrecen una alternativa económica para micropropagar la estevia.

Palabras clave: micropropagación, edulcorantes naturales, kinetina, esteviósidos, *Stevia rebaudiana* (Asteraceae)

Abstract

The Stevia (*Stevia rebaudiana Bert.*) is a perennial shrub of the family Asteraceae. This kind has a high commercial and medicinal value due to that it has glycoside of diterpene low in calories which sweetening power in pure form and crystalline is 300 times higher than the sucrose. The reproduction by seed of this kind presents problems of heterogeneity on the population consequently the crop *in vitro* offers a solution to this inconvenient.

The materials used for the reproduction were selected nodal segments as of adult plants gotten in the National Center of Agricultural and Forest Technology. Cuttings of 10-12 cm long were used which ones were disinfected with sodium hypochlorite solution (NaOCl) to 1.5%. Then, three rinses with sterile distilled water were applied and were seeded in a half MS (Murashige & Skoog, 1962) with macrosales at 50% and different doses of cytokinins (without combination among them) BAP (Bencilamino purina) and KIN (Kinetina), being 0.0, 1.5, 2.0 and 3.0 mg/l. Cytokinin KIN was chosen on the doses of 2.0 and 2.5 mg/l to the reproduction stage.

The variable evaluated on the reproduction stage was the production rate of growths during three production cycles. Better results were gained with the dose of 2.5 mg/l without significant differences. The greater plant height (13.5cm) was reached with the doses of 2.0 mg/l and the greater leaves number with the one of 2.5 mg/l. These doses offer an option of economic regulation to micro-spread the Stevia.

Key words: micropropagation, natural sweeteners, kinetina, stevioside, *Stevia rebaudiana* (Asteraceae)

1. Ingeniero Agrónomo, Investigador; email: henry.calderon1@catolica.edu.sv

2. Maestra en Horticultura, Universidad de Talca, Chile, Docente investigadora; email: maria.montes@catolica.edu.sv

1. Introducción

La estevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) es una especie originaria de Paraguay, donde se le conoce con el nombre guaraní “Ka’a-He-é” (yerba dulce), debido a su intenso sabor dulce presente en sus hojas y tallos, el cual es de origen natural, producido en la síntesis de una serie de glicósidos diterpénicos con un aglucón común, el steviol. El componente principal de las plantas nativas y de las plantaciones desarrolladas en la región es el esteviósido, 300 veces más dulce que la sacarosa (Espitia *et al.*, 2009; Jarma *et al.*, 2010).

En segundo lugar se encuentra el rebaudiósido A, 400 veces más dulce que la sacarosa, al que le siguen en orden de importancia el rebaudiósido C, el dulcósido A (ambos de bajo potencial edulcorante), así como trazas de rebaudiósido D y E (Brandle y Rosa, 1992; Rajasekaran *et al.*, 2007; Kolb *et al.*, 2001/Cit. por Kryvenki *et al.*, 2008). El uso principal de esta especie es el aislamiento y obtención industrial de los cristales de los glicósidos, utilizados como endulzantes naturales dietéticos, debido a que su consumo no aporta calorías al organismo (Osorio, 2007; Alvarenga, 2008). También se pueden utilizar las hojas secas de la planta para endulzar alimentos; sirve como antimicrobiano, estimulante, bactericida, hipertensor, vasodilatador, entre otros (Borda-Molina *et al.*, 2011). Otros estudios han mostrado que el extracto de estevia ayuda en la normalización de los niveles de insulina y azúcar en la sangre

en pacientes diabéticos (Geuns, 2003/Cit. por Kryvenki *et al.*, 2008).

Según Suárez y Salgado (2008), existen dificultades en la regeneración de plantas a partir de semilla sexual, con lo que se limita su mejoramiento genético, arriesgando la evolución y la resistencia genética. Para contrarrestar esta situación, la micropropagación ofrece una alternativa viable de reproducción de esta especie a partir de ápices caulinares, segmentos nodales, hojas y anteras (Tamura, 1984; Akita *et al.*, 1994; Sivaram *et al.*, 2003; Flachsland *et al.*, 1996; Ariza, 2007/Cit. por Kryvenki *et al.*, 2008); además de ofrecer material libre de plagas y enfermedades (Diamant, s.f.; Acosta 2,012).

En este ensayo se estableció el cultivo de estevia *in vitro*, por primera vez en El Salvador, evaluando desde la fase de introducción del material al laboratorio, la multiplicación o regeneración de brotes y el enraizamiento *in vitro*.

2. Metodología

El ensayo se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Católica de El Salvador (UNICAES), sede Santa Ana. El material vegetal fue obtenido del vivero de Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA) (Figura 1a). Luego fue llevado al laboratorio y desfoliado con tijeras, dejando la base de las hojas; luego se lavó con agua de chorro y un agente surfactante, Tween 80, a razón de tres gotas por 100ml de agua (Figura 1b y c). Se uti-

lizaron esquejes jóvenes de entre 10 y 12cm de longitud, realizando los cortes con tijeras desinfectadas con alcohol 70% (Figura 1c). Posteriormente, se sumergieron en una solución de NaOCl (lejía comercial) al 1.5% durante 15 minutos, en cámara de flujo laminar. Luego se aplicaron tres enjuagues con agua desmineralizada estéril y se sumergieron durante tres minutos en alcohol 70%. Después se procedió a realizar el corte de los entrenudos con al menos una yema axilar.

Este material fue sembrado en medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) al 50% de macroelementos, ajustado a un pH de 5.8. Las dosis de BAP y de KIN utilizadas, pero sin combinación entre ellas, fueron de: 0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0mg/l. En esta etapa no se realizó diseño experimental puesto que las únicas dosis de citoquininas que respondieron adecuadamente, formando brotes fueron 2.0 y 2.5mg/l de KIN.

En la fase de multiplicación se utilizaron solamente las dosis de KIN de 2.0 y 2.5mg/l, puesto que fueron con las que se obtuvo los mejores resultados en la etapa inicial; y que comenzó a favorecer la proliferación de explantes. Las otras dosis más bajas o más altas, produjeron mala formación de los brotes y callo en la base. Se realizaron tres ciclos de multiplicación. La fase de desarrollo y enraizamiento no se determinó con exactitud, puesto que las plantas regeneradas comenzaron a enraizar naturalmente sin ningún estímulo hormonal extra producido por auxinas, como suele suceder, por lo que las

plantas posteriormente se procedieron a pasar directamente a la etapa de aviveramiento.

El fotoperíodo de incubación ha sido de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, con 1350 lux de intensidad, con temperatura mínima de 24°C y máxima de 26°C. El diseño experimental utilizado fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial, en donde los factores fueron las dosis de citoquininas. El tratamiento 1 fue la dosis de 2.0mg/l de KIN y el tratamiento 2 fue la dosis de 2.0mg/l de KIN.

El análisis estadístico fue un análisis de varianza (ANOVA), comparación de medias por Tukey y Test de Rangos Múltiples. Se empleó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I para el análisis de los datos. Las unidades fueron frascos de vidrio de 280ml con tres explantes cada uno. El volumen de medio de cultivo de cada frasco fue de 28ml. Se tuvo un mínimo de 20 repeticiones por tratamiento.



Figura 1. Proceso de establecimiento de estevia rebaudiana en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de UNICAES. Planta madre utilizada para obtención de los explantes (a). Posteriormente, proceso de desinfección con de los explantes con 1.5% de hipoclorito de sodio (NaOCl) (b y c).

3. Resultados

Al final de la fase de establecimiento de estevia rebaudiana, los tratamientos que contenían BAP en el medio de cultivo no presentaron los resultados esperados, debido a que formaron callo en la base de los explantes y tuvieron un pobre desarrollo del sistema caular y foliar; en cambio, los que contenían KIN lograron formar múltiples brotes. De esta fitohormona se eligieron las dosis de 2.0mg/l y de 2.5mg/l para continuar la fase de multiplicación, tal como se explicó en la metodología, puesto que con ellas se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a calidad de los brotes producidos. La mejor dosis en la de regeneración de brotes fue en general, la de 2.5mg/l de KIN, y la mayor tasa de producción de brotes se alcanzó en la tercera multiplicación con tasas de 2.6 y 2.7 brotes por explante, sin diferencias significativas (Figura 2). Hubo diferencias significativas en la segunda multiplicación; no obstante se encontraron los menores valores de las tres fases evaluadas.

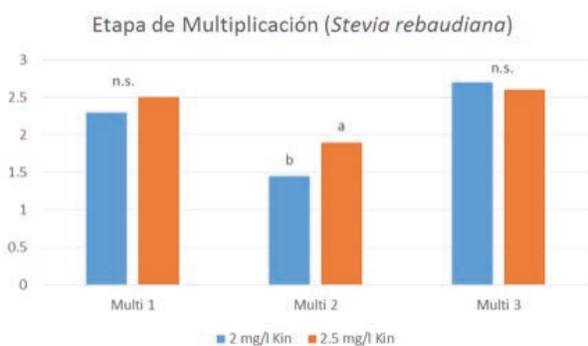


Figura 2. Gráfica del comportamiento de tres ciclos de multiplicación de estevia rebaudiana, con dos dosis de Kinetina, siendo 2mg/l y 2.5mg/l.

En la fase de desarrollo y enraizamiento se evaluaron los parámetros de altura de planta (cm) y número de hojas. Para el caso de altura de la planta, los mejores resultados se obtuvieron con la dosis de 2.0mg/l de KIN con un promedio de 13.5cm respecto a la dosis de 2.5mg/l, con la que se obtuvo una altura media de 12.07cm. Sin embargo, no hubo diferencias significativas (Tabla 1). Para el número de hojas se obtuvo una mayor producción con la dosis de 2.5mg/l, sin diferencias significativas.

Tabla 1. Comparación de medias para distintas variables, siendo altura de planta (cm) y número de hojas según tratamiento con 95.0 intervalos de Tukey

Varibles	Tratamiento (dosis de KIN en mg/l)	Media	Sign.
Altura de planta (cm)	2.0	13.5	n.s.
	2.5	12.07	
Número de hojas	2.0	66.60	n.s.
	2.5	81.91	

*Nota: n.s. = no significativo

4. Discusión

Para la micropropagación de estevia se utilizó el medio MS (Murashige & Skoog, 1962), con macrosales al 50%, lo cual se eligió por la premisa que por ser una planta arbustiva leñosa, se necesita una menor concentración de sales para que responda mejor a las condiciones *in vitro*, tal como lo determinó Litz (2006); y que en este caso, también presentó buenos resultados para reproducir esta especie.

Para la fase de multiplicación de brotes se utilizaron las dosis de 2.0 y 2.5mg/l de KIN, debido a que fueron las que formaron los mejores brotes con eje múltiple desde la fase de inducción o establecimiento. Este resultado concuerda con el obtenido por Delvalle (2001), quien con dosis similares de KIN utilizadas desde el establecimiento, obtuvo buenos resultados en la fase de multiplicación (también sin diferencias significativas); sin embargo, en este ensayo, la formación de raíces fue espontánea en esa etapa, lo cual no sucedió en el resultado expuesto por Delvalle (2001). Sobre la tasa de multiplicación, la máxima fue de 2.7 brotes por explante; en cambio, en el caso de Delvalle (2001), se

alcanzaron tasas de cuatro y un poco más con los siguientes subcultivos. Por otra parte, Kryvenki et al. (2008) y Suárez y Salgado (2008), encontraron que al adicionar BAP a callos embriogénicos, mejoraron su diferenciación y calidad de crecimiento. No obstante, en este ensayo, el BAP no produjo buenos resultados, sino que al contrario, produjo deformación en los brotes y callo en la base, según incrementaba la dosis; lo cual también sucedió con las dosis más altas de KIN.

En el enraizamiento, si bien la altura de plantas fue mayor con la dosis de 2.0mg/l de KIN, teniendo 13.5cm como media, aunque sin diferencias significativas; la mayor cantidad de hojas producidas fue con la dosis de 2.5mg/l, también sin diferencias estadísticas. Por lo tanto, es independiente cuál de las dosis se emplee para la reproducción *in vitro* de estevia rebau-diana, por lo que se podría optar por la alternativa más económica, que es la dosis de 2.0mg/l. Sería conveniente además, la realización de más estudios en distintas técnicas de micropropagación con otras variedades que también se adapten a las condiciones de el país.

5. Referencias

Acosta S., C. (2012). Biotecnología aplicada al cultivo de la stevia. Recuperado de http://www.rediex.gov.py/beta/userfiles/file/24_Produccion_de_plantines_mejorados_de_Stevia_mediante_la_aplicacion_de_la_Biotecnologia.pdf.

Alvarenga V., S. (2008). Optimización del cultivo y procesamiento de Stevia rebaudiana para la obtención de un novedoso edulcorante natural. Boletín de Ciencia y Tecnología. No. 67. Recuperado de http://www.conicit.go.cr/boletin/boletin67/cultivo_salvarenga.html

Borda-Molina, D.; Pardo-García, J.M. y Montaña-Lara, J.S. (2011). Influencia de la materia orgánica y Azotobacter nigrificans en un cultivo de Stevia rebaudiana B. Universitas Scientiarum. Vol. 16 No. 3. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012274832011000300009&script=sci_arttext

Delvalle, V.E. (2001). Propagación *in Vitro* de Stevia rebaudiana B. a partir de segmentos nodales. Tesis Ing. Agr. Zamorano. Recuperado de <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1437/1/T1294.pdf>

Diamant, C.M. (s.f.). Producción de un edulcorante natural mediante cultivo de tejidos vegetales. Recuperado de <http://www.unimoron.edu.ar/Portals/0/PDF/doc-exactas-pub-vol5-02.pdf>

Espitia, M; Montoya, R. y Atencio, L. (2009). Rendimiento de Stevia rebaudiana Bert., bajo tres arreglos poblacionales en el Sinú Medio. Rev.udcaactual.divulg.cient. Vol. 12 No.1, Bogotá. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012342262009000100016

Jarma, A.J. (2010). Adaptación de dos clones de Estevia (Stevia rebaudiana Bert.) a tres ambientes del Caribe colombiano. Tesis doctoral en CC. Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/2665/1/alfredodejesusjarmaorozco.2010.pdf>

Kryvenki, M.; Kosky, R.; Guerrero, D.; Dominguez, M. y Reyes, M. (2008). Obtención de callos con estructura embriogénicas de Stevia rebaudiana Bert. en medio de cultivo semisólidos. Biotecnología Vegetal, Vol. 8. No. 2:91-98

Litz, R. (2006). Comunicación personal. ENA (Escuela Nacional de Agricultura), San Andrés, El Salvador.

Murahige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497p.

Osorio, C. (2007). Stevia el dulce sabor de tu vida. Plan Estratégico. Bogota Community College. Recuperado de <http://www.agrolalibertad.gob.pe/sites/default/files/manual%20stevia.pdf>

Suárez, I. y Salgado, J.A. (2008). Propagación *in Vitro* de Stevia rebaudiana Bert. (Asteraceae-Eupatoriae) a través de organogénesis. Recuperado de <http://www.unicordoba.edu.co/revistas/rta/documentos/13-1/PROPAGACION%20IN%20VINTRO.pdf>